

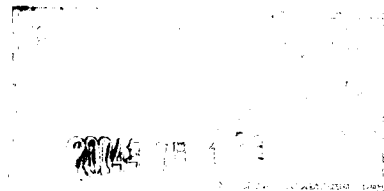
诺维信（中国）生物技术有限公司企业标准

Q/12KF 3568.114-2004

诺维信分析方法

第 114 部分：用红普鲁兰测定普鲁兰酶活力，NPUN (NPUN-P 和 NPUN-D)

(Novozymes A/S Standard Method, EB-SM-0420.02/02 Pullulanase activity with red pullulan NPUN (NPUN-P and NPUN-D), IDT)



2004-07-05 发布

2004-07-05 实施

诺维信（中国）生物技术有限公司 发布

前 言

本标准与Novozymes A/S标准方法：EB-SM-0420.02/02 Pullulanase activity with red pullulan NPUN (NPUN-P and NPUN-D)(英文版)的一致性程度为等同。

本标准由诺维信（中国）生物技术有限公司提出。

本标准由诺维信（中国）生物技术有限公司负责起草。

本标准主要起草人：蔺继尚、赵力、翟文景。

本标准于2004年07月首次发布。

诺维信分析方法

第 114 部分：用红普鲁兰测定普鲁兰酶活力，NPUN(NPUN-P 和 NPUN-D)

1 范围

本方法适用于测定Promozyme D和Dextrozyme样品中的普鲁兰酶（Pullulanase）的活力。

2 原理

酶样品与底物（红普鲁兰）混和保温。内切普鲁兰酶能水解红普鲁兰中的 α -1,6-糖苷键，产生红色降解产物。用乙醇沉淀未降解底物。在510nm下测定上清液的吸光度，测定值与样品中普鲁兰酶活性成正比。

2.1 反应条件

温度	50°C \pm 2°C
底物	0.7% 红普鲁兰
pH值	4.5
反应时间	30分钟
酶浓度	(0.10-0.25) NPUN/mL

3 单位定义

NPUN

(New Pullulanase Unit Novo) 是新内切普鲁兰酶活力单位，以诺维信Promozyme D标准酶为基准测定。

一个普鲁兰酶活力单位——PUN——定义为在方法KAL-SM-1013规定的标准条件下每分钟释放出1 μ mol葡萄糖所需的酶的量。1 NPUN = 0.35 PUN。

需要添加acarbose分析的样品，最终单位表示为NPUN-D；不需要的，最终单位表示为NPUN-P。

4 专一性和灵敏度

本方法根据酶对红普鲁兰的 α -1,6-糖苷键的水解反应分析酶活力，因此不是普鲁兰酶的特有反应。在任何其它能降解普鲁兰或其分解产物的酶存在下，这个酶的活力均会在结果中反应出来，比如在Dextrozyme产品中含有糖化酶时。此时可以加入acarbose来抑制糖化酶的活力。

定量限：

溶解于醋酸缓冲液的样品：1.5 NPUN/g；

溶解于磷酸缓冲液的样品：15 NPUN/g。

方法的灵敏度依标准曲线的斜率给出：2.75吸光度/（NPUN/mL）。

5 仪器

5.1 手动方法

带循环水装置的恒温水浴

分光光度计，通带4nm

分析天平

稀释器（如Hamilton Microlab 1000）

pH计

秒表

漩涡振荡器

离心机

10 mL塑料试管 (如 $H \times D = 100 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$)

5.2 自动方法

OBEA-机器人

pH计

分析天平

稀释器 (如Hamilton Microlab 1000)

10 mL塑料试管 (如 $H \times D = 100 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$)

十字转子

6 试剂

6.1 试剂

氯化钾 (如 Merck 4936)

三水合醋酸钠 (如 Merck 6267)

红普鲁兰 (如 Megazyme)

乙醇, 99.8% (如 Merck 1.00983)

一水合磷酸二氢钠 (如 Merck 6346)

标准氢氧化钠溶液 (如 Merck 9956)

标准盐酸钠溶液 (如 Merck 9970)

Glucobay片剂 (如 Bayer)

6.2 溶液

6.2.1 KCl 溶液, 0.5 mol/L

如配制1 000mL:

KCl 37.30 g

去离子水 定容到1 000 mL

贮存: 室温下一个月。

6.2.2 红普鲁兰底物

如配制100 g:

红普鲁兰 2.0 g

KCl溶液 (溶液 6.2.1) 加至 100.0 g

贮存: 当天配制, 手动方法时使用的最高温度不超过10°C。

6.2.3 终止反应试剂, 99.8% w/w 乙醇

使用市售的99.8%乙醇溶液作为终止液。

6.2.4 醋酸缓冲液, 0.1 mol/L pH 4.5

如配制5 000 mL:

三水合醋酸钠 68.04 g

去离子水 定容到5 000 mL

定量称取三水合醋酸钠并溶解在约4 500 mL的去离子水中, 用约4 mol/L的HCl调节pH到4.50±0.05, 然后再用去离子水定容到5 000mL。

贮存: 室温下一周。

6.2.5 磷酸缓冲液, 0.02 mol/L pH 6.5

如配制1 000 mL:

NaH₂PO₄·H₂O 2.76 g
去离子水 定容到1 000 mL

定量称取NaH₂PO₄·H₂O并溶解到约900 mL去离子水中, 用约4 mol/L的NaOH调节pH到6.50±0.05, 然后再用去离子水定容至1 000mL。

贮存: 每日新鲜配制。

6.2.6 Acarbose 溶液

如配制150 mL:

Glucobay片剂 适量
MilliQ水 定容到 250 mL

取一定量Glucobay片剂到150 mL容量瓶中, 用MilliQ水定容到刻度线。搅拌15分钟至完全溶解, 然后过滤分装, 冷冻保存。

贮存: 冷冻下一个月。溶解后不许再次冷冻使用。

6.2.7 HCl, 4 mol/L

如配制250 mL:

Titrisol (Merck 9970) 一袋
去离子水 定容到 250 mL

贮存: 室温下六个月。

6.2.8 NaOH, 4 mol/L

如配制250 mL:

Titrisol (Merck 9956) 一袋
去离子水 定容到 250 mL

贮存: 室温下六个月。

7 样品和标准

7.1 标准

标准贮备液

精确称取Promozyme D标准品63-1197 (标识活性258 NPUN-P/g) 到100 mL容量瓶中, 用醋酸缓冲液(6.2.4)定容。搅拌15分钟备用。稀释液中的酶活力为2.25 NPUN/mL。

标准工作液

按下表配制标准工作液:

标准液编号	NPUN/mL	贮备液 μL	醋酸缓冲液(6.2.4) μL
1	0.150	100	1 400
2	0.195	130	1 370
3	0.240	160	1 340
4	0.285	190	1 310
5	0.330	220	1 280
6	0.375	250	1 250

标准贮备液和工作液必需每日新鲜配制。

7.2 标准对照

以一已知酶活力的样品(如Promozyme D标准品)作为标准对照。

如称取1.10 g的Promozyme D标准品63-1197到100 mL容量瓶中，用醋酸缓冲液（6.2.4）定容。搅拌15分钟。然后再用醋酸缓冲液（6.2.4）稀释10倍备用。

每次分析的所有样品前后各加一个标准对照。如样品数大于20，则每20个加一个。

标准对照液必须每天重新配制。

7.3 样品

根据待测样品的预测酶活力确定其稀释倍数，使得最终稀释液中酶活力在0.29 NPUN/mL左右。样品的称样量建议在（0.5-1.0）g。

样品最小的稀释倍数为10（1 g样品到10 mL）。

可以使用分析管理程序来自动计算样品的称样量和稀释倍数。

第一次称取时样品可直接称取到容量瓶中，用醋酸缓冲液（6.2.4）溶解定容。二次稀释可直接稀释到样品杯中，所需体积为1.5mL。

含有菌体的样品的处理（如：发酵样品、培养基和混浊的回收样品）：含有菌体的样品要用磷酸缓冲液（6.2.5）溶解。将样品称取到容量瓶中，加入磷酸缓冲液（6.2.5）搅拌30分钟溶解。然后再用醋酸缓冲液（6.2.4）稀释到指定浓度。样品的二次稀释最少10倍，以保证最终稀释液的pH为4.5。

如果结果要以单位NPUN/mL给出，可以用样品的密度折算。

除非另有约定，样品的分析次数按照最新版本的EB-SP-0598.02第一栏的要求执行。

8 试验步骤

8.1 分析管理程序

分析管理程序用来给出建议的样品称量和稀释倍数。

将样品的信息输入到程序中，打印工作单。

按照工作单的建议称取和稀释样品。

将样品的真实称重输入到程序中，试验完成后输入吸光度，程序会自动计算出样品的活力，同时打印出标准曲线。

8.2 标准曲线和酶样品的测量

每个称量作平行样，然后分别按照以下的手动方法和自动方法测量。

使用醋酸缓冲液（6.2.4）作为试剂空白。

手动方法

吸取样品、标准品或水平对照，到10 mL的试管中	1.50 mL
在Dextrozyme样品中加入Acarbose溶液（溶液6.2.6）	40 uL
在试管中以一定的时间间隔（15-20）s加入底物（溶液6.2.2）	0.75 mL
用漩涡振荡器将溶液混匀，然后放入50℃水浴中	
50℃水浴中反应	30 min
以同样的时间间隔加入终止反应液（溶液6.2.3）	3.75 mL
用漩涡振荡器剧烈振荡使反应充分	
将试管在室温下放置	（15-60）min
4 000 rpm（约3 180 g）离心	10 min
15 min 后分光光度计分别先用去离子水和空白调零，再以酶空白为参比测定样品的OD值。 样品在测量前最多能稳定60 min。	510 nm

自动方法

在试管底部分别放置一个十字转子，然后吸取样品、标准品或水平对照，到试管中	1.50 mL
在Dextrozyme样品中加入Acarbose溶液（溶液6.2.6）	40 uL
将试管放到机器人的试管架上	
自动步骤	
机械臂将试管转移到底物单元，在搅拌的同时加入底物（溶液6.2.2）	0.75 mL
机械臂将试管转移到保温单元，同时搅拌	30 min
机械臂将试管转移到加入反应终止液（溶液6.2.3）的部位	3.75 mL
机械臂将试管转移到离心单元，等温度降至室温后在4 000 rpm下（约3 180 g）离心15 min	（15-60）min
机械臂将试管转移到分光光度计的吸液器上，以水为参比测定OD值 测定在离心后的（15-60）min内进行	510 nm

9 计算

9.1 计算

以酶活力为X轴、相应的光吸收为Y轴依标准工作点的试验值绘制标准曲线，最后回归为3次方程。样品稀释液的活力依测定的吸光度从标准曲线上读出。

样品的活力依下式计算：

$$\text{样品活力 NPUN/g} = \frac{S \times V \times F}{W}$$

式中：

S —— 由线性回归计算出的最终稀释液的酶活力，NPUN/mL

V —— 容量瓶容积，mL

F —— 稀释因子

W —— 样品量，g

如结果需要以NPUN/mL表示，可利用样品的密度作以下转换：

$$\text{NPUN/mL} = \text{NPUN/g} \times \text{密度 (g/mL)}$$

例：

在100 mL容量瓶中用缓冲液溶解1.0530 g样品，进一步稀释25倍。由标准曲线读出稀释样品的酶活力0.248 NPUN/mL。则：

$$\text{样品酶活力NPUN/g} = \frac{0.248 \text{ NPUN/mL} \times 100 \times 25}{1.0530 \text{ g}} = 589 \text{ NPUN/g}$$

9.2 结果批准

一组实验数据需要被认可则首先必须满足标准对照的试验值与标识值之间的偏离必须小于10%。

标准曲线由——6个标准点、每个标准点作平行测定——共12个点组成。标准曲线的相关系数必须大于0.995。如符合该条件，则不能删除标准曲线上任何一点；如不满足，可考虑删除必要的点，但最终的标准曲线必须要不少于9个点。

所有样品结果的相对标准差(%RSD)必须小于10%。在这种情况下,可以计算所有结果的平均值。如不满足条件,可按照当地SOP的方法处理。

9.3 分析结果的表示

结果 ≥ 10 NPUN/g,则给出3位有效数字(如112 NPUN/g或12.2 NPUN/g);

1 NPUN/g \leq 结果 < 10 NPUN/g,则给出2位有效数字(如9.3 NPUN/g);

结果 < 1 NPUN/g,则给出1位有效数字(如0.6 NPUN/g)。

10 精确度和准确度

样品的准确度是通过外加定量的普鲁兰酶标准品确认的。对Promozyme样品为102%,对Dextrozyme样品为127%。

通过在6天中分析10个样品、每个样品两个称量得出方法的变异系数为4.6%。通过在一天中分析10个样品、每个样品6个称量得出方法的重复性为1.2%。

11 参考文献

文献1: KAL-SM-1013: Determination of Pullulanase activity in Promozyme and Dextrozyme. Luna No. 1997-01768.

文献2: Validation report. Validation of Pullulanase Assay, EB-SM-0420 Luna No. 2000-04957-01. Sine/AWB/2000-06-16

文献3: EB-SP-0598.02, Sample Types

文献4: Automation of the Promozyme D (NPUN) method, GI, Luna no. 2000-00240-01

文献5: Determination of CV% for the NPUN analysis, AWB, Luna no. 2000-07206-01

文献6: Harmonisation of the manual NPUN method to the robotic NPUN method, DNJ, Luna no. 2001-11410-01

12 存档

所有文件按照本地的SOP要求存档。

13 意外情况

所有与此SOP不符的情况均应与相应的方法工程师联系并记录在案。