一种测定乳制品中蛋白酶活力的快速检测方法

冯美红

广州风行乳业股份有限公司，广东广州 510510

摘　要：[目的]为控制蛋白酶引起的质量问题，需测定牛奶中蛋白酶活力。[方法]针对乳及乳制品领域蛋白酶活力检测没有国家标准方法，本文介绍一种用紫外分光光度计–福林法测定乳及乳制品中蛋白酶活力的快速检测方法。[结果]本研究采用的标准曲线范围呈线性关系，满足测试要求。由精密度和加标回收率试验结果可知，该方法加标回收率在正常范围内。[结论]紫外分光光度计–福林法能用于乳及乳制品中蛋白酶活力检测。

关键词：乳制品；蛋白酶活力；苦味；紫外分光光度计–福林法

文章编号：1671–4393（2025）01–0046–04　　DOI:10.12377/1671–4393.25.01.09

0 引言

牛奶富含很多人体生长发育和保持健康的营养元素，是公认自然界中接近完美的食物，但牛奶储存过程中有存在蛋白凝块或存在苦味的常见质量问题[1]。研究表明，蛋白凝块是由蛋白酶水解酪蛋白引起[2，3]。苦味主要由于牛奶的内源或外源性蛋白酶水解酪蛋白，生成苦味游离氨基酸、寡肽等造成[4]。蛋白酶在40 ℃与一定pH值条件下，水解酪蛋白底物，产生含有酚基的氨基酸[5]。酪蛋白是一种含磷钙的结合蛋白，是哺乳动物乳汁中的主要蛋白质，又称干酪素、乳酪素，有很多生理功能特性，可以和金属离子，尤其是钙离子结合形成可溶性复合物，避免钙在小肠中性或微碱性环境中形成沉淀，使钙被肠壁细胞吸收。酪蛋白为非结晶、非吸潮性物质，微溶于水和有机溶剂，溶于稀碱和浓酸，常温水中可溶解0.8%～1.2%，等电点为pH值4.6的两性蛋白，白色、无味、无臭粒状固体[6]。酱油等领域的蛋白酶活力测定有成熟的国家标准方法，而乳制品领域蛋白酶活力测定没有统一标准和方法[7]。本研究用紫外分光光度计–福林法检测乳制品中蛋白酶活力，为产品质量控制提供理论依据。

1 方法

1.1 材料与试剂

福林使用溶液；0.4 mol/L碳酸钠溶液；0.4 mol/

作者简介：冯美红（1989–），女，广东广州人，本科，中级工程师，研究方向为食品质量安全。

中国乳业线上阅读

L三氯乙酸溶液；20 g/L氢氧化钠溶液；1.0 mol/L盐酸溶液；0.1 mol/L盐酸溶液；磷酸缓冲溶液（pH值7.5，适用于中性蛋白酶）；酪蛋白溶液（10.0 g/L）；L-酪氨酸标准溶液（1 000 μg/mL）。

1.2 仪器与设备

紫外分光光度计（岛津UV-1780），电热恒温水浴锅（HWS24型），pH计（梅特勒托利多S20），万分之一天平（梅特勒托利多XSE204）。

1.3 测定方法

1.3.1 试验原理

蛋白酶在一定温度与pH值条件下，水解酪蛋白底物，产生含有酚基的氨基酸，在碱性条件下，将福林使用溶液还原，生成钼蓝与钨蓝，用紫外分光光度计于波长680 nm下测定溶液的吸光度。酶活力与吸光度成比例，由此可计算产品的酶活力。蛋白酶活力以蛋白酶活力单位表示，定义为1 g固体酶粉（或1 mL液体酶）在一定温度和pH值条件下，1 min水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸，即为1 个酶活力单位，单位为U/g或U/mL。

1.3.2 L-酪氨酸标准工作曲线

分别取不同质量浓度的L-酪氨酸标准溶液（0 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、30 μg/mL、40 μg/mL、50 μg/mL）各1.00 mL，加入5.00 mL碳酸钠溶液、1.00 mL福林使用溶液，振荡均匀，置于（40±0.2）℃水浴显色20 min，取出。以试管A为空白对照组，分别用10 mm比色皿测定系列标准工作溶液在紫外分光光度计波长680 nm处检测吸光度。以吸光度A为纵坐标，L-酪氨酸标准溶液浓度c为横坐标，绘制标准曲线。利用回归方程，计算吸光度为1时的L-酪氨酸标准溶液的量（μg），即为吸光常数K值。其K值应在 95～100范围内。如不符合，需重新配制试剂再进行试验。

1.3.3 样品测定

（1）待测酶液的制备

某品牌UHT超高温灭菌乳、乳饮料、原料奶等样品恢复至室温，吸取原液检测。奶粉按配方使用说明比例加水稀释，约40 ℃温水溶解。

（2）测定步骤

①准备试管A为空白对照组，试管B为实验组，需做2 个平行试样；

②试管A加酶液1.00 mL，放入设置温度为（40±0.2）℃电热恒温水浴锅中保持2 min，试管B加酶液1.00 mL，放入设置温度为（40±0.2）℃电热恒温水浴锅中保持2 min；

③试管A加入三氯乙酸溶液2.00 mL，手持试管上下摇匀，放入设置温度为（40±0.2）℃电热恒温水浴锅中保持10 min，试管B加入预热酪蛋白溶液1.00 mL，手持试管上下摇匀，放入设置温度为（40±0.2）℃电热恒温水浴锅中保持10 min；

④试管A加入预热酪蛋白溶液1.00 mL，手持试管上下摇匀，放入设置温度为（40±0.2）℃电热恒温水浴锅中保持10 min，试管B加入三氯乙酸溶液2.00 mL，手持试管上下摇匀，放入设置温度为（40±0.2）℃电热恒温水浴锅中保持10 min；

⑤试管A和试管B中溶液用慢速定性滤纸过滤，滤液待用；

⑥分别取试管A和试管B滤液，各加入5.00 mL碳酸钠溶液，加1.00 mL福林使用溶液，放入设置温度为（40±0.2）℃电热恒温水浴锅中保持20 min显色；

⑦以水为空白调零，680 nm波长处，用10 mm比色皿，紫外分光光度计测定试管A（空白）和试管B（试样）的吸光度。

本试验应注意将贮存在冰箱中的酪蛋白溶液取出需要量后，必须马上放入冰箱2～8 ℃保存，保质期不超过3 天。每次重新配制福林使用溶液需重新绘制标准曲线。在样品测定加入预热酪蛋白溶液1.00 mL后开始计时，必须精确酶解10 min，如同时检测多个样品，应保证添加试剂间的时间间隔一致。样品测定从第一个加入三氯乙酸溶液开始计时，显色后应在10 min内完成读数，避免放置时间过长。提前30 min打开电热恒温水浴锅和紫外分光光度

中国乳业线上阅读

计，确保仪器稳定。

（3）计算

从标准曲线读出样品最终稀释液的酶活力，单位为U/g或U/mL。

$$X_1 = \frac{A_1 \times V_1 \times 4}{m} \times \frac{1}{10}$$

式中，X_2——样品的酶活力，单位为U/g或U/mL；A_2——样品测定的净OD值，查标准曲线得相当的L-酪氨酸标准溶液的毫克数（或OD值×K值）；V_2——溶解样品所用容量瓶体积，单位为mL；4——反应试剂总体积，单位为mL；m——样品质量，单位为g或mL；10——反应时间10 min，以1 min计。计算结果保留2 位小数，在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不超过1 U/mL。

2 方法特性参数验证结果

由于本试验为样品本身作为空白对照组，故本次验证不做方法检出限和定量限要求。根据方法特性，只做方法线性关系、准确度和精密度验证。

2.1 线性关系

分别采用不同浓度标准物质溶液，建立浓度和吸光度的标准曲线，在不同试验日期内共进行2 次独立测试，测试结果见表1。不同试验日期曲线的线性相关系数r值大于0.999，K值98.56和98.96。r值和K值满足方法要求。

2.2 精密度与准确度

随机选择娟姗原料奶、纯牛奶、高钙奶、全脂奶粉、原料奶作为典型材料，进行多次加标回收分析。加标方法：L-酪氨酸标准溶液（4 mg/mL）：称0.4 g L-酪氨酸，用10 mL 1 moL/L盐酸溶解，用0.1 mol/L盐酸定容至100 mL，精密度和准确度验证数据见表2。

表 2 加标回收率精密度和准确度验证数据

样品名称	加标量（μg）	相当于L-酪氨酸含量（μg）	回收率（%）	均值（%）	RSD（%）
水样	10	9.875 0	98.8		
	10	9.596 2	96.0	96.9	1.7
	10	9.596 2	96.0		
娟姗原料奶	/	13.083 3	/	/	/
	10	23.326 9	102.4		
	10	23.990 4	109.1	106.9	1.6
	10	23.990 4	109.1		
纯牛奶	/	3.410 3	/	/	/
	10	14.326 9	116.0		
	10	14.932 7	122.1	118.1	2.4
	10	14.336 5	116.1		
高钙奶	/	3.580 1	/	/	/
	10	15.721 2	121.4		
	10	16.317 3	127.4	125.6	2.3
	10	16.384 6	128.0		
全脂奶粉	/	8.666 7	/	/	/
	10	18.105 8	94.4		
	10	18.451 9	97.9	96.1	1.3
	10	21.826 9	126.3		
原料奶	/	20.125 0	/	/	/
	10	30.846 2	107.2		
	10	29.250 0	91.3	97.9	2.8
	10	29.586 5	94.6		

水样发色和加标为取1 mL水样，加入10 μL稀释4倍的L-酪氨酸标准溶液（即实际加入发色体系的L-酪氨酸标准质量为10 μg），然后发色。

原样加标为取1 mL样品加10 μL 4 mg/mL L-酪氨酸标准溶液，再进行酶解、过滤和取1 mL（即实际加入发色体系的L-酪氨酸标准质量为10 μg），然后发色。

表 1 标准曲线相关参数测试结果

L-酪氨酸浓度 c（μg/mL）		10	20	30	40	50	线性相关系数	K 值
吸光度 A（abs）	测试 1	0.070 9	0.174 3	0.276 6	0.384 0	0.489 3	0.999 9	98.56
	测试 2	0.074 3	0.176 2	0.286 5	0.380 6	0.490 1	0.999 5	98.96

中国乳业线上阅读

2.3 结果分析

根据《GB/T 27417—2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南》要求，被测目标浓度＜100 μg/kg时，推荐允许的回收率偏差范围60%～120%。本试验测得回收率最大为125.6%，换算成酶活力和结果修约后，对产品最终结果影响较小，该项要求可适当放宽。被测目标浓度＜100 μg/kg时，推荐实验室内变异系数CV为15%，以上数据精密度符合要求。由标准曲线及线性范围验证，确认该方法所用标准曲线范围呈线性关系，满足测试要求。由精密度和加标回收率试验结果可知，该方法加标回收率在正常范围内。与《GB/T 23527.1—2023 酶制剂质量要求 第1部分：蛋白酶制剂》相比，该方法操作简单，全程在电热恒温水浴锅中操作，样品测定保持（40.0±0.2）℃恒温，减少人为摇匀试剂或涡旋振荡摇匀的操作，缩短试验时间，整个试验预计耗时1.5～2.0 h。

3 结论

本试验乳制品中加入试剂后经一定温度和pH值条件下水解其中的酪蛋白，经紫外分光光度计检测，L-酪氨酸浓度和吸光度呈线性关系。试验操作应注意温度控制，在电热恒温水浴锅中摇匀试剂和试样，尽量保持反应温度稳定。试验结果表明，紫外分光光度计-福林法能用于乳及乳制品中蛋白酶活力的测定。

参考文献

[1] 张爱霞，生庆海，魏鹏.苦味UHT乳原因分析[J].中国乳品工业，2006，34（9）：37-39.

[2] 康小红，孙国庆，付治军，等.UHT牛奶蛋白凝块产生原因及控制措施的研究[J].食品工业科技，2008，（5）：165-167.

[3] 张艳，郭利春，郭奇慧，等.UHT乳结块原因分析[J].食品研究与开发，2007，28（12）：84-86.

[4] 王传宝，张艳凌，陆剑锋，等.高钙奶苦味原味分析[J].中国食品添加剂，2020（4）：56-61.

[5] 姚小玲.一起苦味牛乳的原因分析[J].中国卫生检验杂志，2002，12（5）：620-621

[6] 蒋爱民，南庆贤.畜产食品工艺学（第二版）[M].北京：中国农业出版社，2008.

[7] 王辉，吕加平，刘鹭，等.耐热蛋白酶对UHT乳蛋白的水解作用[J].食品科学，2010，31（17）：228-231.

A Rapid Detection Method for Determination of Protease Activity in Dairy Products

FENG Meihong

Guangzhou Fengxing Dairy Co.，Ltd.，Guangzhou Guangdong 510510

Abstract：[Objective]The bitterness of high calcium milk is mainly caused by the hydrolysis of casein by endogenous or exogenous proteases in milk and the formation of bitter free amino acids and oligopeptides. In order to control quality problems caused by proteases，it is necessary to measure the protease activity in milk.[Method] At present，there is no national standard method for detecting protease activity in milk and dairy products. This study introduced a rapid detection method for determination of protease activity in milk and dairy products by UV spectrophotometer-Folin method.[Result]The standard curve range used in this research was linear and meets the test requirements. The results of precision and spiked recovery experiments indicated that the spiked recovery rate was within the normal range.[Conclusion]The UV spectrophotometer-Folin method can be applied to the determination of protease activity in milk and dairy products.

Keywords：dairy product；protease activity；bitterness；UV spectrophotometer-Folin method

中国乳业线上阅读