# 单宁酶 酶活力检测方法

**范围：**

本标准适用于微生物发酵产单宁酶制剂酶活力检测

**术语和定义：**

下列术语和定义适用于本标准。

1.酶活性单位定义

在 30℃、pH 值为 5.0 的条件下，每分钟降解没食子酸丙酯（PG）溶液解释放 1μmol 没食子酸所需的酶量定义为一个酶活力单位（U）。

**原理：**

酶活力的测定采用保玉心的绕丹宁法，该法以没食子酸丙酯（PG）作为反应的底物，单宁酶分解 PG 产生的没食子酸可与绕丹宁在碱性条件下形成红色复合物，该复合物在 520nm 处有最大吸收，据此可通过测定 A520的变化量来计算生成的没食子酸的量，从而计算酶活力。

**试剂和材料：**

本标准中所有试剂，在没有注明其它要求时，均指分析纯试剂和符合 GB/T 6682 中规定的二级水。

1. 0.1mol/L 的磷酸氢二钠：

准确称取十二水合磷酸氢二钠 35.814g，加入 800ml 水溶解，溶解后定容至 1000ml。

2. 0.05mol/L 的柠檬酸：

准确称取一水合柠檬酸 10.507 g，加入 800ml 水溶解，溶解后定容至 1000ml。

1.和2. 两者混匀，互调 pH 为 5.0.

3. 0.5mol/l 的 KOH 溶液：

准确称取 KOH 28.055g，加入 800ml 水溶解，溶解后定容至 1000ml。

4. 0.667%（W/V）罗丹宁溶液（甲醇绕丹宁）：

准确称取罗丹宁 0.667g，加入 80ml 甲醇溶解，溶解后用甲醇定容至 100ml。

5. 没食子酸标准溶液，浓度为 10mmol/l

称取没食子酸 0.18813 g，加磷酸-柠檬酸缓冲溶液溶解，定容至 100 ml。

6. 没食子酸丙酯（PG）溶液，浓度为 10.0 mmol/L

称取没食子酸丙酯 0.2122g， 再加入 80 ml 缓冲液，磁力搅拌加热， 直至完全溶解， 冷却，调节 pH至 5.0，并用缓冲液定容至 100ml。 使用前适当摇匀，4℃冷藏保存。

**仪器和设备：**

1 分光光度计：能检测 350-800 nm 的吸光度范围。

2 恒温水浴锅：温度控制范围在 30—60℃之间，精度为 0.1℃。

3 分析天平：感量 0.001 g。

4 pH 计：精确至 0.01。

5 磁力搅拌器：附加热功能。

6 电磁振荡器。

7 离心机：最大离心加速度不小于 2000g。

8 移液器。

9 秒表：每小时误差不超过 5s。

**测定步骤：**

1 没食子酸标准曲线绘制

用 pH5.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸（0.1-0.05M）缓冲液配制不同浓度的没食子酸标准溶液，从 40-240μmol/L配制 9 个不同浓度梯度。分别取 0.5ml 的没食子酸标准溶液与 0.3ml 甲醇绕丹宁溶液（0.667% W/V）混合，加入到所有试管中，30℃水

浴 5min，然后将 4.2ml（0.5M）的 KOH 溶液加入至所有试管中， 30℃保温10min。以缓冲液代替标准溶液作空白对照，于 520nm 处测定吸光值（A520）。

以浓度（m mol/L）为横坐标，A520 为纵坐标绘制标准曲线。

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 没食子酸浓度（mmol/L） | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.1 | 0.12 | 0.14 | 0.16 | 0.2 | 0.24 |
| 吸光值（OD） | 0.116 | 0.158 | 0.221 | 0.258 | 0.329 | 0.385 | 0.437 | 0.545 | 0.649 |
| 标准曲线 | 例如，Y=2.7162X+0.0027 R2=0.9995 | | | | | | | | |

2 试样溶液的制备

2.1 固体产品

称取 1g 样品于三角瓶中，加入 50mL 缓冲液，磁力搅拌 30min，4000rpm 离心 30min，取上清用缓冲液稀释至待测酶液中单宁酶活力 0.029-0.05 U/ml 之间，吸光值范围为 0.2-0.35。

2.2 液体产品

液体样品可以直接用缓冲液稀释至待测酶液中单宁酶活力 0.029-0.05 U/ml 之间， 吸光值范围为0.2-0.35。

7.3 测定步骤

（1）反应开始前，将 10mM PG 溶液和待测酶液于 30℃水浴中保温 5-10min；

（2）取 4 支洁净的试管，1 支为空白管、3 支测试管。向各管中加入0.25ml PG 溶液，然后向测定管中分别加入 0.25ml 待测酶液，30℃水浴下反应 5min；

（3）向所有试管中加入 0.3ml 甲醇绕丹宁溶液（0.667%，W/V），保温 5min；

（4）向所有试管中加入 4.2ml KOH 溶液（0.5M），向空白管中加入 0.25ml 酶液，在 30℃条件下放置 10min后， 以空白管归零，于 520nm 处测定各管溶液吸光值。

**试样酶活的计算：**

$$X_D = \left(\frac{(\triangle A520\text{-}C0)}{K} \times 0.5 \times n\right) / 0.25 / t$$

式中：

$X_D$ — 试样稀释液中单宁酶的活力，U/ml；

△A520— 酶反应液的吸光度-酶空白样的吸光度；

K — 标准曲线的斜率；

C0 — 标准曲线的截距；

1/0.25 — 换算成 1ml 酶液；

t— 酶解反应时间，5min；

0.5 — 0.5ml 酶液

n— 试样的稀释倍数。

**重复性：**

每个试样应取二份平行样进行分析测定，相对误差不超过 8.0%，二者的平均值为最终的酶活力测定值。