

β-淀粉酶活力的测定

货号: S10006

保存温度: 2-8℃ 保存。

1 原理

在一定温度和 pH 下, β-淀粉酶从淀粉的非还原端每次切下一个葡萄糖。淀粉酶产生的这些还原糖能使 3, 5-二硝基水杨酸还原, 生成棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。淀粉酶活力的大小与产生的还原糖的量成正比。可以用麦芽糖制作标准曲线, 用比色法测定淀粉生成的还原糖的量, 以单位重量样品在一定时间内生成的还原糖的量表示酶活力。

2 试剂和溶液

2.1.1 0.2mol/L pH 5.5 的磷酸缓冲液

甲液: 称取十二水合磷酸氢二钠 53.65 g, 用蒸馏水溶解定容至 1000 mL;

乙液: 称取二水合磷酸二氢钠 27.80 g, 用蒸馏水溶解定容至 1000 mL;

取甲液 6.5 mL, 乙液 93.5 mL, 混合后以酸度计校正 pH 5.5 即成。

2.1.2 10% pH 5.5 磷酸缓冲液

取上列缓冲液 10 mL, 加入 90 mL 蒸馏水, 混匀即成。

2.1.3 DNS 试剂

称取 3, 5-二硝基水杨酸 1 g, 苯酚 0.2 g, 亚硫酸钠 0.05 g, 氢氧化钠 1 g, 酒石酸钾钠 20 g, 用蒸馏水加热溶解, 冷却定容至 100 mL, 贮于棕色瓶中, 放置 1 周后方可绘制标准曲线。

2.1.4 1.10 % 淀粉缓冲液

煮沸约 50 mL 蒸馏水, 加入到 1.10 g 淀粉的少量蒸馏水溶解液中, 再煮沸至透明, 冷却, 加 10 mL 0.2mol/L pH 5.5 磷酸缓冲液, 定容至 100 mL。

3 仪器和设备

3.1 分析天平: 感量 0.001 g。

3.2 精密 PH 计: 精确至 0.01。

3.3 磁力加热搅拌器。

3.4 分光光度计: 721 型。

3.5 电热恒温水浴锅: $60\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。

3.6 计时器: 每小时误差不超过 0.5s。

3.7 刻度吸管: 0.1 mL、0.5 mL、2 mL。

4 标准曲线的绘制

采用 DNS 半量法。准确称取于 $105\sim 110^{\circ}\text{C}$ 干燥后的葡萄糖 50 mg, 用蒸馏水溶解定容至 50 mL, 配成 1 mg/mL 葡萄糖液, 按下表 A.1 要求操作, 开水煮沸 15 min, 冷却, 加入 10.5 mL 蒸馏水, 用 721 分光光度计在 550 nm 下比色。

以 OD 值为纵坐标, 以葡萄糖量 mg 数为横坐标, 绘制标准曲线, 测得 OD 值后, 由图表查出相应的葡萄糖毫克 (mg) 数, 得常数 K, 再乘以 1.9 倍, 即为麦芽糖毫克 (mg) 数。

4.1 待测酶液的制备

准确称取一定量酶样, 用 10% 磷酸缓冲液溶解, 定容, 摇匀, 4 层纱布过滤, 滤液供测定用 (每毫升酶液约 20 u 为宜, OD 值控制在 0.2~0.4 之间)

表 1 葡萄糖标准曲线

| 编号 | 含葡萄糖量/mg | 葡萄糖液量/mL | 蒸馏水量/mL | DNS 液量/mL |
|----|----------|----------|---------|-----------|
| 空白 | 0 | 0 | 0.5 | 1.5 |
| 1 | 0.1 | 0.1 | 0.4 | 1.5 |
| 2 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 1.5 |
| 3 | 0.3 | 0.3 | 0.2 | 1.5 |
| 4 | 0.4 | 0.4 | 0.1 | 1.5 |
| 5 | 0.5 | 0.5 | 0 | 1.5 |

5 测定

取 3 支试管各加入 9 mL 1.10% 淀粉缓冲液预热 5 min, 立即在第一二试管各加入 1 mL 酶液, 立即计时, 60°C 准确反应 30 min, 迅速吸取 1 mL 反应液于装有 1.5 mL 的 DNS 溶液中 (采用 25 mL 具塞比色管), 沸水浴煮 15 min, 冷却, 加 10.5 mL 蒸馏水 (摇匀), 在 550 nm 波长比色。

第三支管为空白管, 蒸馏水代替酶液。

6 计算

β -淀粉酶酶活力, 按下式计算。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

$$\text{酶活力(u/mL 或 u/g)} = \text{OD} \times 2 \times 20 \times 1.9 \times \text{K} \times \text{n} = \text{OD} \times \text{K} \times 76 \times \text{n}$$

式中:

K----标准曲线常数;

n-----酶液的稀释倍数;

2-----反应 30 min, 换算成 60 min;

20----将吸取 0.5 mL 反应液换算成 10 mL;

1.9---葡萄糖换算成麦芽糖系数。

7 误差

平行试验结果的允许差不得超过 10%,标准曲线至少由五点组成。

8 稀释倍数

表 2 不同酶活力产品稀释倍数

| 酶活力 | 稀释倍数 | 一次稀释 | 二次稀释 |
|--------|-------|-----------|------------|
| 50000 | 2500 | 1g→250mL | 10mL→100mL |
| 100000 | 5000 | 1g→500mL | 10mL→100mL |
| 200000 | 10000 | 1g→1000mL | 10mL→200mL |

