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

蔗糖酶 酶活测定方法

1．试剂准备

1.1．DNS 试剂（3，5-二硝基水杨酸试剂）的配制：

将 6.3 克 DNS 加水于 45 度水浴溶解； 缓慢加入 262 mL 2M NaOH 溶液，边加边搅拌，直至溶液澄清透明；

称取 182 克酒石酸钾钠，溶于 50 mL 水中；

将 DNS 和 NaOH 的混合溶液缓慢加入酒石酸钾钠中，边加边搅拌； 逐步加入 5 g 苯酚和 5 g 亚硫酸钠直至溶解 ，冷却至室温，定容至 1000 mL，于棕色瓶中贮存 7-10 天备用。半年内有效。

1.2．标准果糖溶液（1mg/mL）的配制：

精密称取 25.00mg 果糖于适量蒸馏水中溶解，定容至 25mL 容量瓶中

1.3．5%蔗糖溶液的配制：

1.3.1．pH4.6 HAc-NaAc 缓冲液：

配置方法：

1）2MNaAc 母液：称取 272.16g 乙酸钠溶于适量蒸馏水中，定容至 1000mL

2）2M HAc 母液：称取 120.10g 乙酸，溶于适量蒸馏水中，定容至 1000mL

3）取 24.5mL2MNaAc 溶液和 25.5mL2MHAc 溶液混合，定容至 1000mL，

即得 pH 4.6 的 0.1MHAc-NaAc 缓冲液

1.3.2．精密称取 5.00g 蔗糖于适量 pH4.6 HAc-NaAc 缓冲液，定容至 100mL 容量瓶中。

2．果糖标准曲线的制作（DNS 法）：

取 10 支干净的试管，按下表加入各试剂，反应后以 0 号管为对照，调零，测量 各管的 OD520nm： 以果糖质量（mg）为横坐标，以 OD520nm 为纵坐标，获得果糖标准曲线。

3．蔗糖酶活力的测定：

3.1．样品准备：发酵液离心(8000r/min，10min)3.2．取适量发酵上清液，用0.1MHAc-NaAc pH4.6 缓冲液稀释（10-20 倍），取 200uL 稀释液加入 1800ul 5%蔗糖溶液，混匀，50ºC 水浴反应 5min（精确计时）, 立即 取出沸水浴 5min（精确计时）灭活，从反应液中取出 50ul，加入 2.0ml DNS 试剂 +1.95ml 缓冲液，混匀，沸水浴中 5min（精确计时）, 冷水冷却，用容量瓶定容 至 25ml, 测OD520nm，对应果糖标准曲线计算得样品反应液中的含糖量 A(mg)。

3.3．设置对照：发酵上清稀释液，沸水 5min 灭活，取 200uL 加入 1800ul 5%蔗糖 溶液，混匀，50ºC 水浴反应 5min（精确计时）, 立即取出沸水浴 5min（精确计 时）灭活，从反应液中取出 50ul，加入 2.0ml DNS 试剂+1.95ml 缓冲液，混匀，沸水浴中 5min（精确计时）, 冷水冷却，用容量瓶定容至 25ml, 作为对照，调零。

4．酶活计算：

酶活单位定义：每分钟产生 1 微摩尔还原糖所需要的酶量。

每毫升发酵上清液中蔗糖酶活为：

$$U=\frac{A\times 1000}{180\times 5}\times\frac{2000}{50\times 0.2}\times N$$

U：酶活单位 U/g；

A: 反应液中产生果糖的浓度（mg/mL），即回归方程 Y=aX+b 中的 X 值；

180: 果糖的分子量；

5：水解反应时间（本试验为 5 分钟）

2000：反应液总体积（uL）

50：显色液体积（uL）；

0.2：反应酶液体积（mL）

N：总的稀释倍数。