

中华人民共和国行业标准

蛋白酶活力测定法

SB/T 10317-1999

代替 ZB X 66030-87

Measurement of proteinase activity

本方法适用于酿造酱油时在制品菌种、成曲的蛋白酶活力测定。

1 福林法

1.1 试剂及溶液: 以下试剂都为分析纯

1.1.1 福林试剂 (Folin 试剂): 于 2000mL 磨口回流装置内, 加入钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100g, 钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25g, 蒸馏水 700mL, 85% 磷酸 50mL, 浓盐酸 100mL, 文火回流 10h。取去冷凝器, 加入硫酸锂 (Li_2SO_4) 50g, 蒸馏水 50mL, 混匀, 加入几滴液体溴, 再煮沸 15min, 以驱逐残溴及除去颜色, 溶液应呈黄色而非绿色。若溶液仍有绿色, 需要再加几滴溴液, 再煮沸除去之。冷却后, 定容至 1000mL, 用细菌漏斗 (No4~5) 过滤, 置于棕色瓶中保存。此溶液使用时加 2 倍蒸馏水稀释。即成已稀释的福林试剂。

1.1.2 0.4mol 碳酸钠溶液: 称取无水碳酸钠 (Na_2CO_3) 42.4g, 定容至 1000mL。

1.1.3 0.4mol 三氯乙酸 (TCA) 溶液: 称取三氯乙酸 (CCL_3COOH) 65.4g, 定容至 1000mL。

1.1.4 pH7.2 磷酸盐缓冲液: 称取磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 31.2g, 定容至 1000mL, 即成 0.2mol 溶液 (A 液)。称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 71.63g, 定容至 1000mL, 即成 0.2mol 溶液 (B 液)。

取 A 液 28mL 和 B 液 72mL, 再用蒸馏水稀释 1 倍, 即成 0.1mol pH7.2 的磷酸盐缓冲液。

1.1.5 2% 酪蛋白溶液: 准确称取干酪素 2g, 称准至 0.002g, 加入 0.1N 氢氧化钠 10mL 在水浴中加热使溶解 (必要时用小火加热煮沸), 然后用 pH7.2 磷酸盐缓冲液定容至 100mL 即成。配制后应及时使用或放入冰箱内保存, 否则极易繁殖细菌, 引起变质。

1.1.6 100 μg /mL 酪氨酸溶液: 精确称取在 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘至恒重的酪氨酸 0.1000g, 逐步加入 6mL 1N 盐酸使溶解, 用 0.2N 盐酸定容至 100mL, 其浓度为 1000 μg /mL, 再吸取此液 10mL, 以 0.2N 盐酸定容至 100mL, 即配成 100 μg /mL 的酪氨酸溶液。此溶液配成后也应及时使用或放入冰箱内保存, 以免繁殖细菌而变质。

1.2 仪器

- 分析天平: 感量 0.1mg;
- 581-G 型光电比色计或 72 型分光光度计;
- 水浴锅;
- 1、2、5、100mL 移液管等。

1.3 操作

1.3.1 标准曲线的绘制

1.3.1.1 按下表配制各种不同浓度的酪氨酸溶液(表1)。

表1 配制各种不同浓度的酪氨酸溶液

试 剂	管 号					
	1	2	3	4	5	6
蒸馏水, mL	10	8	6	4	2	0
100 μ g/mL 酪氨酸, mL	0	2	4	6	8	10
酪氨酸最终浓度, μ g/mL	0	20	40	60	80	100

1.3.1.2 测定步骤: 取6支试管编号按表1分别吸取不同浓度酪氨酸1mL, 各加入0.4mol 碳酸钠5mL, 再各加入已稀释的福林试剂1mL。摇匀置于水浴锅中。40℃保温发色20min 在581-G型光电比色计上分别测定光密度(OD)(滤色片用65°)或用72型分光光度计进行测定(波长660nm)。一般测定三次, 取平均值。将1~6号管所测得的光密度(OD)减去1号管(蒸馏水空白试验)所测得的光密度为净OD数。

为了清楚起见, 再列表格如下(表2)。

表2

试 剂	管 号					
	1	2	3	4	5	6
按表1制备的不同浓度酪氨酸, mL	1	1	1	1	1	1
0.4mol/L Na_2CO_3 , mL	5	5	5	5	5	5
福林试剂, mL	1	1	1	1	1	1
OD 值	1					
	2					
	3					
	平均					
净 OD 值	0					

以净OD值为横坐标, 酪氨酸的浓度为纵坐标, 绘制成标准曲线(或可求出每度OD所相当的酪氨酸量K)。

1.3.2 样品稀释液的制备。

1.3.2.1 测定酶制剂: 称取酶粉0.100g, 加入pH7.2磷酸盐缓冲液定容至100mL, 吸取此液5mL, 再用缓冲液稀释至25mL, 即成5000倍的酶粉稀释液。

1.3.2.2 测定成曲酶: 称取充分研细的成曲5g, 加水至100mL, 在40℃水浴内间断搅拌1h, 过滤, 滤液用0.1molpH7.2磷酸盐缓冲液稀释到一定倍数(估计酶活力而定)。

1.3.3 样品测定: 取15×100mm试管3支, 编号1、2、3(做2只也可), 每管内加入样品稀释液1mL, 置于40℃水浴中预热2min, 再各加入经同样预热的酪蛋白1mL, 精确保温10min, 时间到后, 立即再各加入0.4mol 三氯乙酸2mL, 以终止反应, 继续置于水浴中保温20min, 使残余蛋白质沉淀后离心或过滤, 然后另取15×150mm试管3支, 编号1、2、3, 每管内加入滤液1mL, 再加0.4mol 碳酸钠5mL, 已稀释的福林试剂1mL摇匀, 40℃保温发色20min后进行光密度(OD)测定。

空白试验也取试管 3 支, 编号 (1)、(2)、(3), 测定方法同上, 唯在加酪蛋白之前先加 0.4mol 三氯乙酸 2mL, 使酶失活, 再加入酪蛋白。

为了清楚起见, 分别列出表格于下 (见表 3 及表 4)。

表 3

试 剂	管 号			试 剂	管 号		
	1	2	3		(1)	(2)	(3)
预热酶液, mL	1	1	1	预热酶液, mL	1	1	1
预热 2%酪蛋白, mL	1	1	1	0.4mol 三氯乙酸, mL	2	2	2
作用 10min (精确计时)				作用 10min (精确计时)			
0.4mol 三氯乙酸, mL	2	2	2	预热 2%酪蛋白, mL	1	1	1

表 4

试 剂	管 号					
	1	2	3	(1)	(2)	(3)
滤液, mL	1	1	1	1	1	1
0.4mol Na ₂ CO ₃ , mL	5	5	5	5	5	5
福林试剂, mL	1	1	1	1	1	1
OD 值						
平均 OD 值						
净 OD 值				0		

样品的平均光密度 (OD) - 空白的平均光密度 (OD) = 净 OD 值。

1.4 计算

在 40℃ 下每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸, 定义为 1 个蛋白酶活力单位。

样品蛋白酶活力单位 (干基) = $\frac{A}{10} \times 4 \times N \times \frac{1}{1-W}$ (1)

式中: A——由样品测得 OD 值, 查标准曲线得相当的酪氨酸微克数 (或 OD 值 $\times K$);

4——4 毫升反应液取出 1mL 测定 (即 4 倍);

N——酶液稀释的倍数;

10——反应 10min;

W——样品水分百分含量。

1.5 注意事项

以上介绍的方法用于测定中性蛋白酶 (pH7.2)。若要测定酸性蛋白酶或碱性蛋白酶, 则把配制酪蛋白溶液和稀释酶液用的 pH 缓冲液换成相应 pH 缓冲液即可。现将几种常用 pH 缓冲液配方提供如下:

1.5.1 pH7.5 磷酸盐缓冲液 (0.02mol/L)

称取磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄ · 12H₂O) 6.02g 和磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄ · 2H₂O) 0.5g 以蒸馏水溶

解定容至 1000mL。

1.5.2 pH2.5 乳酸-乳酸钠缓冲液 (0.05mol)

A 液: 称取 80%~90% 乳酸 10.6g, 加蒸馏水稀释定容至 1000mL。

B 液: 称取 70% 乳酸钠 16g, 加水稀释定容至 1000mL。

取 A 液 16mL 与 B 液 1mL 混合稀释一倍即成。

1.5.3 pH3.0 乳酸-乳酸钠缓冲液 (0.05mol)

A 液: 称取 80%~90% 乳酸 10.6g, 以水定容至 1000mL。

B 液: 称取 70% 乳酸钠 16g, 蒸馏水溶解定容至 1000mL。

取 A 液 8mL 与 B 液 1mL, 混合稀释一倍即成。

1.5.4 pH10 硼砂-氢氧化钠缓冲液

A 液: 称取硼砂 19.08g, 用蒸馏水溶解定容至 1000mL (0.05mol)。

B 液: 称取氢氧化钠 8g, 用蒸馏水溶解定容至 1000mL (0.2N)。

取 A 液 250mL, B 液 215mL 混合, 用蒸馏水稀释定容至 1000mL 即成。

1.5.5 pH11.0 硼砂-氢氧化钠缓冲液

A 液: 称取硼砂 19.08g, 用蒸馏水定容至 1000mL。

B 液: 称取氢氧化钠 4g, 用蒸馏水定容至 1000mL。

取 A 液与 B 液等量混合。

1.5.6 2% 酪蛋白溶液配成酸性时, 须先加数滴浓乳酸, 使之湿润以加速其溶解。

2 甲醛法

成曲蛋白酶活力的测定, 如用福林法测定确有困难时, 可用甲醛法测定作过渡。

2.1 仪器

- 分析天平: 感量 0.01g;
- 水浴锅;
- 电烘箱;
- 容量瓶、吸管、滴定管等。

2.2 试剂与溶液

- 1% 酚酞指示剂;
- 0.1% 麝香草酚蓝;
- 0.1N 氢氧化钠液、甲醛 (试剂配制法同氨基态氮的测定, 见 GB/T 5009.39-1996 氨基态氮测定法)。

2.3 操作

2.3.1 目测法

称取研细均匀的成曲样品 10g, 放入 250mL 锥形瓶中, 加 55℃ 温水 80mL, 充分摇匀, 置于 55℃ 水浴锅中保温 3h, 取出后加热煮沸以破坏酶活力, 冷却后定容至 100mL, 充分摇匀后以脱脂棉过滤, 吸取滤液 10mL, 移至 150mL 锥形瓶中, 加水 50mL, 1% 酚酞指示剂 0.2mL, 以 0.1N 氢氧化钠标准溶液滴定至刚显微红色 (pH8.2), 记下滴定数作为总酸, 继续加甲醛 10mL, 用 0.1N 氢氧化钠液滴定至深红色 (pH8.5) 为终点, 若再加麝香草酚蓝 1mL 作指示剂, 则滴至紫红色为终点。记下滴定数, 减去空白数后计算成氨基态氮。另称取曲 10g 做水分, 再折算成干基数。

2.3.2 酸度计法

所用仪器、药品、操作方法等与氨基态氮测定法同 (见 GB/T 5009.39-1996)。

2.4 计算

蛋白酶活力 (克氨基酸氮/100g) (干基)

$$= \frac{(V - V_0) \times N \times 0.014}{10 \times \frac{10}{100}} \times \frac{100}{1 - W} \dots\dots\dots (2)$$

式中: V ——加入甲醛后氢氧化钠标准液滴定数, mL; V_0 ——甲醛空白滴定数, mL; W ——曲水分, %; N ——氢氧化钠标准溶液的当量数, N ;

0.014——氮的毫克当量数。

附加说明:

本标准由国家国内贸易局提出。

本标准由上海市酿造科学研究所起草。

本标准主要起草人须凤高。

• 本法实质上是在一定温度下、一定时间内,成曲利用自身的蛋白酶把自身原料中的蛋白质水解成氨基酸。以测定氨基酸氮的量来衡量蛋白酶活力的数值。在培养和堆放过程,环境温度和自身含有水分,故已有少量氨基酸生成。为了能和福林法的酶活力进行对照,可用空白试验以扣除此误差,方法是另取一曲样于开始时即将成曲酶活杀灭,其余操作步骤完全相同。杀酶的方法是把已煮沸的蒸馏水 70mL 倾入 10g 成曲中,并马上继续把成曲液煮沸几分钟,其余操作与样品同,成曲和甲醛的空白一起算成 V_0 。