

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4361—2023

## 饲料添加剂 $\alpha$ -半乳糖苷酶活力的 测定 分光光度法

Feed additives—Determination of  $\alpha$ -galactosidase 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：武汉新华扬生物股份有限公司、全国畜牧总站。

本文件主要起草人：詹志春、栗胜兰、徐丽、周樱、苏丹、陈雪姣、邓晓旭、程瑛。





# 饲料添加剂 $\alpha$ -半乳糖苷酶活力的测定

## 分光光度法

### 1 范围

本文件描述了饲料添加剂  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力的分光光度测定方法。

本文件适用于饲料添加剂  $\alpha$ -半乳糖苷酶及其混合型饲料添加剂酶制剂中  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力的测定。

本文件的定量限为 10 U/g(或 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/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

**$\alpha$ -半乳糖苷酶活力单位  $\alpha$ -galactosidase activity unit**

在 37 °C、pH 5.5 的条件下,每分钟从浓度为 5 mmol/L 的对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷溶液中释放 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。

注:酶活力单位为 U。

### 4 原理

在一定温度和 pH 条件下, $\alpha$ -半乳糖苷酶分解对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷为  $\alpha$ -D-吡喃半乳糖和对硝基苯酚。对硝基苯酚在碳酸钠溶液中呈黄色,反应液的吸光值与酶解产生的对硝基苯酚的量成正比,采用分光光度法测定反应液吸光值,计算  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力。

### 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(0.2 mol/L):称取 21.20 g 无水碳酸钠,加水溶解,定容至 1 000 mL。

5.3 乙酸溶液(0.1 mol/L):吸取冰乙酸 0.60 mL,加水定容至 100 mL,摇匀。

5.4 乙酸钠溶液(0.1 mol/L):称取无水乙酸钠 0.82 g,加水溶解,定容至 100 mL。

5.5 乙酸-乙酸钠缓冲液(0.1 mol/L):称取无水乙酸钠 8.2 g,加水约 900 mL 溶解,用乙酸溶液(5.3)或乙酸钠溶液(5.4)调节 pH 至 5.50 $\pm$ 0.01,定容至 1 000 mL。

5.6 对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷溶液(10 mmol/L):称取对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷(化学式  $C_{12}H_{15}NO_8$ ,相对分子质量 301.25,纯度 99%,Sigma N0877 或上海扶生 M32139<sup>1)</sup>)0.301 g,用 80 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(5.5)溶解,定容至 100 mL。-18 °C 避光保存,有效期 2 个月。

5.7 对硝基苯酚标准储备溶液(20  $\mu$ mol/mL):准确称取对硝基苯酚 0.139 g,加入 40 mL 碳酸钠溶液

1) Sigma N0877 和上海扶生 M32139 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。

(5.2),溶解,定容至 50 mL,临用现配。

5.8 对硝基苯酚标准溶液(1  $\mu\text{mol/mL}$ ):吸取对硝基苯酚标准储备溶液(5.7)5 mL,用碳酸钠溶液(5.2)稀释定容至 100 mL,临用现配。

6 仪器设备

6.1 紫外可见分光光度计:波长准确度为 $\pm 1\text{ nm}$ ,可在 400 nm 处比色。

6.2 分析天平:精度为 0.000 1 g。

6.3 pH 计:精确至 0.01。

6.4 涡旋混合器。

6.5 恒温振荡器:精度为 1.0  $^{\circ}\text{C}$ 。

6.6 恒温水浴锅:精度为 0.1  $^{\circ}\text{C}$ 。

6.7 秒表。

6.8 恒温磁力搅拌器。

6.9 离心机:转速在 4 000 r/min 以上。

7 样品

按照 GB/T 20195 的规定制备样品,至少 200 g(或 200 mL),固态样品应全部通过 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 标准曲线绘制

取 10 mL 试管按表 1 加入相关溶液(每个浓度 2 个平行),混合,静止显色 5 min,以 0 号试管试液作为标准空白溶液,在 400 nm 波长下测定其他试管的吸光度。以对硝基苯酚的量为 Y 轴、吸光度为 X 轴,绘制标准曲线, $R^2$  达到 0.99 以上。

表 1 标准曲线的制作

试管号	0	1	2	3	4	5	6	7
对硝基苯酚标准溶液, $\mu\text{L}$	0	30	60	90	120	150	180	210
乙酸-乙酸钠缓冲液, $\mu\text{L}$	1 000	970	940	910	880	850	820	790
碳酸钠溶液,mL	4	4	4	4	4	4	4	4
对硝基苯酚的量, $\mu\text{mol}$	0	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15	0.18	0.21

8.2 试样溶液的制备

8.2.1 固态试样溶液的制备

平行做 2 份试验。称取 0.2 g~1 g 试样,精确至 0.000 1 g,置于锥形瓶中,准确加入 100 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(5.5)。置于(25 $\pm$ 3) $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器或恒温磁力搅拌器中提取,不低于 140 r/min 振荡或搅拌 30 min,静置 10 min,离心或过滤,取上清液或滤液,用乙酸-乙酸钠缓冲液(5.5)进行稀释,稀释后待测酶液中  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力控制在 0.012 U/mL~0.03 U/mL。

8.2.2 液态试样溶液的制备

平行做 2 份试验。移取 0.2 mL~1 mL 试样,用乙酸-乙酸钠缓冲液(5.5)进行稀释、定容,稀释后的待测酶液中  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力控制在 0.012 U/mL~0.03 U/mL。如果稀释后酶液的 pH 偏离 5.50,应用乙酸溶液(5.3)或乙酸钠溶液(5.4)调整校正 pH 至 5.50,再用乙酸-乙酸钠缓冲液(5.5)适当稀释并定容。

8.3 测定

吸取试样溶液 0.50 mL,置于 10 mL 试管中,37  $^{\circ}\text{C}$  平衡 5 min。加碳酸钠溶液(5.2)4.0 mL,涡旋

3 s, 37 ℃保温 10 min, 加入经 37 ℃平衡的对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷(5.6) 0.50 mL, 混匀。显色 5 min。以标准空白溶液(8.1)为空白对照, 在 400 nm 波长处测定吸光度, 计为  $A_0$ 。

吸取试样溶液 0.50 mL, 置于 10 mL 试管中, 37 ℃平衡 5 min。加入经 37 ℃平衡的对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷溶液(5.6) 0.50 mL, 涡旋 3 s, 37 ℃保温 10 min, 加碳酸钠溶液(5.2) 4.0 mL, 以终止酶解反应, 显色 5 min。以标准空白溶液(8.1)为空白对照, 在 400 nm 波长处测定吸光度, 计为  $A$ ,  $A - A_0$  为试样实测吸光值。通过标准曲线计算 α-半乳糖苷酶的活力。

9 试验数据处理

试样中 α-半乳糖苷酶活力以  $X$  表示, 数值以酶活力单位每克(U/g)或酶活力单位每毫升(U/mL)表示。按公式(1)计算。

$$X = \frac{n}{m \times 10 \times 0.5} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $X$  —— 试样中 α-半乳糖苷酶活力的数值, 单位为酶活力单位每克(U/g)或酶活力单位每毫升(U/mL);
- $n$  —— 根据试样实测吸光值由标准曲线计算出的对硝基苯酚量的数值, 单位为微摩尔( $\mu\text{mol}$ );
- $f$  —— 试样的稀释倍数;
- $m$  —— 试样质量或体积的数值, 单位为克(g)或毫升(mL);
- 10 —— 反应时间的数值, 单位为分钟(min);
- 0.5 —— 反应加入的酶液体积的数值, 单位为毫升(mL)。

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, 2 次独立测定结果绝对差值不超过其算术平均值的 10%。

\_\_\_\_\_