

土壤酸性木聚糖酶（Soil Acidic Xylanase, S-ACX）测定

试剂盒说明书

微量法100T/48S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

木聚糖酶(EC 3.2.1.8)主要由微生物产生，能催化水解木聚糖，也被称为戊聚糖酶或半纤维素酶，可分解酿造或饲料工业中的原料细胞壁以及β-葡聚糖，降低酿造中物料的粘度，促进有效物质的释放，以及降低饲料中的非淀粉多糖，促进营养物质的吸收利用，因而广泛的应用于酿造和饲料工业中，ACX一般分离自耐酸的真菌，细菌及部分霉菌。

测定原理：

ACX在酸性环境下能将木聚糖降解成还原性寡糖和单糖，进一步在沸水浴条件下与3,5-二硝基水杨酸发生显色反应，在540nm处有特征吸收峰，反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比，通过测定反应液在540nm吸光值增加速率，可计算ACX活力。

自备实验用品及仪器：

天平、常温离心机、震荡仪、恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板。

试剂组成和配制：

缓冲液：液体10mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体3mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体10mL×1瓶，4℃避光保存。

样品处理

新鲜土样风干，过30-50目筛。

测定操作表：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至540nm。
2. 操作表

	对照管	测定管
土样 (g)	0.02	0.02
缓冲液 (μL)	150	100
试剂一 (μL)		50
混匀，50℃震荡反应30min，立即90℃水浴10min，8000g，25℃离心10min，取上清100μL		
试剂二 (μL)	100	100

混匀，90°C水浴中显色5min，取180μL于微量石英比色皿/96孔板测定540nm处吸光值A，分别记为A对照管、A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

S-ACX计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 2.5554x - 0.002$ ， $R^2 = 0.9983$

酶活定义：50°C，pH4.8条件下，每克土壤每天分解木聚糖产生1μmol还原糖所需的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-ACX活力} (\mu\text{mol/d/g土样}) &= (\Delta A + 0.002) \div 2.5554 \times V_{\text{反总}} \times 103 \div W \div T \div 150 \\ &= 18.78 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

V反总：反应总体积，0.15mL；T：反应时间，1/48d；1000：1mmol/L=103μmol/L；150：木糖分子量。

b. 用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 1.2777x - 0.002$ ， $R^2 = 0.9983$

酶活定义：50°C，pH4.8条件下，每克土壤每天分解木聚糖产生1μmol还原糖所需的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-ACX活力} (\mu\text{mol/d/g土样}) &= (\Delta A + 0.002) \div 1.2777 \times V_{\text{反总}} \times 103 \div W \div T \div 150 \\ &= 37.56 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

V反总：反应总体积，0.15mL；T：反应时间，1/48d；1000：1mmol/L=103μmol/L；150：木糖分子量。

注意事项

1. 保证震荡反应30min，使酶与底物充分接触。
2. 注意90°C水浴防止爆开，以免改变反应体系。