



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—201×

非淀粉多糖水解酶活力测定

Determination of activity for non-starch polysaccharide hydrolase

××××-××-×× 发布

××××-××-×× 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：江南大学、中国标准化研究院、北京萨姆伯科技有限公司。

本标准主要起草人：吴晓玲、胥传来、匡华、马爱进、李月、刘丽强、徐丽广、马伟、王忠兴、郭玲玲、郝帅。

非淀粉多糖水解酶活力测定

1 范围

本标准规定了非淀粉多糖水解酶活力测定方法。
本标准适用于非淀粉多糖水解复合酶活力测定。
本方法的定量限 12 U/g。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

非淀粉多糖水解酶 non-starch polysaccharide hydrolase
能催化各种非淀粉多糖底物中的糖苷键断裂，产生还原糖的一系列酶类。
注：本标准中的非淀粉多糖水解酶特指纤维素酶、β-葡聚糖酶及其复合酶。

3.2

滤纸非淀粉多糖水解酶活力单位 filter paper non-starch polysaccharide hydrolase activity unit
在 37 ℃，pH 5.50，每分钟降解滤纸试样释放 1 μmol 还原糖所需要的酶量。
注：以 U/g 表示。

4 原理

非淀粉多糖水解酶能将非淀粉多糖降解成寡糖和单糖。还原性寡糖和单糖在水浴中与 3,5-二硝基水杨酸试剂发生显色反应。反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比，而还原糖的生成量又与反应液中非淀粉多糖水解酶的活力成正比。通过分光光度法测定反应液的吸光度，计算出非淀粉多糖水解酶的活力。

5 试剂或材料

除非另有规定，所用试剂均为分析纯。

5.1 水

GB/T 6682 二级水。

5.2 200 g/L 氢氧化钠溶液

称取 20.00 g 氢氧化钠,加水溶解,定容至 100 mL。

5.3 0.1 mol/L 乙酸溶液

量取 0.60 mL 冰乙酸,加水稀释,定容至 100 mL。

5.4 0.1 mol/L 乙酸钠溶液

称取 1.36 g 三水乙酸钠,加水溶解,定容至 100 mL。

5.5 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液

准确称取 23.14 g 三水乙酸钠,加 1.70 mL 冰乙酸,加水溶解,定容至 2 000 mL。测定溶液 pH,若 pH 偏离 5.50,则用 0.1 mol/L 的乙酸溶液(5.3)或 0.1 mol/L 的乙酸钠溶液(5.4)调节 pH 至 5.50。

5.6 10.0 mg/mL 葡萄糖标准储备液

称取经过 98 ℃~100 ℃ 烘箱中干燥 2 h 后的无水葡萄糖 1.00 g,加乙酸-乙酸钠缓冲溶液(5.5)溶解,定容至 100 mL。

5.7 滤纸

定性滤纸,孔径 7 μm~16 μm,直径 7 cm。

5.8 3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS 试剂)

准确称取 3,5-二硝基水杨酸 3.15 g,加水 500 mL 搅拌溶解,水浴至 45 ℃,然后缓慢加入 100 mL 氢氧化钠溶液(5.2),不断搅拌,直至溶液清澈透明(在加入氢氧化钠过程中,溶液温度不得超过 48 ℃)。再逐步加入四水酒石酸钾钠 91.00 g,苯酚 2.50 g 和亚硫酸钠 2.50 g,继续 45 ℃水浴加热,补加水 300 mL,不断溶解,直到完全溶解。冷却至室温后,加水定容至 1 000 mL。过滤,取滤液,存储在棕色瓶中,避光保存。室温下存放 7 d 后使用,有效期为 6 个月。

6 仪器设备

6.1 分样筛:孔径为 0.25 mm。

6.2 电子天平:感量为 0.01 g。

6.3 pH 计:精确至 0.01。

6.4 离心机:离心力不低于 2 000×g。

6.5 磁力搅拌器:附加热功能。

6.6 恒温水浴锅:温度偏差在±0.1 ℃以内。

6.7 秒表:每小时误差不超过 5 s。

6.8 分光光度计:检测波长 540 nm。

7 测定步骤

7.1 绘制标准曲线

7.1.1 吸取乙酸-乙酸钠缓冲溶液 1.00 mL,再分别加入 2.00 mL 水和 2.00 mL DNS 试剂,振荡混匀,

沸水浴加热 5 min。取出,迅速用冷水冷却至室温,用水定容至 25 mL,制成试剂空白溶液。

7.1.2 吸取葡萄糖标准储备液 0.00 mL、1.00 mL、2.00 mL、4.00 mL、5.00 mL、6.00 mL、8.00 mL 和 10.00 mL,分别于 50 mL 容量瓶中,用乙酸-乙酸钠缓冲溶液定容,摇匀,配制成浓度为 0.00 mg/mL~2.00 mg/mL 的葡萄糖标准工作溶液。

7.1.3 分别吸取葡萄糖标准工作溶液各 1.00 mL 于 25 mL 具塞刻度试管中(每个浓度做 3 个平行),再分别加入 2.00 mL 水和 2.00 mL DNS 试剂,振荡混匀,沸水浴加热 5 min,取出,迅速用冷水冷却至室温,用水定容至 25 mL。以试剂空白溶液调零,在 540 nm 处测定吸光度(A 值)。以吸光度 A 值为横坐标,对应标准葡萄糖溶液含糖的毫克数为纵坐标,绘制标准曲线。每次新配置 DNS 试剂均需要重新绘制标准曲线。

7.2 试样溶液的制备

7.2.1 样品前处理

固态试样应粉碎或充分碾碎,过 0.25 mm 孔径筛。液态试样备用。

7.2.2 样品溶液制备

参照附录 A 中表 A.1 建议的称样量称取适量 7.2.1 处理后的固态试样,精确至 0.001 g,加入 40 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液,磁力搅拌 30 min,上离心机 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液。上清液再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液做二次稀释,使稀释后的待测酶液的酶活控制在 0.04 U/g~0.18 U/g 之间。如果稀释后酶液的 pH 偏离 5.50,应用乙酸溶液或乙酸钠溶液调节 pH 至 5.50,再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液适当稀释并定容。

液态试样直接用乙酸-乙酸钠缓冲溶液进行稀释、定容,稀释后的待测酶液的酶活控制在 0.04 U/g~0.18 U/g 之间。如果稀释后酶液的 pH 偏离 5.50,应用乙酸溶液或乙酸钠溶液调节 pH 至 5.50,再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液适当稀释并定容。

7.3 酶活性测定

7.3.1 移取 10 mL 经过适当稀释的待测酶液,37 °C 平衡 10 min。

7.3.2 在 25 mL 具塞比色管中加入滤纸片。滤纸片均匀剪成 32 片并全部放入,加 1.00 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液浸润滤纸片,37 °C 水浴平衡 10 min。再依次加入 2.00 mL DNS 试剂、0.50 mL 待测酶液和 5.00 mL 水,振荡 3 s~5 s,37 °C 水浴保温 60 min,然后沸水浴煮沸 5 min,取出,迅速用冷水冷却至室温,加水定容至 25 mL,以试剂空白溶液调零,在 540 nm 处测定样品空白溶液吸光度(A_0)。

7.3.3 在 25 mL 具塞比色管中加入滤纸片。滤纸片应对称剪成 32 片并全部放入,加 1.00 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液浸润滤纸片,37 °C 水浴平衡 10 min。再依次加入 0.50 mL 待测酶液和 5.00 mL 水,振荡 3 s~5 s,37 °C 水浴保温 60 min,加入 2.00 mL DNS 试剂,振荡 3 s,以终止酶解反应。沸水浴加热 5 min,取出,迅速用冷水冷却至室温,加水定容至 25 mL,以试剂空白溶液调零,在 540 nm 处测定样品管中样液的吸光度(A),通过线性回归方程计算滤纸非淀粉多糖水解酶活力。

8 结果计算

按式(1)计算:

$$X = \frac{m}{M \times t} \times 1\,000 \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试样滤纸非淀粉多糖水解酶活力(U/g);

- m ——根据标准曲线方程上计算得的 $(A_1 - A_0)$ 值对应的葡萄糖的质量,单位为毫克(mg);
- M ——葡萄糖的摩尔质量($M = 180.2\text{ g/mol}$);
- t ——酶解反应时间($t = 60\text{ min}$);
- n ——试样的总稀释倍数;
- 1 000——单位换算系数, $1\text{ mmol} = 1\,000\text{ }\mu\text{mol}$ 。

以平行样的平均值为最终非淀粉多糖水解酶活力值,计算结果保留三位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下,两次独立测定结果绝对值差值不得超过其算数平均值的 10%。

附 录 A
(资料性附录)

样品酶活力与建议称取量对应关系

样品酶活力与建议称取量对应关系见表 A.1。

表 A.1 样品酶活力与建议称取量对应关系

非淀粉多糖水解酶活力/(U/g)	称取量/g(或 mL)
>2 000	0.1~0.2
500~2 000	0.2~0.5
200~500	0.5~1.0
50~200	1.0~2.0
10~50	2.0~5.0
1~10	5.0~10.0