

# 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 ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ) 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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 42.4g, 定容至 1000mL。

1.1.3 0.4mol 三氯乙酸 (TCA) 溶液: 称取三氯乙酸 ( $\text{CCL}_3\text{COOH}$ ) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 再吸取此液 10mL, 以 0.2N 盐酸定容至 100mL, 即配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 $\mu$ g/mL 酪氨酸, mL	0	2	4	6	8	10
酪氨酸最终浓度, $\mu$ 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 $^{\circ}$ ）或用72型分光光度计进行测定（波长660nm）。一般测三次，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，再列出表格如下（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 <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 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。