

ICS 67.220

X 66

备案号

Q B

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T XXX—20XX

代替SB/T 10317—1999

蛋白酶活力的测定

Determination of proteinase activity

(征求意见稿)

20XX-0X-0X 发布

20XX-0X-0X 实施

XXXXXXXXXX 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替SB/T 10317-1999《蛋白酶活力测定法》。与SB/T 10317-1999相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 修改了标准名称。
- 增加原理。
- 修改了试剂和材料。
- 修改了仪器和设备。
- 删除了甲醛法。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国调味品协会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- SB/T 10317-1999，ZB X 66030-87。

蛋白酶活力的测定

1 范围

本文件规定了酱油和黄豆酱的菌种、种曲、成曲酶活力的测定方法。
本文件适用于酱油和黄豆酱的菌种、种曲、成曲酶活力的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

3.1

中性蛋白酶活力单位 neutral protease active unit

在温度为40℃、pH值为7.2的条件下，在1min内水解酪蛋白产生相当于1μg酪氨酸的酶量，定义为1个中性蛋白酶活力单位。

3.2

酸性蛋白酶活力单位 acidic protease active unit

在温度为40℃、pH值为3.0的条件下，在1min内水解酪蛋白产生相当于1μg酪氨酸的酶量，定义为1个酸性蛋白酶活力单位。

3.3

碱性蛋白酶活力单位 alkaline protease active unit

在温度为40℃、pH值为10.5的条件下，在1min内水解酪蛋白产生相当于1μg酪氨酸的酶量，定义为1个碱性蛋白酶活力单位。

4 原理

蛋白酶在一定的温度与pH条件下，水解酪蛋白底物产生含有酚基的氨基酸（如：酪氨酸、色氨酸等），在碱性条件下，可将福林试剂（Folin）还原，生成钼蓝与钨蓝，其颜色的深浅与酚基氨基酸含量成正比。采用分光光度计（波长660nm）测定其吸光度，进而计算蛋白酶活力。

5 试剂和材料

5.1 试剂

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

5.1.1 钨酸钠（ $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）。

- 5.1.2 钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.1.3 硫酸锂 (Li_2SO_4)。
- 5.1.4 溴 (Br)。
- 5.1.5 无水碳酸钠 (Na_2CO_3)。
- 5.1.6 三氯乙酸 (CCl_3COOH)。
- 5.1.7 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.1.8 硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.1.9 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.1.10 干酪素。
- 5.1.11 氢氧化钠 (NaOH)。
- 5.1.12 酪氨酸 ($\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$)。
- 5.1.13 盐酸 (HCl)。
- 5.1.14 乳酸 ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$)。
- 5.1.15 乳酸钠 ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$)。

5.2 试剂配制

5.2.1 福林试剂 (Folin试剂)：可购买市售产品或自行配制，配制方式为：于2000 mL磨口回流装置内，加入钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100g，钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25 g，蒸馏水700 mL，85%磷酸50 mL，浓盐酸160 mL，文火回流10 h。取去冷凝器，缓慢加入硫酸锂 (Li_2SO_4) 50 g (防止过热状态下加入硫酸锂反应剧烈，导致溶液喷出)、水50 mL，混匀，加入2~3滴液溴，再煮沸15 min，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2~3滴溴液，再煮沸除去之。冷却后，定容至1000 mL，用细菌漏斗 (No4~5) 或中性滤纸过滤，置于棕色瓶中保存，有效期为1年。此溶液使用时加2倍水稀释，即成已稀释的福林试剂，现配现用。

5.2.2 碳酸钠溶液 (0.4 mol/L)：称取无水碳酸钠 (Na_2CO_3) 42.4 g，定容至1 000 mL。

5.2.3 三氯乙酸 (TCA) 溶液 (0.4 mol/L)：称取三氯乙酸 (CCl_3COOH) 65.4 g，定容至1 000 mL。

5.2.4 磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L，pH7.2)：称取磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 31.2 g，定容至1 000 mL，即成A液。称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 71.63 g，定容至1 000 mL，即为B液。取A液28 mL和B液72 mL，再用水稀释1倍，即为磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L，pH7.2)。

5.2.5 乳酸-乳酸钠缓冲液 (0.05 mol/L，pH3.0)：称取80%~90%乳酸10.6 g，定容至1 000 mL，即成A液。称取70%乳酸钠16 g，定容至1 000 mL，即为B液。取A液16 mL和B液1 mL，再用水稀释1倍，即为乳酸-乳酸钠缓冲液 (0.05 mol/L，pH3.0)。

5.2.6 硼砂-氢氧化钠缓冲液 (0.025mol/L，pH10.5)：称取硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 9.54g，氢氧化钠 (NaOH) 1.60g，加水900mL，搅拌均匀，用1mol/L盐酸溶液或0.5mol/L氢氧化钠溶液调整pH至10.5 \pm 0.05，定容至1 000mL。

5.2.7 酪蛋白溶液 (0.2g/L)：准确称取干酪素2 g (精确至0.002g)，加入氢氧化钠溶液 (0.1 mol/L) 10 mL并在水浴中加热使溶解 (必要时用小火加热煮沸)，然后用磷酸盐缓冲液 (pH=7.2) 定容至100 mL即成，此溶液用于检测中性蛋白酶活力。配制时将磷酸盐缓冲液 (pH=7.2) 更换为乳酸-乳酸钠缓冲液 (0.05 mol/L，pH3.0) 或硼砂-氢氧化钠缓冲液 (0.025mol/L，pH10.5)，则对应的酪蛋白溶液分别用于检测酸性蛋白酶活力、碱性蛋白酶活力。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，保存期不超过三天。

5.2.8 酪氨酸溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：准确称取在105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘至恒重的酪氨酸0.1000g (精确至0.0001g)，逐步加入6 mL盐酸溶液 (1 mol/L) 使其溶解，用盐酸溶液 (0.2 mol/L) 定容至100 mL，其浓度为1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，再吸取此液10 mL，以盐酸溶液 (0.2 mol/L) 定容至100 mL，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。

6 仪器和设备

- 6.1 天平：感量为0.1mg。
- 6.2 分光光度计：波长660nm。

预热酶液, mL	1	1	1	预热酶液, mL	1	1	1
预热0.2g/L酪蛋白溶液, mL	1	1	1	0.4 mol/L三氯乙酸, mL	2	2	2
40℃±1℃水浴保温并精确计时10min				40℃±1℃水浴保温并精确计时10min			
0.4 mol/L三氯乙酸, mL	2	2	2	预热0.2g/L酪蛋白溶液, mL	1	1	1

7.2 酸性蛋白酶活力的测定

将4.2.7及7.1中“磷酸盐缓冲液（0.1 mol/L, pH7.2）”改为“乳酸-乳酸钠缓冲液（0.05 mol/L, pH3.0）”，其他操作与7.1相同。

7.3 碱性蛋白酶活力的测定

将4.2.7及7.1中“磷酸盐缓冲液（0.1 mol/L, pH7.2）”改为“硼砂-氢氧化钠缓冲液（0.025mol/L, pH10.5）”，其他操作与7.1相同。

8 分析结果的表述

试样的蛋白酶活力按式（1）计算：

$$X = \frac{A}{10} \times 4 \times N \times \frac{1}{1-W} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——样品中蛋白酶活力单位（干基），单位为蛋白酶活力单位每克（U/g）或蛋白酶活力单位每毫升（U/mL）；

A ——由样品测得净吸光度，查标准曲线得相当的酪氨酸微克数（或净吸光度× 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（%）。

计算结果保留整数位。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。