

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4362—2023

## 饲料添加剂 角蛋白酶活力的测定 分光光度法

Feed additives—Determination of keratinase activity—  
Spectrophotometric method

2023-04-11 发布

中华人民共和国农业农村部 发布





## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院饲料研究所、山东隆科特酶制剂有限公司、福建傲农生物科技集团股份有限公司、广州立达尔生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：丁宏标、钱娟娟、侯玉煌、周盛昌、陶正国、李习龙、刘胜利。





# 饲料添加剂 角蛋白酶活力的测定

## 分光光度法

### 1 范围

本文件描述了饲料添加剂角蛋白酶活力的分光光度测定方法。

本文件适用于饲料添加剂角蛋白酶产品中酶活力的测定。

本文件的方法定量限为 100 U/g(U/mL)。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 5009.5—2006 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**角蛋白酶** **keratinase**

产自地衣芽孢杆菌,可以降解羽毛等动植物角蛋白生成氨基酸或肽类的蛋白酶。

#### 3.2

**角蛋白酶活力单位** **keratinase activity unit**

在 40 ℃、pH 8.0 的条件下,水解酪蛋白,每分钟产生 1 μg 的酪氨酸的酶量为一个酶活力单位。

注:单位为 U。

### 4 原理

在一定的温度和 pH 条件下,角蛋白酶水解酪蛋白底物产生含有酚基和吡啶基的氨基酸,用三氯乙酸沉淀后,在碱性条件下,将福林试剂还原,生成磷钨钼酸,在 680 nm 有最大吸收,其颜色的深浅与酚基氨基酸含量成正比。采用分光光度法测定反应液吸光值,计算角蛋白酶活力。

### 5 试剂或材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,三级。

5.2 碳酸钠溶液(0.4 mol/L):称取无水碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )42.4 g,用水溶解并定容至 1 000 mL,混匀。

5.3 三氯乙酸溶液(0.4 mol/L):称取三氯乙酸 65.4 g,用水溶解并定容至 1 000 mL,混匀。

5.4 盐酸溶液(1 mol/L):取浓盐酸 85 mL,加水稀释并定容至 1 000 mL,混匀。

5.5 盐酸溶液(0.1 mol/L):取 10 mL 1 mol/L 盐酸溶液(5.4),定容至 100 mL,混匀。

5.6 氢氧化钠溶液(0.5 mol/L):取氢氧化钠 20.0 g,用水溶解,冷却至室温后定容至 1 000 mL,混匀。

5.7 福林(Folin)试剂:于 2 000 mL 磨口回流装置中加入钨酸钠( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )100.0 g、钼酸钠( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )25.0 g、水 700 mL、85%磷酸 50 mL、浓盐酸 100 mL。小火沸腾回流 10 h,取下回流

冷却器,在通风橱中加入硫酸锂 50 g、水 50 mL 和数滴浓溴水(99%),再煮沸 15 min,以除去多余的溴(冷却后仍有绿色需再加溴水,再煮沸除去过量的溴),冷却后加水定容至 1 000 mL。混匀、过滤。试剂应呈金黄色,储存于棕色瓶内。或购买市售的福林试剂。

5.8 福林工作溶液:以 1 份福林试剂与 2 份水混匀。

5.9 硼酸钠溶液:称取 3.80 g 硼酸钠(硼砂),加水溶解并定容至 1 000 mL,混匀。

5.10 硼酸溶液:称取 12.37 g 硼酸,加水溶解并定容至 1 000 mL,混匀。

5.11 硼酸缓冲溶液(pH 8.0):取 50 mL 硼酸钠溶液(5.9),用硼酸溶液(5.10)将 pH 调至  $8.0 \pm 0.05$ ,备用。

5.12 1.0%酪蛋白溶液(pH 8.0):准确称取酪蛋白(CAS 号:60-18-4,上海国药 69006227 或阿拉丁 C110500<sup>1)</sup>)1 g,精确至 0.001 g,先用少量 0.5 mL 氢氧化钠溶液(5.6)湿润后,再加入 pH 8.0 硼酸缓冲溶液(5.11)约 80 mL,在沸水浴中或磁力搅拌器上边加热边搅拌直至完全溶解。冷却后,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.5)或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(5.6),将 pH 调至  $8.0 \pm 0.05$ ,并转入 100 mL 容量瓶中,用 pH 8.0 硼酸缓冲溶液(5.11)定容至刻度。2℃~8℃储存,有效期为 3 d。

5.13 L-酪氨酸标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取预先于 105℃干燥 4 h 烘至恒重的 L-酪氨酸标准物质(CAS 号:60-18-4,纯度 $\geq 99\%$ )0.1 g,精确至 0.000 1 g,用 20 mL 1 mol/L 盐酸溶液(5.4)溶解后,再用水定容至 100 mL,混匀。2℃~8℃储存,有效期为 3 d。

5.14 L-酪氨酸标准工作溶液(100  $\mu\text{g/mL}$ ):准确吸取 10 mL 1 mg/mL L-酪氨酸标准储备溶液(5.13),用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.5)定容至 100 mL,混匀。临用现配。

5.15 L-酪氨酸标准系列溶液:分别准确吸取 0 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL 的 L-酪氨酸标准工作溶液(5.14)于试管中,依次准确加入 10 mL、9 mL、8 mL、7 mL、6 mL、5 mL、4 mL 的水,配制浓度分别为 0  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、30  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、60  $\mu\text{g/mL}$  的 L-酪氨酸标准系列溶液。临用现配。

## 6 仪器设备

6.1 分光光度计:波长范围为 350 nm~800 nm,精度为 $\pm 2$  nm。

6.2 pH 计:精度为 $\pm 0.01$ 。

6.3 天平:精度为 0.000 1 g 和 0.01 g。

6.4 水浴锅:精度为 $\pm 0.2$ ℃。

## 7 样品

按照 GB/T 20195 的规定制备样品,至少 200 g(或 200 mL),固态样品粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛。充分混匀,装入磨口瓶中,密闭保存,备用。

## 8 试验步骤

### 8.1 角蛋白酶鉴别

角蛋白酶鉴别试验应符合附录 A 的规定。

### 8.2 试样溶液的制备

#### 8.2.1 固态试样的制备

平行做 2 份试验。准确称取试样 1 g,精确至 0.000 1 g。准确加入硼酸缓冲溶液(5.11)100 mL,  $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$  磁力搅拌提取 30 min,摇匀,静置 5 min 后,取适量上清液,用硼酸缓冲液(5.11)稀释,使稀释后的待测酶液中角蛋白酶活力控制在 10 U/mL~15 U/mL。

1) 上海国药 69006227 或阿拉丁 C110500 是商品名,给出这一信息是为了给本文件的使用者一个相对标准,并不表示对该产品的认可。如果其他产品能有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

### 8.2.2 液态试样的制备

平行做 2 份试验。准确吸取试样 1 mL,用硼酸缓冲溶液(5.11)定容至 100 mL,摇匀。吸取适量溶液用硼酸缓冲溶液(5.11)稀释,稀释后的待测酶液中角蛋白酶活力控制在 10 U/mL~15 U/mL。

### 8.3 L-酪氨酸标准曲线的绘制

分别准确吸取 L-酪氨酸标准系列溶液(5.15)各 1 mL,于具塞试管中(每个浓度做 2 个平行),分别加入 5.0 mL 碳酸钠溶液(5.2)和 1.0 mL 福林工作溶液(5.8),摇匀。置于 $(40\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ 水浴中显色 20 min,取出,置于冷水中,迅速冷却至室温,用 10 mm 比色皿,以不含酪氨酸的 0 管为空白,在分光光度计波长 680 nm 处分别测定其吸光度。以吸光度为横坐标、L-酪氨酸浓度为纵坐标绘制标准工作曲线,标准曲线的相关系数  $R^2$  不低于 0.99。

利用标准曲线,计算出当吸光度为 1 时的 L-酪氨酸的量( $\mu\text{g}$ ),即为吸光常数  $K$  值。 $K$  值应在 95~105 范围内;反之,需重新配制试剂,进行试验。

注:L-酪氨酸标准稀释溶液应在配制后立即进行测定。

### 8.4 试样溶液测定

#### 8.4.1 试样空白溶液的测定

吸取 1.00 mL 稀释好的酶液(8.2)置于 10 mL 试管中, $(40\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min。加入 2.00 mL 三氯乙酸溶液(5.3),混匀, $(40\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。加入 1.00 mL 预热的酪蛋白溶液(5.12),混匀。

#### 8.4.2 试样溶液的测定

吸取 1.00 mL 稀释好的酶液(8.2)置于 10 mL 试管中, $(40\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min。加入 1.00 mL 预热的酪蛋白溶液(5.12),混匀, $(40\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。加入 2.00 mL 三氯乙酸溶液(5.3),混匀。

#### 8.4.3 显色反应

将混匀后的试样空白溶液(8.4.1)与试样溶液(8.4.2)分别置于室温下静置 10 min,用滤纸过滤。分别取 1.00 mL 滤液,加入 5.00 mL 碳酸钠溶液(5.2)、1.00 mL 福林工作溶液(5.8), $(40\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min 显色。冷却至室温后,于 680 nm 波长下,用 10 mm 比色皿分别测定空白吸光度( $A_0$ )与试样吸光度( $A$ )。

## 9 试验数据处理

试样中角蛋白酶活力以  $X$  计,数值以酶活单位每克(U/g)或酶活单位每毫升(U/mL)表示,按公式(1)计算。

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times 4 \times n}{m \times 10} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\rho$  ——根据试样吸光度  $A$  由标准曲线计算出的试样溶液中 L-酪氨酸浓度的数值,单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ );

$\rho_0$  ——根据空白吸光度  $A_0$  由标准曲线计算出的空白溶液中 L-酪氨酸浓度的数值,单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ );

$n$  ——试样的稀释倍数;

4 ——酶反应体系总体积的数值,单位为毫升(mL);

$m$  ——称取或吸取试样量的数值,单位为克或毫升(g 或 mL);

10 ——反应时间的数值,单位为分钟(min)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,计算结果保留至整数。

## 10 精密度

在重复性条件下,获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不大于其算术平均值的 10%。

附 录 A  
(规范性)  
角蛋白酶鉴别试验

### A.1 原理

角蛋白酶作用于不溶于水的羽毛粉生产可溶于水的氨基酸或肽类物质,经与同规格的中性蛋白酶、碱性蛋白酶进行羽毛粉降解后的比对,通过凯氏定氮法对溶液中的氮含量进行比较,可定性判定是否为角蛋白酶。

### A.2 试剂或材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂。

A.2.1 水:GB/T 6682,三级。

A.2.2 硼酸钠溶液:称取 3.80 g 硼酸钠(硼砂),加水溶解并定容至 1 000 mL,混匀。

A.2.3 硼酸溶液:称取 12.37 g 硼酸,加水溶解并定容至 1 000 mL,混匀。

A.2.4 硼酸缓冲溶液(pH 8.0):取 50 mL 硼酸钠溶液(A.2.2),用硼酸溶液(A.2.3)将 pH 调至  $8.0 \pm 0.05$ ,备用。

A.2.5 羽毛粉:收集家禽羽毛,蒸馏水清洗干净,用 70% 的乙醇浸泡 1 h 后,105 ℃干燥 4 h 烘至恒重,用粉碎机粉碎 1 min,待用。

A.2.6 角蛋白酶稀释液:称取角蛋白酶 0.1 g~1 g,精确至 0.000 1 g,加入硼酸缓冲溶液(A.2.4)稀释至 10 000 U/mL。如角蛋白酶为液体试样,吸取 0.1 mL~1.0 mL 稀释至 10 000 U/mL,待用。

A.2.7 碱性蛋白酶稀释液:称取碱性蛋白酶 0.1 g~1 g,精确至 0.000 1 g,加入硼酸缓冲溶液(A.2.4)稀释至 10 000 U/mL。如碱性蛋白酶为液体试样,吸取 0.1 mL~1.0 mL 稀释至 10 000 U/mL,待用。

A.2.8 中性蛋白酶稀释液:称取中性蛋白酶 0.1 g~1 g,精确至 0.000 1 g,加入硼酸缓冲溶液(A.2.4)稀释至 10 000 U/mL。如中性蛋白酶为液体试样,吸取 0.1 mL~1.0 mL 稀释至 10 000 U/mL,待用。

### A.3 仪器设备

A.3.1 恒温水浴:精度为  $\pm 0.2$  ℃。

A.3.2 恒温干燥箱:精度为  $\pm 1$  ℃。

A.3.3 万能粉碎机:25 000 r/min。

A.3.4 具塞比色管:25 mL。

### A.4 试验步骤

#### A.4.1 羽毛粉降解

分别准确称取 0.10 g 羽毛粉于 3 个 25 mL 的具塞比色管中,分别向 3 个比色管中加入 10 000 U/mL 的角蛋白酶稀释液(A.2.6)20 mL、碱性蛋白酶稀释液(A.2.7)20 mL、中性蛋白酶稀释液(A.2.8)20 mL,摇匀后置于 40 ℃水浴中反应 24 h。

24h 后取出 3 个具塞比色管,用定性滤纸过滤,分别取滤液 2.0 mL 分别进行蛋白质含量测定。测定结果分别为  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 。

注:当角蛋白酶样品活力  $< 50\,000$  U/g 时,可以适当增大稀释倍数,角蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶可稀释至 1 000 U/mL~10 000 U/mL 进行鉴别对比。



#### A.4.2 蛋白质含量测定

按 GB 5009.5—2016 第一法的规定执行。

#### A.5 结果分析

当蛋白质含量  $C_1 > C_2$  且  $C_1 > C_3$  时,则判定为角蛋白酶;否则,为非角蛋白酶。

---