Определение подачи активности фитазы - Спектрофотомерия

1. **Применение**

Этот метод описывает процедуру для определения активности в кормах фитазы с помощью спектрофотомерии.

Этот метод применяется к цималетической жидкости и продуктов фитазы его используют в качестве кормовой добавки. Минимальное обнаруживаемое количество образца составляет 90U / кг.

**2. Ссылки**

<GB / T 18634-2009 Определение активности подачи фитазы

**3. Определение активности элемента фитазы**

Одна единица фитазы (U) определяется как количество фермента, которое высвобождает 1μmol неорганического фосфора в минуту от 5,0 ммоль / л фитата натрия при температуре 37 ° С и при рН 5,5.

**4. Принцип**

При определенной температуре и рН, фитазы высвобождают ортофосфат и инозитола деривант из фитата натрия, вступают в реакцию с молибдатом аммония добавляют / реагент до получения желтого цвета комплекса [(NH4) 3PO4NH4VO3 · 16MoO3]. Концентрация этого окрашенного комплекса определяется спектрофотометрически на длине волны 415 нм и прямо пропорциональна концентрации фитазы в образце.

**5. Реагенты и растворы**

Все используемые реагенты аналитической степени чистоты используется с помощью дистиллированной воды, если не указано иное.

Моющее средство для очистки стеклянной посуды должен быть свободно от фосфора.

**Реагенты:**

**5,1 0,25 моль / л ацетатного буфера (Ⅰ)**

Взвешивают 34,02 г ацетата натрия (тригидрат) в химическом стакане и растворяют в 900 мл дистиллированной воды. Количественно переносим в 1 л мерную колбу, доводим рН до 5,5 ± 0,01 с помощью уксусной кислоты (приблизительно 4,25 мл), и доводим до объема дистиллированной водой. Буферный раствор должен быть выдержан при комнатной температуре в течение двух месяцев.

**5,2 0,25 моль / л ацетатного буфера (Ⅱ)**

Взвесить 34.02g (тригидрат), растворяем в дистиллированной воде в стакане, добавляем 0.5 г Тритона Х-100 и 0,5 г БСА, и растворяем приблизительно с 900 мл дистиллированной воды. Количественно переносим на 1 л в мерную колбу, доводим рН до 5,5 ± 0,01 с помощью уксусной кислоты (приблизительно 4.25ML) и доводим до объема дистиллированной водой.

Буферный раствор необходимо хранить при комнатной температуре в течение двух месяцев.

**5,3 7,5 ммоль / л фитата натрия**

Взвесить 0.6929 фитата г натрия (C6H6O24P6Na12) и растворяем с 0,25 моль / л буферного раствора ацетата (I) в 100 мл мерную колбу. Отрегулируем рН до 5,5 с помощью приблизительно 200 мкл уксусной кислоты, и доводим до объема с 0,25 моль / л буферного раствора ацетата (I). Этот раствор должно быть свежеприготовленным.

(Фактическая конечная концентрация в реакционном растворе составляет 5,0 ммоль / л)

**5.4 разбавленный раствор азотной кислоты**

При перемешивании медленно добавляем азотную кислоту в дистиллированную воду при соотношении 1: 2.

**5,5 раствора молибдата аммония - 100 г / л**

Взвешиваем 10 г аммиака молибдата тетрагидрат [(NH4) 6Mo7O24 & bull; 4Н2О] и растворяем в дистиллированной воде в 100 мл мерную колбу. Добавляем 1,0 мл гидроксида аммония (25%) и доводим до объема дистиллированной водой. Этот раствор следует хранить в холодильнике.

**5.6 Аммоний Vanadate раствор - 2,35 г / л**

Взвесить 0,235 г аммоний метаванадат (NH4VO3) и растворяем в дистиллированной воде при 60 ° С в коричневом стакане 100 мл. При перемешивании медленно добавляем 2 мл разбавленного раствора азотной кислоты и охлаждаем до комнатной температуры. Количественно перелить в 100 мл мерную колбу, доводя до объема дистиллированной водой и перемешиваем.

Это раствор может храниться в течение одной недели в холодильнике экранированным от света.

**5.7 Смещенный распад цвета**

Смешайте разбавленный раствор азотной кислоты, раствор молибдата аммония и ванадата аммония раствор в соотношении 2: 1: 1. Всегда используйте свежеприготовленный раствор.

**5.8 Стандартный образец фитазы (знак точной единица активности и тип)**

KH2PO4: стандартное вещество.

**6. Аппаратура и оборудование**

**6.1 Общие лабораторные приборы и оборудование**

**6.2 Водяная баня: 37 ± 0.1ºC**

**6.3 Спектрофотометр: спектрофотометр устанавливается при 415 нм, с 10 мм кювету,**

**6.4 Магнитная мешалка**

**6.5 рН метр: 0,01 Чувствительность**

**6.6 Центрифуга: свыше 4000 оборотов в минуту**

**7. Подготовка образцов**

Возьмите репрезентативные образцы и уплотнение в сосудах, для того чтобы предотвратить загрязнение.

**8. Порядок и процедура**

**8.1 Стандартная кривая**

Тщательно взвесить 0.6804 г KH2PO4 в сухом виде до постоянного веса при 105ºC в печи. Растворите с 0,25 моль / л ацетатного буфера (II) в 100 мл мерной колбе и доводим до нужного объема. Концентрацию исходного раствора составляет 50,0 ммоль / л. Выполните следующие серийные разведения (таблица 1).

Таблица 1. Серийные разведения для получения стандартной кривой.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Стандартный порядковый номер | Исходный раствор (мл) | Буферный раствор (II) | Фосфор  концентрация  (Мкмоль / мл) | Количество фосфора (мкмоль) |
| 1 | 0.5 | 1 | 25.0000 | 2.50000 |
| 2 | 0.5 | 2 | 12.5000 | 1.25000 |
| 3 | 0.5 | 4 | 6.2500 | 0.62500 |
| 4 | 0.5 | 8 | 3.1250 | 0.31250 |
| 5 | 0.5 | 16 | 1.5625 | 0.15625 |

Примечание: Стандартная кривая должна быть перерисована при использовании другой партии реагентов для натрия, кроме фитата и распада цветового решения, которое должно быть свежеприготовленным.

**8.2 Приготовление растворов образцов**

**а. Твердый образец:** взвешиваем образец точно в пределах 0,0001 г, растворяем приблизительно с 70 мл ацетатного буфера (II) в 100 мл мерной колбе, перемешиваем раствор с помощью магнитной мешалки в течение 30 минут при высокой скорости или вручную встряхиваем до полного растворения, подождать 30 минут, и довести до объема ацетатным буфером (II) (вычесть объем с помощью магнитной колотушки). Хорошо перемешайте и поставьте в центрифугу на 4000 оборотов в минуту в течение 10 минут. Возьмите немного супернатанта, чтобы разбавить его ацетатным буфером (II) до приблизительно 0,25 ед / мл для последующего использования.

б. Zymolytic жидкость: Возьмите Zymolytic жидкую пробу поставьте в центрифугу при скорости 4000 оборотов в минуту на 10 мин. Возьмите немного супернатанта, чтобы разбавить ацетатным буфером (II) до приблизительно 0,25 ед / мл для последующего использования.

Таблица 2. Предлагаемое время разбавления.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Оценочная активность фермента (U/g) | Разбавление | Замечания |
| 500 | 1,000 | Возьмите 0,1 мл  разбавленный  раствор для  экспертизы |
| 1,000 | 1,000 |
| 2,500 | 5,000 |
| 5,000 | 5,000 |

Рекомендации: Для того, чтобы проверить, есть ли отклонение от стандартной процедуры, предлагается использовать фитазы с известной активностью в качестве контроля при исследовании образцов.

**8.3 Реакция**

Используйте 10 мл пробирку для проведения анализа в соответствии с методикой в ​​таблице 3.В течении реакции, интервал времени для добавления реагентов для гидролиза при температуре 37 ° С в течение 30 минут должен быть таким же, начиная с шага для добавления фитазы натрия.

Процесс реакции и объем реагента и раствора, являются следующие смотрите Таблицу 3

Таблица 3. Процедура реакции и требуемые количества реагентов.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Меры(шаги) | Образец или Стандарты | Образец бланка (стандартный образец) |
| 1.Добавить ацетатный буфер | 0.9 mL | 0.9 mL (1.0 mL) |
| 2. Добавить реакционный раствор | 0.1 mL | 0.1 mL |
| 3. Перемешать | √ | √ |
| 4. Pre-heat at 37ºC for 5 minutes | √ | √ |
| 5.Add sodium phytate solution in sequence | 2 mL | 2 mL(step 2) |
| 6. Mix | √ | √ |
| 7.Разогревать до 37ºC в течении 30 минут | √ | √ |
| 8.Последовательно добавить раствор распада цвета. | 2 mL | 2 mL (step 1) |
| 9. Смешать | √ | √ |
| Общий объем | 5 mL | 5 mL |

**8.4 Измерения**

Стенд пробирки в течение 10 минут после того, как произошла реакция. Если есть помутнение в трубках, воспользуйтесь центрифугой при 4000 оборотов в минуту в течение 10 минут. Возьмите супернатанты из пробирок, установить длину волны при 415 нм в спектрофотометре, сделайте чтение оптической плотности до нуля, используя стандартный бланк, измерьте поглощение образца заготовки (A0) и образца (А). И, наконец, вычислить активность фитазы, используя уравнение линейной регрессии.

**9. Расчет и выражение результатов**

Активность фитазы в испытанных образцах выражается единицу активности (U) на грамм (или миллилитр) образца. Формула расчета приведена ниже:

**Активность фитазы (Ед / г) = C × F / (м × 30 × 0,1)**

Где,

C: Y значение, которое вычисляется по измеренной оптической плотности с помощью уравнения линейной регрессии.

F: Общее количество раз разбавления образцов до реакции.

м: Масса образца (г)

Время реакции в минутах: 30

0,1: 0,1 мл разбавление фермента.