

NY

中华人民共和国农业行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

饲料添加剂 α -半乳糖苷酶活力的测定
分光光度法

Feed additives Determination of α -galactosidase activity
—Spectrophotometric method

公开征求意见稿

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

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。

本文件由中华人民共和国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、中国饲料工业协会。

本文件主要起草人：

饲料添加剂 α -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 α -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 α -半乳糖苷酶及其复合酶中 α -半乳糖苷酶活力的测定。

本文件的定量限为 10 U/g。

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

α -半乳糖苷酶活力单位 α -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- α -D-吡喃半乳糖苷溶液中释放 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量，以 U 表示。

4 原理

在一定温度和 pH 条件下， α -半乳糖苷酶降解对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷为 α -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 α -半乳糖苷酶活力。

5 试剂或材料

5.1 水：符合 GB/T 6682 中三级水的规定。

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 1000 mL。

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

5.4 乙酸钠溶液（0.1 mol/L）：称取无水乙酸钠 0.82 g，加水搅拌溶解，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 搅拌溶解，用乙酸溶液（5.3）或乙酸钠溶液（5.4）调节 pH 值至 5.50±0.01，定容至 1000 mL。

5.6 对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷溶液（10 mmol/L）：称取对硝基苯基- α -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 M32139¹⁾）0.301 g，用 80 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液（5.5）搅拌溶解，定容至 100 mL。-18°C 冷冻避光保存，有效期 2 个月。

5.7 对硝基苯酚标准储备液（20 μ mol/mL）：准确称取对硝基苯酚 0.139 g，加入 40 mL 碳酸钠溶液（5.2），搅拌溶解，定容至 50 mL，现配现用。

5.8 对硝基苯酚标准溶液（1 μ mol/mL）：吸取对硝基苯酚标准溶液（5.7）5 mL，用碳酸钠溶液（5.2）稀释定容至 100 mL，现配现用。

6 仪器设备

6.1 紫外可见分光光度计：波长准确度 ± 1 nm，可在 400 nm 处比色。

6.2 分析天平：精度 0.0001 g。

6.3 pH 计：精确至 0.01。

6.4 涡旋混合器。

6.5 恒温振荡器：精确至 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

6.6 恒温水浴锅：精确至 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。

6.7 秒表。

6.8 恒温磁力搅拌器。

6.9 离心机：转速 4000 r/min 以上。

7 样品

按照 GB/T 20195 制备样品，粉碎后全部通过 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 0.995 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(μ L)	0	30	60	90	120	150	180	210
乙酸-乙酸钠缓冲液(μ L)	1000	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(μ mol)	0	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15	0.18	0.21

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。

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 0.2g~1 g 试样，精确至 0.0001 g，置于锥形瓶中，加入 100 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(5.5)。置于 25℃ 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-乙酸钠缓冲溶液(5.5)进行稀释，稀释后待测酶液中 α -半乳糖苷酶活力控制在 0.012 U/mL~0.03 U/mL 之间。

8.2.2 液态试样溶液的制备

平行做 2 份试验。移取 0.2mL~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 α -半乳糖苷酶活力控制在 0.012 U/mL~0.03 U/mL 之间。如果稀释后酶液的 pH 值偏离 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

吸取适量对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷溶液(5.6)，37℃ 平衡 5 min。

吸取试样溶液 0.50 mL，置于 10 mL 试管中，37℃ 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。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，涡旋 3 s，以终止酶解反应，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 。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或酶活力单位每毫升(U/g 或 U/mL)表示。按公式(1)计算：

$$X = \frac{(A - A_0) \times K + C_0}{m \times 10 \times 0.5} \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中 α -半乳糖苷酶活力，单位为酶活力单位每克或酶活力单位每毫升(U/g 或 U/mL)；

A ——试样反应液 400 nm 处吸光值；

A_0 ——试样空白反应液 400 nm 处吸光值；

K ——标准曲线的斜率；

C_0 ——标准曲线的截距；

n ——稀释倍数；

m ——试样质量或体积，单位为克或毫升(g 或 mL)；

10 ——反应时间，单位为分钟(min)；

0.5 ——反应加入的酶液体积(mL)。

酶活力计算值保留整数。

10 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果绝对差值不超过其算术平均值的 10%。

中华人民共和国农业行业标准

《饲料添加剂 α -半乳糖苷酶活力的测定
分光光度法》编制说明

（公开征求意见稿）

承担单位：武汉新华扬生物股份有限公司

中国饲料工业协会

二零二一年十一月

目 录

一、标准制定背景及任务来源	1
(一) 任务来源	1
(二) 标准制定背景和意义	1
(三) 国内外产业状况	2
1、生产情况	2
2、 α -半乳糖苷酶检测方法	4
二、主要工作过程	6
三、标准编制原则和主要技术内容的确定	7
(一) 标准编制原则	7
(二) 主要技术内容的确定	7
1、DNS 法和对硝基苯酚法的比较	7
1.1 标准曲线	7
1.2 不同酶浓度两种方法测定结果对比	9
1.3 方法的确定	10
2、对硝基苯酚法酶促反应条件优化	11
2.1 检测原理及检测波长	11
2.2 反应温度	11
2.3 反应 pH 值	12
2.4 不同厂家底物的比较	12
2.5 底物溶液的储存条件	13
2.6 不同批次底物的稳定性	14
2.7 底物浓度	14
2.8 反应时间	15
2.9 反应酶浓度	16
2.10 提取条件	17
2.11 显色时间	18
2.12 碳酸钠浓度	19
3、对硝基苯酚法方法学验证	21
3.3 方法的检出限和定量限	22
3.3.1 仪器的检出限和定量限	23
3.3.2 方法的定量限	24
4 方法适用范围	24
四、标准中涉及专利的情况	27
五、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况	27
六、与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系	27
七、重大分歧意见的处理经过和依据	27
八、贯彻农业行业标准的要求和措施建议	28
九、废止现行有关标准的建议	28
十、其他应予说明的事项	28
附件 A:	29

一、标准制定背景及任务来源

（一）任务来源

武汉新华扬生物股份有限公司 2020 年 1 月与中国饲料工业协会签订技术服务合同，制定行业标准《饲料添加剂 α -半乳糖苷酶活力的测定 分光光度法》，项目计划号为 2019-合同-2。

（二）标准制定背景和意义

半乳糖苷酶是指一类水解含半乳糖苷键物质的酶类，如乳糖、蜜二糖、棉子糖和水苏糖等，主要分为 α -半乳糖苷酶和 β -半乳糖苷酶。 α -半乳糖苷酶（ α -D-galactosidase, α -Gal, EC 3.2.1.22）又称蜜二糖酶，属于外切糖苷酶，能水解蜜二糖、棉籽糖、水苏糖、糖鞘脂、糖蛋白等含有 α -1, 6-键结合的末端半乳糖残基类物质，在底物浓度较高时具有转半乳糖基的作用。而 β -半乳糖苷酶催化 β -半乳糖苷化合物中的 β -半乳糖苷键，两种酶催化不同构型的半乳糖苷。

α -半乳糖苷酶最初是从酵母底面发酵液提取出来的，属于糖苷水解酶第 4，第 27，第 36 和第 57 家族蛋白，它普遍存在于植物和微生物中。在植物中，如胡杏、葡萄、发芽的咖啡豆种子、椰子的胚乳、未成熟的甘蔗茎等都已分离出 α -半乳糖苷酶，其中 α -半乳糖苷酶有酸性和碱性之分，如来源于广藿香种子的 α -半乳糖苷酶显酸性，而来源于成熟黄瓜叶、小麦根、甜瓜果等的 α -半乳糖苷酶则显碱性。微生物中，已开发的 α -半乳糖苷酶主要来源于细菌、真菌、放线菌、酵母等，如细菌中的大肠杆菌、乳杆菌等，真菌中的黑曲霉、米曲霉、青酶等，放线菌中的费氏链霉菌、脆弱链霉菌等，酵母中的毕赤酵母、假丝酵母、啤酒酵母等，且来源于 *Aspergillus niger* 的 α -半乳糖苷酶已实现商业化。

饲料工业中，玉米豆粕日粮因具有高能量和高蛋白质，且来源广泛，常被用于家禽饲料，但是饲料中一些聚糖和寡糖不能被单胃动物消化而成为一种潜在的抗营养因子，其属于胀气因子，由 α -半乳糖苷引起， α -半乳糖苷由蔗糖与多个半乳糖经 α -1, 6-糖苷键连接而成长度不一的低聚糖，如棉子糖、水苏糖、毛蕊花糖等。这些化合物热稳定性非常好，在饲料加工过程不会因高温而降解，不易被动物的内源酶分解成单糖或二糖，而经消化道微生物发酵成寡糖被利用，导致代谢能值降低，动物肠道内容物粘性增加，肠道蠕动加强，同时产生二氧化碳、氧气、氢气等气体引起动物肠胃胀气、腹痛、腹泻、恶心等症状，从而降低饲料利

用率。 α -半乳糖苷酶可有效降解饲料中存在的 α -半乳糖苷等抗营养因子，降低食糜黏度，减少幼龄动物腹泻发病率；可摧毁植物细胞壁结构，促进细胞内营养物质释放，提高利用效率；节省蛋白质和合成氨基酸，提高瘦肉率；增强动物的免疫功能和抗病能力，减少饲料中抗生素的用量；减轻或避免消化器官代偿性增生和肥大，降低动物维持需要量，提高饲料能量效价；扩大饲料配方中原料使用种类，充分利用副产品等非常规饲料资源，降低配方成本等。

α -半乳糖苷酶是我国《饲料添加剂品种目录（2013）》中规定允许使用的酶制剂，但没有相应的国家标准和行业标准与之配套，缺乏统一的检测标准，各厂商的分析方法都不尽相同。并且其酶活力单位是否和厂家标识的酶活力单位一致还缺乏相关的标准进行规范约束和验证，导致市场上 α -半乳糖苷酶的质量难以监控。因此， α -半乳糖苷酶活力测定标准的建立势在必行。

（三）国内外产业状况

1、生产情况

目前国内外生产厂家大多采用液体深层发酵生产，按不同需求制成液态和固态 2 类产品，市场流通产品基本都是固态产品，未收集到液态产品，样品信息见表 1；虽暂未收集到液体产品，但多家企业均表示有市场需求及研发储备，因此方法中保留了液体样品相关部分。国内主要企业有武汉新华扬生物股份有限公司、山东隆科特酶制剂有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、潍坊康地恩生物科技有限公司、安琪酵母股份有限公司、济南百斯杰生物股份有限公司、北京听大洋科技发展有限公司、北京盛拓达生物技术有限公司、宁夏夏盛实业集团有限公司、希杰尤特尔（山东）生物科技有限公司、福建福大百特生物科技有限公司、宁波希诺亚海洋生物科技有限公司、绵阳禾本生物工程有限公司、杨氏(信丰)生物技术有限公司、四川润格生物科技有限公司、朝阳华星生物工程有限公司、云南博仕奥生物技术有限公司等。国外企业主要有诺维信，杰能科，丹尼斯克，帝斯曼，日本天野等，但国内市场中基本无这些企业生产的饲料级 α -半乳糖苷酶产品。

产品生产工艺流程：菌种培养→接种→发酵→板框过滤→浓缩→喷雾干燥→成品包装，见图 1。板框过滤后，需要生产粉状固体酶时，在发酵液中加入载体混合均匀后，经喷雾干燥塔干燥，得到粉状酶半成品，添加载体将粉状酶半成品

配制成不同酶活规格的产品，按要求计量、包装；需要生产颗粒酶时，根据终端产品的酶活要求，在喷雾干燥前一次性添加载体，然后喷雾干燥制得颗粒酶成品，然后按要求计量、包装。

表 1 试验样品来源

编号	试验样品	剂型	实测/标识酶活 (U/g)	来源
1	α -半乳糖苷酶	粉状	2000	新华扬生物股份有限公司
2	α -半乳糖苷酶	粉状	2000	新华扬生物股份有限公司
3	α -半乳糖苷酶	粉状	2000	山东隆科特酶制剂有限公司
4	α -半乳糖苷酶	粉状	2000	山东隆科特酶制剂有限公司
5	α -半乳糖苷酶	粉状	20000	绵阳禾本生物工程有限公司
6	α -半乳糖苷酶	粉状	20000	福建福大百特生物科技有限公司
7	复合酶制剂	粉状	≥ 800	山东尤特尔生物科技有限公司
8	复合酶制剂	粉状	≥ 500	绵阳禾本生物工程有限公司
9	α -半乳糖苷酶	粉状	3000	北京昕大洋科技发展有限公司
10	α -半乳糖苷酶	粉状	3000	济南百斯杰生物股份有限公司
11	α -半乳糖苷酶	粉状	2310	市场样品
12	α -半乳糖苷酶	粉状	1500	市场样品
13	α -半乳糖苷酶	粉状	2200	市场样品
14	α -半乳糖苷酶	粉状	1901	市场样品
15	α -半乳糖苷酶	粉状	3400	市场样品
16	α -半乳糖苷酶	粉状	2500	市场样品
17	复合酶制剂	粉状	234	市场样品
18	复合酶制剂	粉状	345	市场样品
19	复合酶制剂	粉状	62	市场样品
20	复合酶制剂	粉状	1036	市场样品
21	复合酶制剂	粉状	1109	市场样品

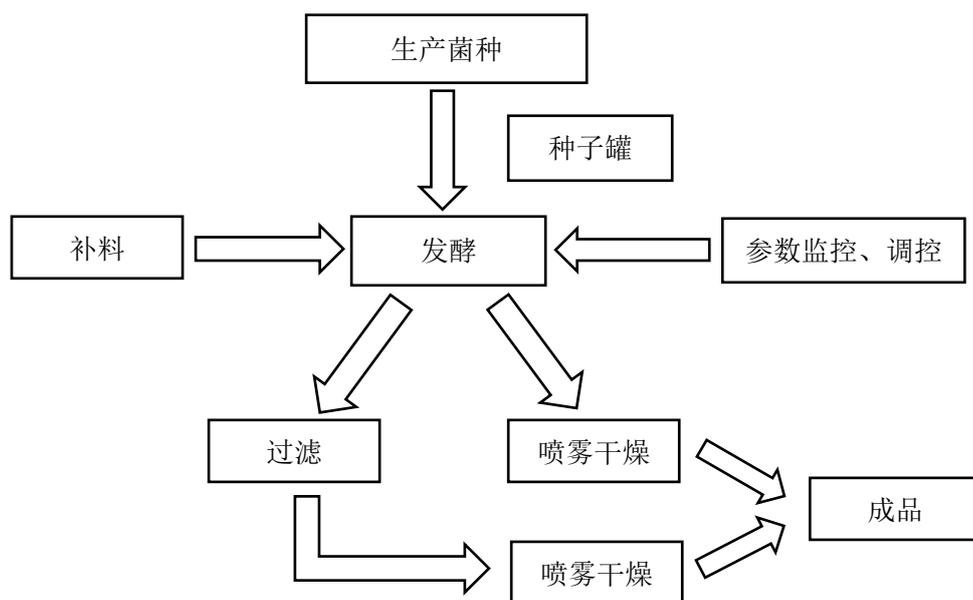


图 1：生产工艺流程图

2、 α -半乳糖苷酶检测方法

α -半乳糖苷酶的检测方法主要有 DNS 法和 对硝基苯酚法。李丽满等在《*Neosartorya fischeri* α -半乳糖苷酶酶学性质的研究》中，以棉子糖作为底物， α -半乳糖苷酶分解棉子糖产生 α -半乳糖与 DNS 试剂发生显色反应，以此方法来研究了 α -半乳糖苷酶的酶学性质；刘德海等在《高产 α -半乳糖苷酶菌株的筛选鉴定及发酵培养基的优化》中，以对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖作为底物， α -半乳糖苷酶分解对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖生成对硝基苯酚和 α -半乳糖，其中对硝基苯酚可以在碳酸钠提供的碱条件中显黄色，以此来测定 α -半乳糖苷酶的活性；许尧兴等在《两种测定程序对饲用 α -半乳糖苷酶活性检测结果的比较》中对两种方法进行了比较和分析，最终得出结论，通过研究对影响酶活的诸因子的系统分析，获得了两种 α -半乳糖苷酶测定程序。进而通过对不同样品的检测比较，两种方法所得结果虽然具有较好的相关性，但以棉子糖为底物的 DNS 法，可能由于酶样品未经纯化处理，其中的干扰因素较多，影响了酶与底物的结合，降低了还原糖的释放，导致酶活性偏低。而以对硝基苯酚- α -D-吡喃糖半乳糖为底物的 p-NPG 法，因酶样品中与底物的类似物几乎没有，酶受干扰程度较少，酶的活性部位与底物得以充分结合，使酶解释放的产物(对硝基苯酚)大幅增多，能较真实地反映 α -半乳糖苷酶的活性。

在企业标准信息公共服务平台上查询一些公司 α -半乳糖苷酶的企业标准，相关信息见下表 2，基本使用对硝基苯酚法，只是主要的反应参数存在差异。

表 2: α -半乳糖苷酶企业标准

编号	公司	采用方法	企标编号	主要反应参数
1	济南百斯杰生物工程 有限公司	对硝基苯 酚法	Q/370126BSJ005-2020	37℃, pH5.5, 10 min, 400 nm 比色
2	济南诺能生物工 程有限公司	对硝基苯 酚法	Q/370126NNE005-2015	37℃, pH5.5, 10 min, 400 nm 比色
3	青岛根源生物技 术集团有限公司	对硝基苯 酚法	Q/370283GYS078-2018	37℃, pH5.5, 10 min, 405 nm 比色
4	潍坊康地恩生物 科技有限公司	对硝基苯 酚法	Q/370785KDN015-2018	50℃, pH5.0, 10 min, 405 nm 比色
5	希杰尤特尔(山 东)生物科技有 限公司	对硝基苯 酚法	Q/370883YTE005-2019	37℃, pH4.8, 10 min, 410 nm 比色
6	山东隆科特酶制 剂有限公司	对硝基苯 酚法	Q/371323LKT030-2017	37℃, pH5.5, 10 min, 400 nm 比色
7	绵阳禾本生物工 程有限公司	对硝基苯 酚法	Q/76728402-9.19-2018	37℃, pH5.5, 10 min, 400 nm 比色
8	安琪酵母股份有 限公司	对硝基苯 酚法	Q/AQJM2176-2017	37℃, pH5.5, 10 min, 405 nm 比色

9	四川润格科技有限公司	对硝基苯酚法	Q/MA633BH724-1.05-2018	37℃, pH5.5, 10 min, 400 nm 比色
10	宁夏盛实业集团有限公司	对硝基苯酚法	Q/NXM018-2018	37℃, pH5.5, 5 min, 405 nm 比色
11	云南博仕奥生物技术有限公司	对硝基苯酚法	Q/YBS004-2017	37℃, pH5.5, 10 min, 405 nm 比色
12	杨氏(信丰)生物技术有限公司	对硝基苯酚法	Q/YSXF0003S-2019	37℃, pH5.5, 5 min, 405 nm 比色
13	福建福大百特生物科技有限公司	对硝基苯酚法	Q/007-2014	40℃, pH5.5, 5 min, 405 nm 比色

二、主要工作过程

表 3: 主要工作过程

序号	工作安排	具体工作内容	时间
1	确定编制小组	形成起草小组 国内外资料查询 形成标准草案 收集样品	2020.1-2020.5
2	确定技术路线, 进行实验	比较 DNS 法和 对硝基苯酚法 确定使用对硝基苯酚法	2020.5-2020.7
3	对硝基苯酚法方法优化	酶解参数优化, 包括温度、pH、底物浓度、底物型号、底物厂家、提取条件等方法学验证, 包括精密度、回收率等方法适用范围确定 小组讨论修改, 形成征求意见稿讨论稿	2020.7-2020.10

4	征求意见阶段	广泛征求意见	2020.10-2021.2
5	修改征求意见稿	根据专家意见修改文本及编制说明 根据专家意见补充部分试验	2020.12-2021.3
6	第三方验证	三家第三方实验室验证	2021.2-2021.7
7	预审准备	向微酶工作组秘书处提交预审申请	2021.8
8	预审	微酶工作组秘书处组织预审答辩	2021.9
9	公开意见稿	提交公开征求意见稿	2021.10

三、标准编制原则和主要技术内容的确定

(一) 标准编制原则

标准依据《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》、《GB/T 20001.4-2015 标准编制规则第 4 部分：试验方法标准》的原则进行修订编制。

(二) 主要技术内容的确定

1、DNS 法和对硝基苯酚法的比较

1.1 标准曲线

标准物质来源见表 4。

表 4：标准物质来源

标准物质	来源	货号	纯度
α -半乳糖	国药	63004434	/
对硝基苯酚	SIGMA	35836	100% (HPLC)

按照表 5 制备系列溶液，以吸光值为横坐标，以对硝基苯酚含量为纵坐标绘制标准曲线，见图 2。

表 5：不同含量对硝基苯酚与吸光值

试管号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
对硝基苯酚标准溶液(μL)	0	40	60	80	100	120	140	160	180	200
乙酸-乙酸钠缓冲液(μL)	1000	960	940	920	900	880	860	840	820	800
碳酸钠溶液(mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
对硝基苯酚的量 (μmol)	0	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.18	0.2
400 nm 吸光值	0.039	0.190	0.255	0.328	0.394	0.468	0.536	0.609	0.679	0.751

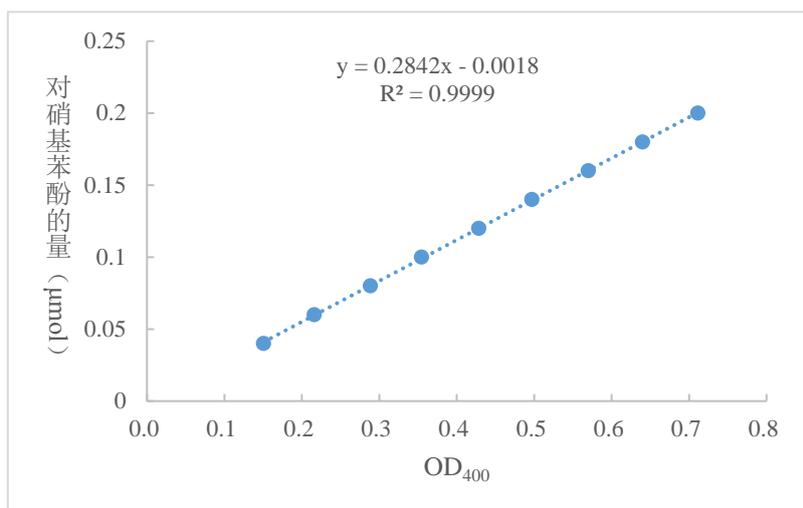


图 2: 对硝基苯酚法-对硝基苯酚标准曲线

按照表 6 制备系列溶液，以吸光度为横坐标， α -半乳糖的浓度为纵坐标绘制标准曲线，见图 3。DNS 法见附件 A。

表 6: 不同含量的 α -半乳糖与吸光值

编号	α -半乳糖标准溶液 (mg/mL)	α -半乳糖标准溶液 (mL)	缓冲液 (mL)	DNS (mL)	OD ₅₄₀
1	0	0	2	2.5	0.050
2	0.1	1	1	2.5	0.050
3	0.2	1	1	2.5	0.144
4	0.3	1	1	2.5	0.260
5	0.4	1	1	2.5	0.344
6	0.5	1	1	2.5	0.438
7	0.6	1	1	2.5	0.541
8	0.7	1	1	2.5	0.666

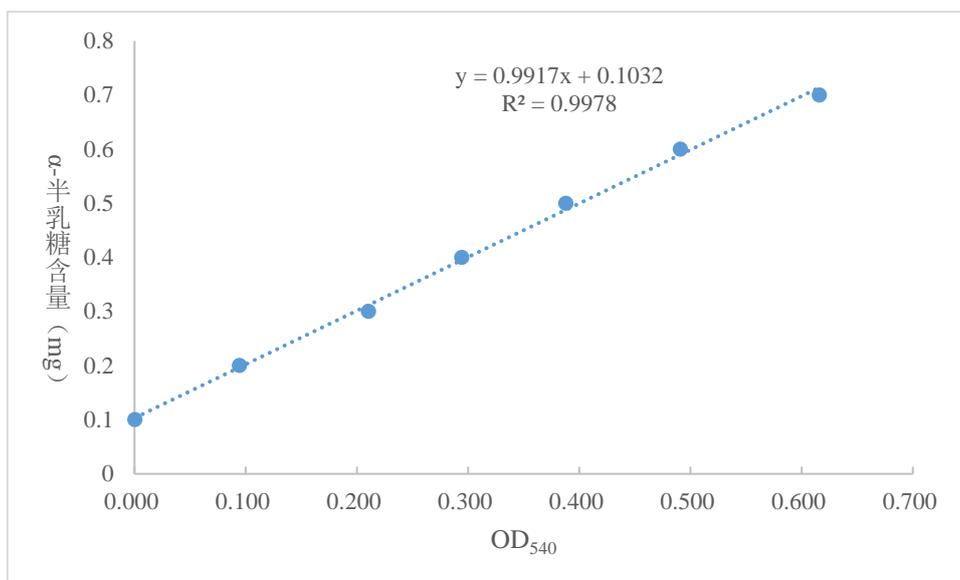


图 3: DNS 法- α -半乳糖标准曲线

根据上表, 当吸光值在 0.1~0.8 之间时, 对硝基苯酚法中管内对硝基苯酚的含量在 0.04~0.2 μmol ; DNS 法管内 α -半乳糖的含量在 0.1~0.7 mg, 折算成物质的量即为 0.56~3.89 μmol 。在各自的显色体系下, 达到相同的吸光值所需的 α -半乳糖的量为对硝基苯酚的 14~19 倍, 所以对硝基苯酚法的标准曲线的精度和灵敏度均比 DNS 法高。

1.2 不同酶浓度两种方法测定结果对比

将 α -半乳糖苷酶稀释至不同倍数, 按两种方法测定结果见下表 7。

表 7: 不同酶浓度下两种方法的对比

稀释倍数	对硝基苯酚法		DNS 法	
	净吸光值	酶活 (U/g)	净吸光值	酶活 (U/g)
100	/	/	1.050	20.89
200	2.010	22.45	0.545	23.50
500	2.004	55.96	0.182	25.89
800	1.875	83.75	0.071	25.35
1000	/	/	0.041	26.26
2000	1.151	128.25	-0.004	0
5000	0.465	128.48	-0.004	0
10000	0.218	118.58	/	/
20000	0.111	117.27	/	/

40000	0.045	86.65	/	/
80000	0.020	61.25	/	/
注：“/”表示未测定。				

采用不同稀释倍数，控制酶浓度。将吸光值范围控制在 0.15~0.6 之间时，DNS 法所需的酶浓度为对硝基苯酚法的 20~25 倍。DNS 法最低检出值所需的酶浓度也比对硝基苯酚法的高出 80 倍以上。这也说明了对硝基苯酚法的精密度和灵敏度高于 DNS 法。

1.3 方法的确定

DNS 法的底物是棉子糖，棉子糖是由半乳糖、果糖和葡萄糖结合而成，即 α -D-吡喃半乳糖基-(1 \rightarrow 6)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-呋喃果糖苷，它也被称为蜜三糖 (melitriose)，分子结构图见图 4。当 α -半乳糖苷酶将棉子糖中的 α -半乳糖苷键水解之后，释放出 α -半乳糖和蔗糖， α -半乳糖具有还原性能与 DNS 反应产生棕红色物质；而用蔗糖酶水解棉子糖时，会释放出 β -果糖和蜜二糖，果糖同样具有还原性也能与 DNS 反应产生棕红色的物质。所以，无法以产物的还原性来判断待测酶种是 α -半乳糖苷酶还是蔗糖酶；此外，当两种酶混合时，用 DNS 法检测时会导致测定值偏高，无法准确的反映出 α -半乳糖苷酶的酶活。

对硝基苯酚法中使用的底物结构简单，分子结构见图 5。水解后产物即为 α -半乳糖和对硝基苯酚，用对硝基苯酚的碱性条件下显黄色的性质作为检测原理，一般饲料或饲料添加剂中很少会有干扰检测的物质。

综上所述，结合精密度及灵敏度、检出限、底物专一性、干扰因素等几个方面，使用对硝基苯酚法测定 α -半乳糖苷酶活性更加合理。

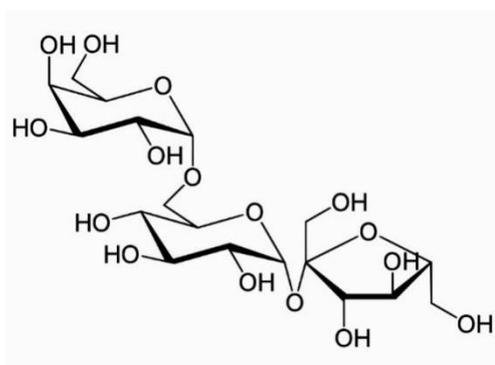


图 4：棉子糖结构

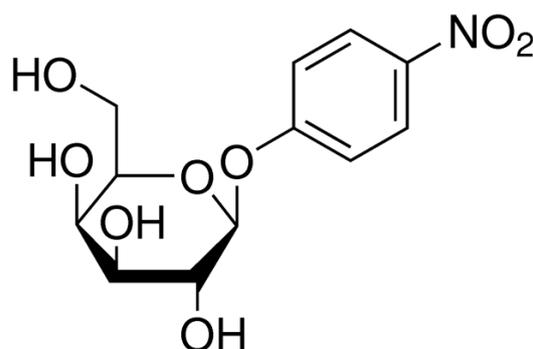


图 5：对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖结构

2、对硝基苯酚法酶促反应条件优化

2.1 检测原理及检测波长

α -半乳糖苷酶能迅速催化对硝基苯酚- α -D 吡喃半乳糖 (p-NPG) 生成对硝基苯酚和 α -半乳糖, 通过吸光度值的变化得出对硝基苯酚的生成量计算出酶活。用分光光度计在 200 nm-850 nm 处对对硝基苯酚溶液进行扫描, 结果在 400 nm 处对硝基苯酚有最大吸收峰, 因此检测波长为 400 nm。

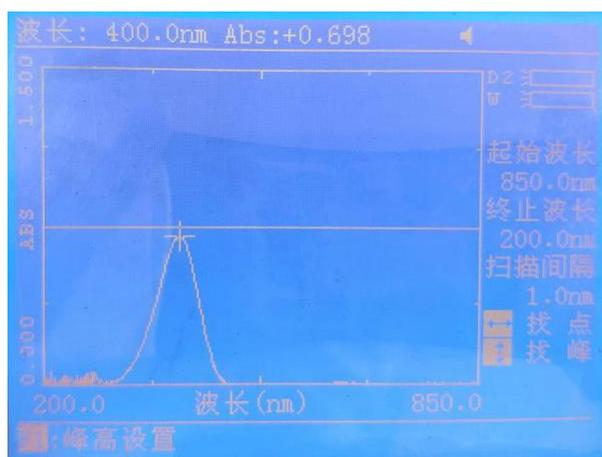


图 6: 对硝基苯酚溶液吸收光谱图

2.2 反应温度

控制其他条件不变, 分别在 30℃、37℃、40℃、50℃和 60℃测定酶活, 试验结果见下表 8。

表 8: 不同温度下的酶活性

反应温度 (°C)	空白吸光值	酶活 (U/g)
30	0.088	1357
37	0.089	2241
40	0.115	2883
50	0.266	3828
60	1.539	/

随着反应温度的上升, 空白吸光值也大幅度增高, 说明底物随着温度的升高也在逐渐的分解, 反应温度 60℃时, 空白的吸光值已超过 1.5, 远超分光光度计的最佳测定区间, 而且也无法测定酶活。测定出来的酶活性随着温度在变化, 但无法确定是由于酶的水解作用还是温度造成的底物分解。另外, 不同菌种产出的酶的理化性质不同, 最适温度也不同。

饲用酶制剂检测标准如《GB/T 18634-2009 饲用植酸酶活性的测定分光光度法》、《GB/T 23874-2009 饲料添加剂木聚糖酶活力的测定分光光度法》、《GB/T

36861-2018 饲料添加剂 β -甘露聚糖酶活力的测定分光光度法》和《NY/T 912-2020 饲料添加剂纤维素酶活力的测定分光光度法》规定的反应温度均为 37℃。选定这个温度是因为此温度更接近于畜禽体内的温度,可以更好的体现出酶制剂在动物体内的应用酶活,所以本标准的反应温度为 37℃。

2.3 反应 pH 值

控制其他条件不变,分别在 pH3.0、pH4.0、pH5.0、pH5.5、pH6.0、pH7.0、pH8.0 测定酶活,试验结果见下表 9。不同 pH 的反应条件下,空白吸光值变化不大,底物自身基本没有分解,比较稳定。但酶活存在差异,且不同菌种所产酶的性质不同,最适 pH 也不同。

表 9: 不同 pH 下的酶活性

pH	空白吸光值	酶活 (U/g)
3.0	0.083	1741
4.0	0.081	2178
5.0	0.085	2481
5.5	0.079	2649
6.0	0.081	4454
7.0	0.082	2325
8.0	0.079	2280

目前饲用酶制剂检测标准《GB/T 18634-2009 饲用植酸酶活性的测定分光光度法》、《GB/T 23874-2009 饲料添加剂木聚糖酶活力的测定分光光度法》、《GB/T 36861-2018 饲料添加剂 β -甘露聚糖酶活力的测定分光光度法》和《NY/T 912-2020 饲料添加剂纤维素酶活力的测定分光光度法》中规定的反应 pH 均为 5.50。畜禽胃肠道 pH 在 2.0-7.5,这些标准规定 pH5.5 为折中选择。因 pH 对空白吸光值无影响,所以本标准反应 pH 也定为 5.50。

另外,水产动物体温、胃肠道特点及应用环境与畜牧动物存在较大差异,因此本标准涉及的反应条件不适用于水产行业。

2.4 不同厂家底物的比较

目前从市场上购置了几个厂家的对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖苷(表 10),分别用于样品 A、B、C、D 和 E 的测定,结果见下表 11。

表 10: 底物信息

底物	生产厂家	货号	纯度	价格 (元/g)
棉子糖	SIGMA	R0250	$\geq 98\%$	60.68

对硝基苯酚- α -吡喃半乳糖苷	SIGMA	N0877	$\geq 99\%$	3029.12
对硝基苯酚- α -吡喃半乳糖苷	TCI	N0492	$> 98\%$	2088.40
对硝基苯酚- α -吡喃半乳糖苷	上海抚生	M32139	$\geq 99\%$	680.00
对硝基苯酚- α -吡喃半乳糖苷	麦克林	N814494	99%	356.00
对硝基苯酚- α -吡喃半乳糖苷	Adamas-beta	80926A	98%	346.75
对硝基苯酚- α -吡喃半乳糖苷	Megazyme	O-PNPAGAL	$> 98\%$	736.73

表 11: 不同厂家底物测定酶活

项目	样品	Sigma	Megazyme	TCI	上海抚生	麦克林	Adamas-beta	RSD(%)
酶活 (U/g)	A	2617	2663	2619	2626	2555	2532	1.88
	B	23065	23441	23942	23499	23776	23998	1.50
	C	1147	1129	1158	1186	1140	1144	1.71
	D	356	361	356	344	353	348	1.74
	E	546	551	550	537	541	547	0.99
空白 吸光值	A	0.078	0.069	0.199	0.285	0.24	0.399	-
	B	0.081	0.072	0.205	0.304	0.246	0.402	-
	C	0.079	0.074	0.204	0.289	0.247	0.407	-
	D	0.076	0.071	0.207	0.29	0.246	0.402	-
	E	0.078	0.074	0.205	0.29	0.247	0.402	-

由表 11 可见, TCI、上海抚生、麦克林和 Adamas-beta 四个厂家的对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖苷对应的空白吸光值偏高, 说明这四个对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖苷存在杂质较多或存在自身分解的情况。虽试验测定出来的 5 个样品酶活差异不显著, 但不能保证其在反应过程中产生的对硝基苯酚是底物自身分解还是由 α -半乳糖苷酶酶解所产生的, 可能会对测定 α -半乳糖苷酶的活性造成影响。Sigma 及 Megazyme 底物对应空白值较低且稳定。但考虑到底物来源对酶制剂产品质量控制的重要性, 综合考虑在标准文本中推荐 Sigma N0877 和上海抚生 M32139 两种型号, 兼顾国内外厂家, 保证底物货源稳定。

2.5 底物溶液的储存条件

将对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖苷溶液配制好以后, 分别将其放置在室温储存、4℃冰箱冷藏储存和-18℃冷冻避光储存, 分别测定不同储存时间后, 测定空白吸光值和样品酶活值, 试验结果见下表 12。

表 12: 底物溶液的储存条件对酶活及吸光值的影响

储存方式及 储存时间	现配现测 (U/g)	室温 酶活 (U/g)		4℃冷藏 酶活 (U/g)			-18℃冷冻 酶活 (U/g)		RSD (%)
		1 天	3 天	3 天	5 天	7 天	1 月	2 月	
空白吸光值	0.076	0.089	0.102	0.092	0.103	0.125	0.075	0.078	18.54
A	2151	2088	2135	2103	2217	2087	2065	2123	2.26
B	21003	20712	21547	20335	20993	19927	20488	21101	2.44
C	322	323	335	339	312	303	312	314	3.83
D	528	524	547	531	553	540	518	529	2.23

可以看出, 当储存温度较高(室温)时, 空白吸光值随着储存时间的增长而逐渐变大, 说明温度较高时, 对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖苷会分解, 但是对酶活测定值的影响较小。但-18℃保存时的空白吸光值更为稳定, 且 Sigma N0877 产品标注是冷冻保存, 所以建议-18℃保存底物溶液, 有效期 2 个月。

2.6 不同批次底物的稳定性

选取 5 个批次的 Sigma N0877 对硝基苯酚- α -D-吡喃半乳糖, 测定样品 A, 测定结果见下表 13。不同批次之间的底物差异较小, 数据稳定。

表 13: 不同批次底物酶活

底物批号	空白吸光值	酶活 (U/g)	RSD (%)
Lot#051M1244V	0.078	1937	1.583
Lot#WXBC7594V	0.076	1937	
Lot#058K1183	0.074	1988	
Lot#WXBD4458V	0.079	1971	
Lot#WXBD1182V	0.081	1910	

2.7 底物浓度

取 α -半乳糖苷酶稀释至合适酶浓度, 分别测定不同底物浓度 (S) 下的吸光值及反应速率 (V), 见表 14; 并用底物浓度的倒数 (1/S) 和反应速率的倒数 (1/V) 做双倒数图, 确定其回归方程并确定 Km 值, 见图 7 图 8。

根据双倒数图得到回归方程为 $y=132.2x+65.336$, $R^2=0.9958$, 此直线的截距为 $1/V_{max}$, 横轴的截距为 $1/K_m$ 的绝对值, 由此可以计算出 K_m 值为 2.023 mmol/L。

一般情况下，底物浓度 $S \geq 5 \text{ Km}$ ，即 10.12 mmol/L ，为方便计算取整数，确定底物浓度为 10 mmol/L 。

表 14：不同底物浓度下的反应速度

不同底物浓度 S (mmol/L)	空白吸光值	净吸光值	反应速率 V ($\mu \text{ mol/min}$)	酶活 (U/g)
0.1	0.041	0.031	0.0007	142
0.2	0.041	0.059	0.0015	304
0.5	0.042	0.126	0.0034	690
0.8	0.043	0.169	0.0046	938
1	0.045	0.203	0.0056	1133
2	0.051	0.274	0.0076	1543
4	0.058	0.344	0.0096	1946
6	0.07	0.388	0.0108	2200
8	0.075	0.403	0.0113	2286
10	0.084	0.406	0.0114	2303
12	0.085	0.402	0.0113	2280
14	0.095	0.406	0.0114	2303
16	0.101	0.419	0.0117	2378
18	0.105	0.428	0.0120	2430
20	0.112	0.423	0.0118	2401

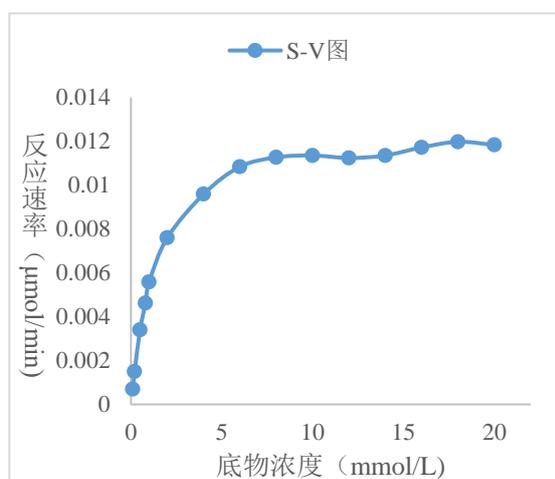


图 7：底物浓度 S-反应速率 V 图

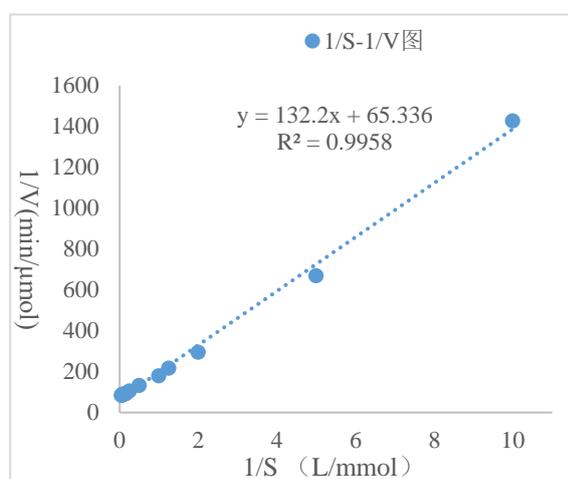


图 8：双倒数图

2.8 反应时间

将 α -半乳糖苷酶浓度稀释至 0.025 U/mL 左右，分别测定不同反应时间下的吸光值及反应速率，见表 15。以反应时间 t 为横坐标，以反应速率 V 为纵坐标做反应进程曲线，见图 9。由此酶浓度下的反应进程曲线可以看出，反应时间在 $0\text{-}20 \text{ min}$ 时的反应速率是呈线性增加的，反应 20 min 以后反应速率趋于平缓。 0-

20 min 时是 α -半乳糖苷酶酶促反应的初速度阶段,此时间段均可作为反应时间,因 10 min 有利于酶促反应操作,所以测定酶活的反应时间定为 10 min。

表 15: 不同反应时间的吸光值及反应速率

反应时间 t (min)	净吸光值	反应速率 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
0	/	0
5	0.026	0.0010
10	0.071	0.0018
15	0.135	0.0023
20	0.188	0.0025
25	0.236	0.0026
30	0.287	0.0027
35	0.327	0.0026
40	0.374	0.0026
45	0.423	0.0026
50	0.462	0.0026
55	0.521	0.0027
60	0.581	0.0027

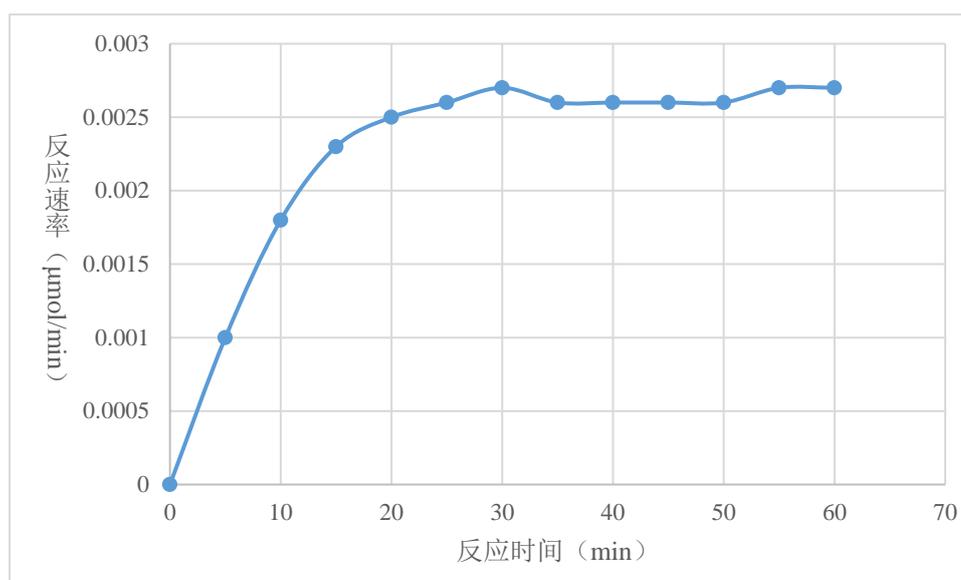


图 9: 反应进程曲线

2.9 反应酶浓度

将 α -半乳糖苷酶稀释至不同酶浓度,分别测定其吸光值及酶活,分析不同酶浓度下酶活性的差异。试验结果见下表 16-17。

酶浓度控制在 0.002~0.119 U/mL 时,对应的吸光值在 0.044~2.212,此范围内测出的酶活极差在 411, RSD 为 5.73%,但这个吸光值范围已经超出了分光光度计测定的最佳范围;若吸光值控制在 0.1~0.8 时,对应酶浓度在约在 0.006~0.040

U/mL，此区间内的酶活极差在 194，RSD 为 2.87%；若吸光值控制在 0.2~0.5，酶活极差只有 55，且 RSD 值也仅有 1.18%，所以建议将吸光值控制在 0.2~0.5，即酶浓度 0.012~0.030 U/mL 之间。

表 16：不同酶浓度的测定结果

稀释倍数	酶浓度 (U/mL)	净吸光值	测定酶活 (U/g)
500000	0.002	0.044	2040
400000	0.003	0.052	1979
300000	0.004	0.072	2134
200000	0.006	0.107	2181
100000	0.012	0.213	2239
80000	0.015	0.271	2294
50000	0.024	0.42	2241
40000	0.030	0.531	2273
30000	0.040	0.737	2375
20000	0.059	1.038	2235
10000	0.119	2.212	2389

表 17：不同吸光值区间的结果

吸光值区间	0.044-2.212	0.1-0.8	0.2-0.5
最小值 (U/g)	1979	2181	2239
最大值 (U/g)	2389	2375	2294
极差 (U/g)	411	194	55
平均值 (U/g)	2216	2267	2262
标准差	±127	±65	±27
RSD (%)	5.73	2.87	1.18

2.10 提取条件

2.10.1 提取方式

选取不同样品，分别用 25℃ 140 rpm 恒温振荡器和磁力搅拌器提取 30 min，分别测定酶活，数据见下表 18。不同样品在两种提取方式下所测酶活相对相差不在 5.1% 以内，两种提取方式测定值差异不大。恒温振荡器和磁力搅拌器都是常规仪器设备，两种方式都可使用。

表 18：恒温振荡与磁力搅拌的影响

样品	不同提取方式酶活 (U/g)		RSD (%)
	恒温振荡 140 rpm	磁力搅拌	
A	2217	2273	1.25

B	22065	22311	0.55
C	974	1078	5.07
D	21747	22916	2.62
E	356	371	2.06
F	546	578	2.85

2.10.2 提取时间

振荡提取 10 min~40 min，不同提取时间酶活测定值呈上升趋势，结果见表 19，RSD 值在 2.28%~6.36%之间，提取 10 min 酶活最低，提取 20 min 之后酶活变化较小，统一选择为 30 min。

表 19: 不同提取时间的影响

样品 编号	不同提取时间酶活 (U/g)				RSD (%)
	10 min	20 min	30 min	40 min	
1	2477	2597	2587	2513	2.28
2	2032	2091	2122	2194	3.20
3	1921	2016	2093	2093	4.02
4	1813	2017	2073	2089	6.36

2.10.3 提取之后的放置时间

选取不同样品，摇床恒温振荡提取 30 min，分别测定静置 10 min，静置 1 h、静置 2 h、静置 3 h 和静置 4 h 后的酶活并比较差异，检测结果见表 20。静置不同时间的 RSD 值在 2.25%~8.97%之间，1/3 样品差异稍大 (>5%)，为保证样品结果的稳定性，提取后需尽快测定，不宜放置过久。统一选择了 10 min。

表 20: 提取液静置不同时间后的酶活

样品	不同静置时间酶活 (U/g)					RSD (%)
	10 min	1 h	2 h	3 h	4 h	
A	2217	2394	2018	2298	2402	6.97
B	22065	21441	20967	22107	21873	2.23
C	974	964	917	984	977	2.78
D	21747	21007	21209	21954	20841	2.25
E	356	378	339	303	315	8.97
F	546	546	559	529	514	3.24

2.11 显色时间

2.11.1 标准溶液的显色时间

选取 0.1 μmol 对硝基苯酚标准溶液与碳酸钠混合后（即 100 μL 1 $\mu\text{mol/mL}$ 对硝基苯酚标准溶液+900 μL pH 5.5 缓冲液+4 mL 0.2 mol/L 碳酸钠溶液）放置不同时间测试吸光值比较差异，数据见下表 21。标准溶液与碳酸钠混合后在 20 min 内放置不同时间，吸光值变化差异不大，说明标准溶液与碳酸钠显色反应较快且稳定。为了操作方便和统一标准，将显色时间定为 5 min。

表 21：标准溶液与碳酸钠混合后放置不同时间后的吸光值

放置时间 (min)	吸光值
0	0.443
5	0.441
10	0.454
15	0.460
20	0.449
RSD (%)	0.8%

2.11.2 样品反应液显色后放置时间

选取不同样品，酶解完，显色后的溶液分别放置不同时间比较差异，数据见下表 22。酶活测定结果差异不大，但空白吸光值的变化差异较大，RSD 已到 34.57%，空白吸光值随放置时间的增长而变高，是因为在室温条件下放置，底物自身在分解，所以空白吸光值逐渐变高，同理，样品管中残存的底物也在逐渐分解，无法确认每根试管中的残存底物的分解速度是否一致，所以建议反应完以后 1 h 内比色记录数据较为准确。

表 22：显色后溶液放置不同时间后的测定酶活

放置时间 (h)	空白吸光值	酶活 (U/g)			
		A	B	C	D
0	0.078	2065	20488	312	518
1	0.087	1972	20773	322	522
2	0.104	2088	20661	320	519
3	0.135	1944	20210	304	494
4	0.16	1914	20321	293	486
5	0.188	1895	19430	295	479
RSD (%)	34.57	4.14	2.36	4.02	3.76

2.12 碳酸钠浓度

选取 0.1 μmol 对硝基苯酚标准溶液与不同浓度的碳酸钠混合，测试吸光值比较差异，数据见下表 23。0.05~0.2 mol/L 碳酸钠溶液的 pH 值差异不大，0.05~0.4

mo/L 碳酸钠溶液吸光值测值与平均值差异在 5%以内。

表 23：对硝基苯酚在不同碳酸钠浓度中的显色

碳酸钠浓度	碳酸钠溶液 pH 值	吸光值	测值/平均值
0.005 mol/L	10.90	0.418	94%
0.050 mol/L	11.29	0.436	98%
0.100 mol/L	11.32	0.460	104%
0.200 mol/L	11.30	0.448	101%
0.400 mol/L	11.55	0.456	103%

不同浓度碳酸钠溶液对应标准曲线见下图 10，所测酶活见下表 24。各标准曲线斜率及截距差异不大，且线性都较好 ($R^2 \geq 0.9997$)。对应计算所得酶活差异也不大。综合以上，选择 0.05~0.4 mol/L 碳酸钠溶液均可，为操作方便和统一标准，选择了 0.2 mol/L 碳酸钠作为终止剂及显色剂。

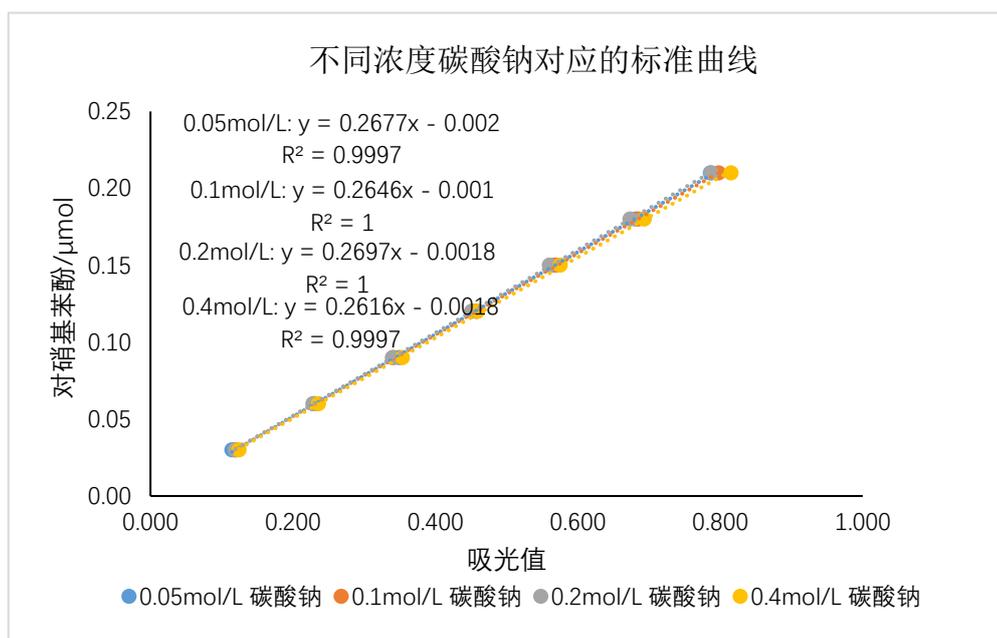


图 10：不同浓度碳酸钠溶液对应的标准曲线

表 24：不同浓度的碳酸钠溶液与对硝基苯酚做的标准曲线所测酶活

碳酸钠浓度	酶活 (U/g)	RSD(%)
0.05 mol/L	8335	1.35%
0.10 mol/L	8324	
0.20 mol/L	8310	

0.40 mol/L	8179	
------------	------	--

3、对硝基苯酚法方法学验证

3.1 准确度

取样品 A 提取后并进行一定程度的稀释，使酶浓度在 0.012 U/mL~0.03U/mL 之间，按照标准文本测定方法进行测定，此为未加标试样，酶活记为 X_0 ；同时取 A 样品酶稀释液，加入一定量对硝基苯酚标准溶液，按照标准文本测定，此为加标试样，酶活记为 X_1 ；加入的对硝基苯酚标准溶液换算后的酶活记为 X ，为理论加标酶活，回收率按下式计算：

$$P = \frac{X_1 - X_0}{X} \times 100\%$$

式中：

P ——加标回收率，%；

X_1 ——加标试样酶活，U/mL；

X_0 ——未加标试样酶活，U/mL；

X ——理论加标酶活，U/mL。

酶制剂样品中添加三个浓度的标准溶液，实验测定 3 次平行，试验数据见下表 25。

表 25：样品加标回收率

样品	未加标样品	加标样品 1	加标样品 2	加标样品 3
平行 1 (U/mL)	0.0208	0.0512	0.0626	0.0847
平行 2 (U/mL)	0.0206	0.0512	0.0624	0.0850
平行 3 (U/mL)	0.0210	0.0513	0.0627	0.0842
理论加标酶活 (U/mL)	/	0.0308	0.0408	0.0608
回收率 1 (%)	/	98.70	102.45	105.10
回收率 2 (%)	/	99.35	102.45	105.92
回收率 3 (%)	/	98.38	102.21	103.95
平均回收率 (%)	/	98.81	102.37	104.99

3.2 重复性及再现性

取同一样品，相同条件连续测定 6 次，试验结果见下表 26，RSD 为 2.15%，说明重复性较好。另外也比较了不同酶活样品的重复性变异系数，均非常理想，见表 27。三家第三方检测机构（湖北省饲料质量监督检验站、河南华测检测技术有限公司、湖北国正质量技术服务有限公司）重复性及回收率的验证结果如

下表 28，具体验证报告另附。三家机构的重复性 RSD 均在 5%以内，样品的回收率在 91.0-108.3%之间。因此，基于以上重复性及再现性结果，在标准文本中规定了精密度为：在重复性条件下，两次独立测定结果绝对差值不超过其算术平均值的 10%。

表 26：重复性试验结果

试验编号	测定值 (U/g)	平均值 (U/g)	相对偏差 (%)	标准偏差	RSD (%)
1	2115	2119	-0.20%	45.61	2.15%
2	2146		1.26%		
3	2073		-2.19%		
4	2118		-0.06%		
5	2192		3.43%		
6	2072		-2.23%		

表 27：不同酶活样品重复性

编号	设计酶活 (U/g)	实测酶活 (U/g)	RSD (%)
1	5000	5110	2.20%
		4927	
		4978	
		5090	
		4979	
		4811	
2	500	501	2.67%
		496	
		470	
		509	
		497	
		491	
3	50	50	3.83%
		46	
		47	
		51	
		49	
		49	
4	10	10.2	4.63%
		10.7	
		10.5	

	9.7
	9.9
	9.5

表 28：再现性

编号	机构	RSD (%)	回收率 (%)
1	华测	2.5-2.6%	98-101%
2	国正	1.25%	91.0-108.3%
3	湖北省饲料质量监督检验站	3.49-4.88%	94.33-105.10%

3.3 方法的检出限和定量限

3.3.1 仪器的检出限和定量限

实验室以纯水为空白样品，加入一定量的标准溶液，配制成一定浓度的空白加标样品。按照样品分析的过程平行测定7次，并按照下式计算标准偏差，同时计算仪器的检出限。

$$MDL = t_{(n-1, 0.99)} \times S$$

式中：

MDL——仪器的检出限；

n ——样品的平行测定次数；

t ——自由度为 $n-1$ ，置信度为99%时的 t 分布（单侧）；

S —— n 次平行测定的标准偏差。

其中，当自由度为 $n-1$ ，置信度为99%，当 n 为7时， $t(n-1, 0.99)=3.143$ 。仪器检出限，将低标准溶液进行平行7次测定，按照样品分析的全部步骤，重复 n （ ≥ 7 ）次空白试验，将各测定结果换算为样品中的浓度或含量，计算 n 次平行测定的标准偏差，按上述公式计算方法检出限。定量限按照检出限的4倍计算。

表 29：检出限和定量限

编号	实测值 (U/mL)
1	0.0214
2	0.0203
3	0.0211
4	0.0213
5	0.0209
6	0.0206
7	0.0207
平均值 (U/mL)	0.0209
标准偏差	0.0004
检出限 (U/mL)	0.0013

定量限 (U/mL)	0.0052
------------	--------

仪器的检出限为 0.0013 U/mL，定量限为 0.0052 U/mL。

以上实验方法参考《GB/T 27415-2013 分析方法检出限和定量限的评估》、《GB/T 32465-2015 化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》、《检出限的涵义和计算方法》、美国 EPA 方法 Environmental Protection Agency. OPEN-FILE REPORT 99-193。

3.3.2 方法的定量限

选取 α -半乳糖苷酶样品，使用玉米豆粕粉为载体进行不同倍数的稀释，按照拟定方法进行检测，结果见表 30。酶活在 18-942 U/g 之间时，回收率均比较理想，但当样品酶活稀释至 10 U 以下，回收率不理想，故将定量限定设为 10 U/g。

表 30：不同稀释倍数配制的酶的回收率

样品序号	样品稀释倍数	酶活 (U/g)	理论酶活 (U/g)	回收率
0	0	9415	-	-
1	10	942	941.5	101.1%
2	100	96	94.15	102.0%
3	500	18	18.83	95.6%
4	1000	8.9	9.415	94.5%
5	5000	1.451	1.883	77.1%
6	10000	0.839	0.942	89.1%
7	20000	0.372	0.471	79.0%
8	40000	0.212	0.235	90.0%

4、方法适用范围

4.1 适用菌种

饲料添加剂品种目录（2013）中规定的 α -半乳糖苷酶来源于黑曲霉，但考虑到企事业单位、科研院所可能会开发新菌种来源的产品，也需要使用到检测方法，因此，本文件未对生产菌种进行规定。

4.2 α -半乳糖苷酶的种类

取 α -半乳糖苷酶适量，与含蛋白酶、淀粉酶、木聚糖酶、纤维素酶、甘露聚糖酶、葡聚糖酶、果胶酶、植酸酶的复合酶制剂进行不同比例复配，计算回收率，

结果见下表 31，不同添加比例，所得回收率均在 95.0%以上，结果较理想，说明该方法适用于复合酶制剂中 α -半乳糖苷酶的检测。

表 31：复合酶中 α -半乳糖苷酶的检测

编号	添加浓度 (U/g)	测定值 (U/g)	回收率 (%)
1	1000	1002	100.2%
2	100	98.5	98.5%
3	10.0	9.8	98.0%

4.3 不同饲料中 α -半乳糖苷酶的检测

α -半乳糖苷酶多以复合酶制剂的形式添加到配合饲料中，复合酶制剂中 α -半乳糖苷酶的酶活在 50-1000 U/g，添加量为 50-300 g/T，即饲料中的 α -半乳糖苷酶含量为 0.0025~0.3 U/g。

取 α -半乳糖苷酶适量，与预混料、浓缩料、补充料以及部分预混料载体进行混合，按文件拟定方法测定酶活。结果见下表 32。

由表可知，单一成分中豆粕粉、玉米粉、多族维生素、几种氨基酸对检测基本无影响，而多矿、石粉、沸石粉、膨润土对 α -半乳糖苷酶有不同程度的影响，多矿等占比越高， α -半乳糖苷酶回收率越低，损失越大，因此推测也可能不适用于各类饲料中的 α -半乳糖苷酶检测。选取精补料、预混料、浓缩料、配合饲料进行验证，确实也对检测结果有不同程度的影响， α -半乳糖苷酶添加量越小，损失越大。因此，该方法不适用于精补料、预混料、浓缩料及配合饲料。

表 32：饲料中不同组分对 α -半乳糖苷酶酶活的影响

组分	添加浓度 (U/g)	测定值 (U/g)	回收率 (%)
豆粕粉	20	19.98	99.90
玉米粉	20	19.21	96.05
多族维生素	898	882	98.22
	182	189	103.80
多矿	1609	1434	89.12
	1430	1193	83.43
	1243	965	77.63

	1074	717	66.76
	831	421	50.66
	205	57	27.80
蛋氨酸	886	913	103.05
	211	214	101.42
苏氨酸	900	944	104.44
	233	226	97.00
赖氨酸	907	901	99.34
	223	225	100.90
淀粉	895	898	100.34
	201	199	99.00
石粉	894	827	92.51
	217	194	89.40
沸石粉	893	795	88.69
	448	351	78.35
膨润土	901	815	90.46
	435	345	79.31
肉牛羊精补料	909	770	84.71
	214	128	59.81
猪浓缩料	882	855	96.93
	176	152	86.36
蛋鸡预混料	880	683	77.61
	171	77	45.02
猪预混料	893	726	81.29
	182	99	54.40
蛋鸡配合饲料	20.0	16.4	82.0
	10.0	8.76	87.60
	2.0	1.65	82.50
	1.0	0.68	68.00

四、标准中涉及专利的情况

在受理专利《一种用于 α -半乳糖苷酶产生菌快速筛选的培养基及其应用》（申请号201910728321.1）中公开了一种 α -半乳糖苷酶活性分析方法，原理与本文件中涉及的基本相同，但溶液浓度、反应条件、检测波长等条件有一定的差异。无相关授权专利。

五、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况

未查询到ISO及IEC国际标准，无DIN、AFNOR、BELST等国外标准。美国食品药品法典FCC和日本JSFA中有关于 α -半乳糖苷酶活性测定方法，具体见下表33：FCC中提到的对硝基苯酚法用于测定来自黑曲霉的 α -半乳糖苷酶的活力，与前述有所不同的是显色用的碱液是硼砂碱液，其作用与碳酸钠碱液类似。Jafa中提到两种测试方法，一种是以蜜二糖作为底物，通过测试蜜二糖水解释后产生的葡萄糖的量来测定 α -半乳糖苷酶的活力。另一种方法也是用对硝基苯酚法测定 α -半乳糖苷酶的活力。本方法与上述两种国外方法中规定的对硝基苯酚法基本原理及检测步骤大体一致，具体要求及反应参数有差异。

表33：国外方法

编号	方法	来源	具体参数
1	对硝基苯酚法	FCC	37°C, pH5.5, 15 min, 405 nm
2	蜜二糖法	JSFA-方法一	40°C, pH5.0, 30 min, 505 nm
3	对硝基苯酚法	JSFA-方法二	37°C, pH5.5, 15 min, 405 nm

六、与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系

在本标准的修订过程中严格遵守国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准，与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调性原则。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、贯彻农业行业标准的要求和措施建议

本标准发布后，建议加强标准的宣贯，保证饲料添加剂 α -半乳糖苷酶产品质量和市场规范。发布后，建议过渡期为半年，为 α -半乳糖苷酶产品技术改造、成本投入、老旧产品逐步退出市场等行为预留过渡时间。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。

附件 A:

α -半乳糖苷酶活力的测定 DNS 法

1 术语及定义

1.1 α -半乳糖苷酶活力单位

在 37°C、pH 值为 5.5 的条件下，每分钟从浓度为 10 mg/mL 的 D-绵子糖溶液中降解释放 1 μ mol 还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位 (U)。

2 试剂与溶液

除特殊说明外，所用的试剂均为分析纯，水均为符合 GB/T 6682 中规定的二级水。

2.1 D-半乳糖溶液，c (C₆H₁₂O₆) 为 10.0 mg/mL:

称取无水 D-半乳糖 1.000 g，加水溶解，定容至 100 mL。

2.2 乙酸-乙酸钠缓冲溶液，c (CH₃COOH-CH₃COONa) 为 0.1 mol/L，pH 值为 5.5:

称取无水乙酸钠 8.2 g，加水溶解，并用冰乙酸调节 pH 至 5.5，加水定容至 1000 mL，摇匀。

2.3 氢氧化钠溶液，c (NaOH) 为 200 g/L:

称取氢氧化钠 20.0 g，加水溶解，定容至 100 mL。

2.4 D-绵子糖溶液，10.0 mg/mL:

称取 D-绵子糖 (Amresco 120480) 1.000 g，用缓冲液 (2.2) 溶解并定容至 100 mL 备用。4°C 避光保存，有效期为 3 天。

2.5 DNS 试剂

称取 3, 5-二硝基水杨酸 3.15 g，加水 500 mL 在磁力搅拌器上加热搅拌，至 45°C，然后逐步加入 100 mL 氢氧化钠溶液 (2.3)，同时不断搅拌，直到溶液清澈透明 (注意：在氢氧化钠加入的过程中，溶液温度不得低于 45°C，不得高于 48°C)，再逐步加入四水酒石酸钾钠 91.0 g，保持在 46°C 左右。直到全部溶解，加入苯酚 2.5 mL，再加入无水亚硫酸钠 2.5 g，保温 45°C 搅拌，直到加入物质完全溶解，停止加热，冷却至室温后，用水定容至 1000 mL。用滤纸过滤，取滤液储存在棕色瓶中，避光保存，室温下存放 7 天后可以使用，有效期为 2 个月。

3 仪器与设备

3.1 实验室用样品粉碎机或碾钵。

3.2 分样筛：孔径为 0.25 mm (60 目)。

3.3 分析天平：感量 0.001 g。

- 3.4 pH 计：精确至 0.01。
- 3.5 磁力搅拌器：附加加热功能。
- 3.6 电磁振荡器。
- 3.7 离心机：2000 g 以上。
- 3.8 恒温水浴锅：精度为 0.1℃。
- 3.9 秒表：每小时误差不超过 5 s。
- 3.10 分光光度计：可在 540 nm 比色。
- 3.11 移液器：精度为 1 μ L。

4 标准曲线的绘制

吸取缓冲液（2.2）2.0 mL，加入 DNS 试剂 2.5 mL，沸水浴加热 5 min。用自来水冷却至室温，用水定容至 12.5 mL，制成标准空白样。

分别吸取 α -半乳糖溶液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 和 7.00 mL，分别用缓冲液（2.2）定容至 100 mL，配制成浓度为 0.10 mg/mL~0.70 mg/mL α -半乳糖标准溶液。

分别吸取上述浓度系列的 α -半乳糖标准溶液各 1.00 mL（做二个平行），分别加入到刻度试管中，再分别加入 1 mL 缓冲液（2.2）和 2.5 mL DNS 试剂（2.5）。摇匀，沸水浴加热 5 min。然后用自来水冷却到室温，再用水定容至 12.5 mL。以标准空白样为对照调零，在 540 nm 处测定吸光值。

以 α -半乳糖浓度为 Y 轴、吸光度为 X 轴，绘制标准曲线。每次新配制 DNS 试剂均需要重新绘制标准曲线。

5 试样溶液的制备酶活测定

称取固体试样两份，精确至 0.001 g。加入 40 mL 乙酸—乙酸钠缓冲溶液（2.2）。磁力搅拌 30 min，再用缓冲溶液（2.2）定容至 100 mL，摇匀，取 1 mL 上清液，再用缓冲溶液（2.2）做适当稀释。

液体试样可以直接用乙酸—乙酸钠缓冲溶液（2.2）进行稀释、定容。如果稀释后酶液的 pH 值偏离 5.5，需要用乙酸溶液或乙酸钠溶液调节、校正至 5.5，然后再用缓冲溶液（2.2）做适当定容。

6 测定步骤

吸取 1.00 mL 经过适当稀释的酶液（已经过 37℃平衡），加入到刻度试管中，再加入 2.5 mL DNS 试剂，摇匀。然后加入 1.0 mL D-绵子糖溶液，37℃保温 30 min，沸水浴加热 5 min。用自来水冷却至室温，加水定容至 12.5 mL，摇匀。以标准空白样为空白对照，在 540

nm 处测定吸光度 A_B 。

吸取 1.0 mL 经过适当稀释的酶液（已经过 37°C 平衡），加入到刻度试管中，再加入 1.0 mL D-绵子糖溶液（已经过 37°C 平衡），摇匀，37°C 精确保温 30 min。加入 2.5 mL DNS 试剂，摇匀。沸水浴加热 5 min，用自来水冷却至室温，加水定容至 12.5 mL，摇匀。以标准空白样为空白对照，在 540 nm 处测定吸光度 A_E 。

7 试样酶活力的计算

$$X_D = \frac{[(A_E - A_B)] \times K + C_0}{M \times t} \times 1000 \quad (1)$$

式 (1) 中：

X_D — 试样稀释液中的 α -半乳糖苷酶活力，U/mL；

A_E — 酶反应液的吸光度；

A_B — 酶空白样的吸光度；

K — 标准曲线的斜率；

C_0 — 标准曲线的截距；

M — 半乳糖的分子量（180.2）；

t — 酶解反应时间，min；

1000 — 转化因子，1 mmol=1000 μ mol。

$$X = X_D \cdot D_f \quad (2)$$

式 (2) 中：

X — 试样 α -半乳糖苷酶的活力，U/g；

D_f — 试样的总稀释倍数。

酶活力的计算值保留三位有效数字。

8 精密度

每个试样应取两份平行样品进行分析测定。在重复性条件下，两次独立测定结果绝对差值不超过其算术平均值的10%。