

DB41

河南省地方标准

DB 41/T 1615—2018

食用菌菌丝纤维素酶、木聚糖酶、漆酶、蛋白酶活力检测技术规程

2018-06-19 发布

2018-09-19 实施

河南省质量技术监督局 发布

河南省地方标准公共服务平台

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由河南省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：河南省农业科学院植物营养与资源环境研究所。

本标准主要起草人：孔维丽、康源春、袁瑞奇、孔维威、张玉亭、胡素娟、刘彦。

本标准参加起草人：段亚魁、宋志波、徐柯、崔筱、孟庆涛、韩玉娥。

河南省地方标准公共服务平台

河南省地方标准公共服务平台

食用菌菌丝纤维素酶、木聚糖酶、漆酶、蛋白酶活力检测技术规程

1 范围

本标准规定了检测食用菌菌丝羧甲基纤维素酶、木聚糖酶、漆酶、蛋白酶活力的方法。

本标准适用于食用菌菌丝培养过程中羧甲基纤维素酶、木聚糖酶、漆酶、蛋白酶活力的定性检测。

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 601—2016 化学试剂 标准滴定溶液的制备
- GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 9721—2006 化学试剂 分子吸收分光光度法通则（紫外和可见光部分）
- GB/T 12728—2006 食用菌术语
- GBT 23874—2009 饲料添加剂 木聚糖酶活力的测定
- GB/T 28715—2012 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定 分光光度法
- NY/T 912—2004 饲料添加剂 纤维素酶活力的测定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

羧甲基纤维素酶（CMC）活力单位

在 37 ℃，pH 值为 5.5，每分钟从浓度为 0.8% 的羧甲基纤维素钠溶液中水解产生 1 mmol 葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

3.2

木聚糖酶活力单位

在 37 ℃，pH 值为 5.5，每分钟从浓度 5 mg/mL 的木聚糖溶液中水解产生 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活单位（U）。

3.3

蛋白酶活力单位

在 40 ℃，相应 pH 值（中性蛋白酶 pH 值=7.5，酸性蛋白酶 pH 值=3，碱性蛋白酶 pH 值=13）1 min 水解酪素产生 1 μg 酪氨酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

3.4

漆酶活力单位

在室温（25 ℃~30 ℃），pH 值为 5（0.08 mol/L 醋酸钠缓冲液）条件下，每秒钟氧化 1 mmol 的 0.5 mmol/L 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑-6-磺酸（ABTS），所需的酶量为 1 个酶活力单位（U）。

4 仪器与设备

分光光度计, 波长 350 nm~800 nm;
pH 计: 精度为 0.01 pH 单位;
分析天平: 精确至 0.0001 g 和 0.01 g;
数显恒温水浴锅: 精度为 ± 0.1 °C;
磁力搅拌器: 温度范围 5 °C~200 °C;
移液器: 500 μ L~1000 μ L;
冰箱: 0 °C~20 °C.

5 试剂与溶液

5.1 试剂与水

所用试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

5.2 羧甲基纤维素酶 (CMC) 测定试剂与溶液

按 NY/T 912—2004 中 5.1、5.2、5.3、5.4、5.4、5.6、5.7 的规定配制。

5.3 木聚糖酶测定试剂与溶液

按 GB/T 23874—2009 中 4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7 的规定配制。

5.4 蛋白酶测定试剂与溶液

5.4.1 碳酸钠溶液 (Na_2CO_3) 0.4 mol/L

称取无水碳酸钠 (Na_2CO_3) 42.4 g, 用水溶解并定容至 1000 mL。

5.4.2 三氯乙酸 ($\text{CCl}_3\cdot\text{COOH}$) 0.4 mol/L

称取三氯乙酸 65.4 g, 用水溶解并定容至 1000 mL。

5.4.3 氢氧化钠溶液 (NaOH) 0.5 mol/L

按 GB/T 601—2016 的规定配制。

5.4.4 盐酸溶液 (HCl) 1 mol/L 及 0.1 mol/L

按 GB/T 601—2016 的规定制备配制。

5.4.5 磷酸缓冲液

称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 6.02 g 和磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.50 g, 加水溶解并定容至 1000 mL, 用 pH 计校正至 pH=7.50。

5.4.6 乳酸缓冲液

甲液: 称取乳酸 (80%~90%) 10.60 g, 加水溶解并定容至 1000 mL。

乙液: 称取乳酸钠 (70%) 16.0 g, 加水溶解并定容至 1000 mL。使用溶液取甲液 8 mL, 加乙液 1 mL, 混匀, 稀释一倍, 即成 0.05 mol/L 乳酸缓冲溶液, 用 pH 计校正至 pH=3.00。

5.4.7 硼酸缓冲溶液

甲液:称取硼酸钠(硼砂)19.08 g,加水溶解并定容至1000 mL。

乙液:称取氢氧化钠4.00 g,加水溶解并定容至1000 mL。

取甲液500 mL、乙液400 mL混匀,用水稀释至1000 mL,用pH计校正至pH=10.5。

5.4.8 10 g/L 酪素溶液

称取酪素1.000 g,精确至0.001 g,用少量0.5 mol/L氢氧化钠溶液(若酸性蛋白酶则用浓乳酸2~3滴)湿润后,加入适量的各种适宜pH的缓冲溶液约80 mL,在沸水浴中边加热边搅拌,直至完全溶解,冷却后,转入100 mL容量瓶中,用适宜的pH缓冲溶液稀释至刻度。此溶液在冰箱内贮存,有效期为三天。

5.4.9 100 μg/mL L-酪氨酸标准溶液

称取预先于105 °C干燥至恒重的L-酪氨酸0.1000 g,精确至0.0002 g,用1 mol/L盐酸60 mL溶解后定容至100 mL,即为1 mg/mL酪氨酸标准溶液。吸取1mg/mL酪氨酸标准溶液10.00 mL,用0.1 mol/L盐酸定容至100mL,即得到100 μg/mL的L-酪氨酸标准溶液。

5.5 漆酶测定试剂与溶液

5.5.1 乙酸溶液(1 mol/L)

冰乙酸0.6 mL,加水溶解,定容至100 mL。

5.5.2 乙酸钠溶液(1 mol/L)

称取无水乙酸钠82.0g,加水溶解,定容至1000 mL。

5.5.3 乙酸-乙酸钠缓冲液

称取无水乙酸钠8.2 g,加入冰乙酸0.95 mL,加水溶解,定容至1000 mL。用乙酸溶液或乙酸钠溶液调节pH=5。

5.5.4 0.5 mmol/L ABTS 溶液

称取0.2720 g ABTS试剂,加水溶解,定容至100 mL,随用随配。

6 绘制标准曲线

6.1 CMC 活力标准曲线

按NY/T 912—2004 中第7章的规定绘制标准曲线。

6.2 木聚糖酶活力标准曲线

按GBT 23974—2003 中第6条的规定绘制标准曲线。

6.3 蛋白酶活力标准曲线

按照表1配制不同浓度的L-酪氨酸标准溶液,以标准空白样为对照调零,于275 nm处测定其吸光度值A,以L-酪氨酸浓度为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线或。根据作图或回归方程计算出当吸光度为1时酪氨酸的量(μg),即为吸光常数K(K值应在130~135)。

表1 检测方法步骤

管号	取100 ug/mL络氨酸标准溶液体积/mL	水体积/mL	络氨酸标准溶液浓度/(ug/mL)
0	0	10	0
1	1	9	10
2	2	8	20
3	3	7	30
4	4	6	40
5	5	5	50

6.4 漆酶活力标准曲线

按照表2配制不同浓度的ABTS标准溶液浓度，以空白标准样为对照调零，于波长420 nm处测定其吸光度值，以ABTS溶液浓度为横坐标，以吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

表2 ABTS 溶液标准溶液的配制

管号	ABTS试剂重量/mg	水体积/mL	ABTS标准溶液浓度/(mmol/L)
0	0	100	0.0
1	5.4868	100	0.1
2	10.9736	100	0.2
3	16.4604	100	0.3
4	21.947	100	0.4
5	27.434	100	0.5
6	32.9208	100	0.6

7 酶活力的测试

7.1 样品的制备

液体培养液采用2层纱布过滤取上清液，得到待测酶液。固体原料粉碎，称量50 g，加5倍重量去离子水于三角瓶内，重复3份，25℃浸提3 h，间隔1 h振荡，2层纱布过滤取上清液，得到待测酶液。

7.2 CMC 活力的测定

7.2.1 酶液的稀释

待测培养液用缓冲液稀释10~25倍，测定的OD值为0.5~0.6为宜。

7.2.2 测定方法

按NY/T 912—2004中第9章操作。

7.3 木聚糖酶活力的测定

7.3.1 酶液的稀释

按7.2.1的规定操作。

7.3.2 测定步骤

按GB/T 23874—2009 中第8章的规定操作。

7.4 蛋白酶活性的测定

7.4.1 酶液的稀释

待测培养液用缓冲液稀释10~50倍，测定的OD值介于0.5~0.6为宜。

7.4.2 测定步骤

取3支具塞试管，一支为空白管，两支为样品管，按表3的测定方法及步骤操作，反应结束后，在分光光度计波长275 nm处，分别测定样品空白管和样品管中酶液的吸光度值(A₂₇₅)。

表3 测定方法及步骤

序号	反应步骤	样品管	空白管
1	加入待测酶液	1.0 mL	1.0 mL (水)
2	预热2 min		√
3	反应底物预热3 min	√	√
4	加入底物溶液	1.0 mL	1.0 mL
5	混匀	√	√
6	40℃反应10 min	√	√
7	加入三氯乙酸终止液	2.0 mL	2.0 mL
8	混匀	√	√
9	静止10 min	√	√
10	过滤	√	√
	总体积	4.0 mL	4.0 mL

注：表中√表示此步骤需要进行。

7.4.3 结果计算与表示

样品中蛋白酶活力以U表示，按式1计算：

$$U = (A - A_0) \times K \times 4 / 10 \times N \times T \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

U——蛋白酶活力，酶活单位 (U/g) 或 (U/mL)；

A——为吸光度值；

K——为吸光常数，当吸光度值为1时的酪氨酸的量=103.8；

4——反应体积，单位mL；

N——稀释倍数；

10——反应时间，单位min

T——换算系数，中性、碱性蛋白酶与福林法的转换系数0.5，酸性蛋白酶系数0.77。

7.5 漆酶活力的测定

7.5.1 酶液的稀释

待测培养液用缓冲液稀释10~50倍，测定的OD值在0.5~0.6之间为宜。

7.5.2 测定步骤

取3支具塞试管，一支为空白管，两支为样品管，按表4的测定方法及步骤操作，反应结束后，在分光光度计波长420 nm处，分别测定样品空白管和样品管中酶液的吸光度值（ A_0 、 A ）。

表4 测定方法及步骤

序号	反应顺序	样品管	空白管
1	加入待测酶液	0.1 mL	(1 mL (水))
2	加入缓冲液	1.7 mL	1.7 mL
3	加入底物溶液	0.2 mL	0.2 mL
4	反应时间	6.0 min	6.0 min
5	加入三氯乙酸	0.5 mL	0.5 mL
	总体积	2.5 mL	2.5 mL

7.5.3 结果计算与表示

样品中漆酶活力以U表示，按式2计算：

$$U = (A - A_0) / MT \times 1000 \times D \times 60 \quad \dots \dots \dots (2)$$

式中：

U——漆酶活力单位，酶活单位（U/g）或（U/mL）；

A——粗酶液的吸光度值；

1000——mmol 与 umol 的换算系数，1 mmol=1000 umol；

D——稀释倍数；

M——ABTS 分子量，M=548.68；

T——反应时间，单位 min；

60——换算系数，1 min=60 s。