

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4306—2023

木瓜、菠萝蛋白酶活性的测定 紫外分光光度法

Determination of activity of papain and bromelain—
Ultraviolet spectrophotometry

2023-02-17 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

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。

本文件由农业农村部农垦局提出。

本文件由农业农村部热带作物及制品标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院农产品加工研究所、农业农村部食品质量监督检验测试中心（湛江）、岭南师范学院。

本文件主要起草人：叶剑芝、韩志萍、潘晓威、李培、曾绍东、齐宁利、苏子鹏、刘元靖、马会芳、周伟、杨春亮、王标诗。



木瓜、菠萝蛋白酶活性的测定 紫外分光光度法

重要提示:使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施,并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件规定了木瓜、菠萝蛋白酶活性测定的紫外分光光度法。

本文件适用于木瓜、菠萝蛋白酶活性的测定。

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 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

酪蛋白在木瓜蛋白酶或菠萝蛋白酶的催化下,肽键发生断裂,生成的酪氨酸对 275 nm 的光具有吸收作用,吸收强度与蛋白酶的活性成正比,通过分光光度计测量吸光强度,转化为酪氨酸的含量,并据此计算酶活性。

5 试剂与材料

5.1 通用要求/试剂纯度等级

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.2 水

GB/T 6682,一级。

5.3 氢氧化钠溶液(1 mol/L)

按 GB/T 601 规定的方法配制与标定。

5.4 盐酸溶液(1 mol/L)

按 GB/T 601 规定的方法配制与标定。

5.5 盐酸溶液(0.1 mol/L)

按 GB/T 601 规定的方法配制与标定。

5.6 磷酸氢二钠溶液(0.05 mol/L)

称取磷酸氢二钠 7.098 g,精确至 0.001 g,加水溶解并定容至 1 000 mL。

5.7 盐酸半胱氨酸缓冲液(酶稀释液)

5.7.1 称取盐酸半胱氨酸 5.27 g,氯化钠 23.4 g,精确至 0.001 g,加水 500 mL 溶解。

5.7.2 称取乙二胺四乙酸二钠 2.23 g,精确至 0.001 g,加水 200 mL 溶解。

5.7.3 将 5.7.1 和 5.7.2 制备的溶液混合,再用 1 mol/L 氢氧化钠溶液(5.3)调节 pH 至 5.0~8.0,移到

1 000 mL 容量瓶中,加水定容至刻度并混匀。

5.8 酪蛋白溶液(底物溶液)

称取干燥至恒重的酪蛋白(NICBPB 国家药品标准物质)0.6 g,精确至 0.001 g,置于烧杯中,加 0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液(5.6)80 mL,水浴中加热溶解,放冷,用 1 mol/L 盐酸溶液(5.4)调节 pH 至 5.0~8.0,移到 100 mL 容量瓶中,加水至刻度并混匀,现配现用。

5.9 三氯乙酸溶液

称取三氯乙酸 1.8 g,无水醋酸钠 2.99 g,精确至 0.001 g,冰醋酸 1.9 mL,加水溶解并定容至 100 mL。

5.10 酪氨酸标准溶液(50 $\mu\text{g/mL}$)

称取 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的酪氨酸 0.100 0 g,精确至 0.000 1 g,加入 1 mol/L 的盐酸溶液(5.4)定容至 100 mL,制成 1 mg/mL 的酪氨酸溶液。吸取 1 mg/mL 酪氨酸溶液 5.0 mL,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.5)定容至 100 mL,制成 50 $\mu\text{g/mL}$ (C_n)的酪氨酸标准溶液。

6 仪器设备

6.1 紫外分光光度计:波长 200 nm~400 nm,并配石英比色皿。

6.2 天平:感量 0.001 g 和 0.0001 g。

6.3 移液器:1 mL、5 mL、10 mL。

6.4 恒温水浴锅:精度 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。

6.5 烘箱:精度 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

6.6 pH 计:精度 0.01。

6.7 离心机:转速可达 4 000 r/min,并配备 10 mL、15 mL 聚丙烯离心管。

6.8 其他常规仪器设备。

7 试样制备与保存

7.1 木瓜/菠萝蛋白酶溶液(待测酶液)

称取蛋白酶试样约 0.1 g(W),精确至 0.000 1 g,置于烧杯中,用约 50 mL 酶稀释液(5.7)溶解,将酶液转移至 100 mL 容量瓶中,加酶稀释液(5.7)至刻度,轻摇使均匀,转入广口瓶中保存待测。酶液配制完成后应立即检测活性,如不能立即检测,应在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,时间不应超过 24 h。使用前恢复至室温,充分轻摇。

7.2 阳性对照试样溶液

使用已知活性的木瓜/菠萝蛋白酶试样制备阳性对照试样溶液,按 7.1 进行配制,配制完成后应立即检测活性,如不能立即检测,应在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,时间不应超过 24 h。使用前恢复至室温,充分轻摇。

7.3 阴性对照试样溶液

取待测酶液(7.1)10.0 mL 于 15 mL 聚丙烯离心管中,在 100 $^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 烘箱(6.5)中灭活 15 min,冷却至室温,4 000 r/min 离心 15 min,取上层清液为阴性对照试样溶液,置于 10 mL 聚丙烯离心管,立即检测活性,如不能立即检测,应在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,时间不应超过 24 h。使用前恢复至室温,充分轻摇。

8 试验步骤

8.1 酪氨酸标准溶液测定

以 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.5)为空白,于波长 275 nm 测定酪氨酸标准溶液(5.10)吸光度(A_n)。

8.2 试样测定

取待测酶液(7.1)和底物溶液(5.8)各 10 mL 分别置于不同 15 mL 聚丙烯离心管中,37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴预热 5 min 后,精确量取预热待测酶液 1.0 mL 于 15 mL 聚丙烯离心管中,加入预热底物溶液 5.0 mL,轻摇混匀,37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 10 min 后,加入三氯乙酸溶液(5.9)5.0 mL,振摇,于室温下静

置 10 min, 4 000 r/min 离心 15 min。取上层清液置于 10 mL 聚丙烯离心管中, 2 h 内于波长 275 nm 处测定其吸光度(A)。

8.3 阳性/阴性对照试样测定

取阳性对照试样溶液(7.2)及阴性对照试样溶液(7.3)各 1.0 mL, 按照 8.2 中的测定方法, 检测 2 个对照试样的蛋白酶活性, 检测结果的相对误差应小于 3%。

8.4 试验空白测定

精确量取待测酶液(7.1)1.0 mL, 置于 15 mL 聚丙烯离心管中, 加入三氯乙酸溶液(5.9)5.0 mL, 轻摇, 37℃±0.5℃恒温水浴 10 min 后, 加入底物溶液(5.8)5.0 mL, 振摇, 室温下静置 10 min 后, 4 000 r/min 离心 15 min。取上层清液置于 10 mL 聚丙烯离心管中, 2 h 内于波长 275 nm 处测定其吸光度(A₀)。

9 结果计算

以 1 g 木瓜/菠萝蛋白酶 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活性单位, 用 U/g 表示。试样中木瓜/菠萝蛋白酶的活性(X)按公式(1)计算。

$$X = \frac{A - A_0}{A_n} \times \frac{C_n}{W \times 10} \times 11 \times N \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 木瓜/菠萝蛋白酶活性的数值, 单位为 U/g;
- A —— 待测酶液 275 nm 波长处吸光度;
- A₀ —— 空白 275 nm 波长处吸光度;
- A_n —— 标准溶液 275 nm 波长处吸光度;
- C_n —— 酪氨酸标准溶液浓度的数值, 单位为微克每毫升(μg/mL);
- W —— 试样取样量的数值, 单位为克(g);
- 10 —— 反应时间的数值, 单位为分(min);
- 11 —— 测定总体积的数值, 单位为毫升(mL);
- N —— 蛋白酶的稀释倍数。

试验结果以双份平行测定结果的平均值计, 保留整数。

10 精密度

2 次重复测定结果的差值小于算术平均值的 3%。

11 试验报告

试验报告应包括如下内容:

- a) 本报告编号;
- b) 标识试样所需的细节;
- c) 试验方法;
- d) 实验室温度和湿度;
- e) 所用仪器条件;
- f) 本文件未规定的任何操作之详情;
- g) 试验结果;
- h) 试样数;
- i) 试验过程任何异常现象;
- j) 试验日期。