



中华人民共和国国家标准

GB 1886.174—2024

食品安全国家标准

食品添加剂 食品工业用酶制剂

2024-02-08 发布

2024-08-08 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前　　言

本标准代替 GB 1886.174—2016《食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂》。

本标准与 GB 1886.174—2016 相比,主要变化如下:

- 增加了“酶制剂用辅料”“固定化酶制剂”和“固定化载体”的术语和定义;
- 增加了酶制剂用辅料和固定化载体的技术要求;
- 修改了大肠埃希氏菌的指标要求;
- 增加了酶制剂用辅料名单的附录要求;
- 增加了附录中部分酶活力测定参考方法。

食品安全国家标准

食品添加剂 食品工业用酶制剂

1 范围

本标准适用于《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760)和相关公告允许使用的食品工业用酶制剂。

2 术语和定义

2.1 食品工业用酶制剂

由动物或植物的可食或非可食部分直接提取,或由传统选育或经基因重组技术得到的微生物(包括但不限于细菌、放线菌、真菌菌种)发酵、提取后,或再经进一步纯化、制剂化等工艺制得的(可含有一个或多个活性酶组分),用于食品工业,具有特殊催化活性的制剂产品。

2.2 酶活力

酶在一定条件下催化某一特定反应的活性能力高低的指标。

2.3 抗菌活性

抑制或杀灭微生物的特性。

2.4 酶制剂用辅料

为酶制剂产品的活性保存、流通贮存、标准化使用等目的而加入的食品原料和食品添加剂。

2.5 固定化酶制剂

利用物理和(或)化学的方法将酶固定于载体上,在食品生产过程中以不可溶解状态发挥作用的产品剂型。

2.6 固定化载体

固定化酶制剂中起固定酶作用的材料。

3 产品分类

按产品形态分为固体剂型(含固定化剂型)和液体剂型。

4 技术要求

4.1 原辅料要求

4.1.1 用于生产酶制剂的原辅料应符合相关要求,在规定的使用条件下,不应对最终食品产生有害健

康的残留污染。

4.1.2 用于提取酶制剂的动物组织应符合肉类检疫要求。

4.1.3 用于提取酶制剂的植物组织不应霉变。

4.1.4 对微生物生产菌种应进行分类学和(或)遗传学的鉴定,并应符合《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760)及相关公告。菌种的保藏方法和条件应保证发酵批次之间的稳定性和可重复性。

4.1.5 为了酶制剂产品的活性保存、流通贮存和标准化使用,商品化的酶制剂允许加入必要的辅料成分。酶制剂用辅料不应在最终食品中发挥功能作用,一般按生产需要适量使用,在达到预期的目的下尽可能减少使用品种和用量。酶制剂中允许使用的辅料名单见附录 A。

4.1.6 固定化酶制剂所使用的固定化载体应符合《食品安全国家标准 食品接触材料及制品用添加剂使用标准》(GB 9685)、《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760)或其他在食品中允许使用的原料清单的规定。

4.2 理化指标

产品酶活力应符合声称。

注:部分酶制剂的酶活力测定参考方法参见附录 B。企业可按相应标准中给出的或企业规定的方法测定。

4.3 污染物限量

污染物限量应符合表 1 的规定。

表 1 污染物限量

项 目	限 量	检验方法
铅(Pb)/(mg/kg) ≤	5.0	GB 5009.75 或 GB 5009.12
总砷(以 As 计)/(mg/kg) ≤	3.0	GB 5009.76 或 GB 5009.11

4.4 微生物限量

微生物限量应符合表 2 的规定。其中,经基因重组技术得到的微生物生产的酶制剂不应检出产菌。

表 2 微生物限量

项 目	限 量	检验方法
菌落总数/(CFU/g 或 CFU/mL) ≤	50 000	GB 4789.2
大肠菌群/(CFU/g 或 CFU/mL) ≤	30	GB 4789.3
大肠埃希氏菌/(CFU/g 或 CFU/mL)	不应检出	GB 4789.38
沙门氏菌(25 g 或 25 mL)	不应检出	GB 4789.4

4.5 抗菌活性

微生物来源的酶制剂不应检出抗菌活性,抗菌活性按《食品安全国家标准 食品微生物学检验 微生物源酶制剂抗菌活性的测定》(GB 4789.43)执行。

附录 A
酶制剂用辅料名单

酶制剂用辅料名单见表 A.1。

表 A.1 酶制剂用辅料名单

序号	名称	CNS 号	INS 号
1	柠檬酸	01.101	330
2	柠檬酸钠	01.303	331iii
3	柠檬酸钾	01.304	332ii
4	乳酸	01.102	270
5	乳酸钠	15.012	325
6	磷酸	01.106	338
7	焦磷酸二氢二钠	15.008	450i
8	焦磷酸钠	15.004	450iii
9	磷酸二氢钙	15.007	341i
10	磷酸二氢钾	15.01	340i
11	磷酸氢二铵	06.008	342ii
12	磷酸氢二钾	15.009	340ii
13	磷酸氢钙	06.006	341ii
14	磷酸三钙	02.003	341iii
15	磷酸三钾	01.308	340iii
16	磷酸三钠	15.001	339iii
17	六偏磷酸钠	15.002	452i
18	三聚磷酸钠	15.003	451i
19	磷酸二氢钠	15.005	339i
20	磷酸氢二钠	15.006	339ii
21	焦磷酸四钾	15.017	450(v)
22	焦磷酸一氢三钠	15.013	450(ii)
23	聚偏磷酸钾	15.015	452(ii)
24	酸式焦磷酸钙	15.016	450(vii)
25	冰乙酸(又名冰醋酸)	01.107	260
26	乙酸钠(又名醋酸钠)	0.013	262i
27	盐酸	01.108	507
28	氢氧化钙	01.202	526
29	氢氧化钾	01.203	525
30	碳酸钠	01.302	500i

表 A.1 酶制剂用辅料名单(续)

序号	名称	CNS 号	INS 号
31	硫酸	—	—
32	氢氧化钠	—	—
33	氨水(包括液氨)	—	—
34	二氧化硅	02.004	551
35	硬脂酸镁	02.006	470
36	硅酸钙	02.009	552
37	抗坏血酸钙	04.009	302
38	抗坏血酸棕榈酸酯	04.011	304
39	抗坏血酸(又名维生素 C)	04.014	300
40	抗坏血酸钠	04.015	301
41	二氧化硫	05.001	220
42	焦亚硫酸钾	05.002	224
43	焦亚硫酸钠	05.003	223
44	亚硫酸钠	05.004	221
45	亚硫酸氢钠	05.005	222
46	低亚硫酸钠	05.006	—
47	苯甲酸	17.001	210
48	苯甲酸钠	17.002	211
49	山梨酸	17.003	200
50	山梨酸钾	17.004	202
51	丙酸	17.029	280
52	丙酸钠	17.006	281
53	丙酸钙	17.005	282
54	对羟基苯甲酸甲酯钠	17.032	219
55	对羟基苯甲酸乙酯	17.007	214
56	对羟基苯甲酸乙酯钠	17.036	215
57	聚氧乙烯(20)山梨醇酐单月桂酸酯(又名吐温 20)	10.025	432
58	聚氧乙烯(20)山梨醇酐单棕榈酸酯(又名吐温 40)	10.026	434
59	聚氧乙烯(20)山梨醇酐单硬脂酸酯(又名吐温 60)	10.015	435
60	聚氧乙烯(20)山梨醇酐单油酸酯(又名吐温 80)	10.016	433
61	甘油(又名丙三醇)	15.014	422
62	D-甘露糖醇	19.017	421
63	微晶纤维素	02.005	460i
64	氨基乙酸(又名甘氨酸)	12.007	640

表 A.1 酶制剂用辅料名单(续)

序号	名称	CNS号	INS号
65	碳酸钙(包括轻质和重质)	13.006	170i
66	硫酸钙	18.001	516
67	氯化钙	18.002	509
68	氯化镁	18.003	511
69	丙二醇	18.004	1 520
70	麦芽糖醇	19.005	965(i)
71	麦芽糖醇液	19.022	965(ii)
72	山梨糖醇	19.006	420(i)
73	山梨糖醇液	19.023	420(ii)
74	乳糖醇(又名 4- β -D 吡喃半乳糖-D-山梨醇)	19.014	966
75	阿拉伯胶	20.008	414
76	黄原胶(又名汉生胶)	20.009	415
77	纤维素	—	—
78	氧化镁(包括重质和轻质)	—	—
79	乙醇	—	—
80	明胶	20.002	—
81	海藻酸钠(又名褐藻酸钠)	20.004	401
82	羧甲基纤维素钠	20.003	466
83	聚葡萄糖	20.022	1 200
84	瓜尔胶	20.025	412
85	磷酸酯双淀粉	20.034	1 412
86	氯化钾	00.008	508
87	硫酸镁	00.021	518
88	L-半胱氨酸盐酸盐	13.003	920
89	硬脂酸(又名十八烷酸)	14.009	570
90	聚乙二醇	14.012	1 521
91	肌醇	—	—
92	乙酸锌	—	—
93	L-半胱氨酸	—	—
94	硫酸铵	—	—
95	硫酸钠	—	—
96	硫酸锰	—	—
97	氯化铵	—	—
98	氯化钠	—	—
99	醋酸钙(乙酸钙)	—	—

注：合适的各种食品原料作为酶制剂用辅料，不在本表列出。所用食品原料需符合相应的标准。

附录 B
部分酶制剂的酶活力测定参考方法

B.1 部分酶制剂的酶活力测定参考方法

部分酶制剂的酶活力测定参考方法见表 B.1。

表 B.1 部分酶制剂的酶活力测定参考方法

序号	种类	参考方法
1	α -淀粉酶	《 α -淀粉酶制剂》(GB/T 24401)
2	α -乙酰乳酸脱羧酶	附录 B 中 B.2
3	β -葡聚糖酶	《 β -葡聚糖酶制剂》(QB/T 4481)
4	菠萝蛋白酶	《酶制剂质量要求 第 1 部分:蛋白酶制剂》(GB/T 23527.1)
5	蛋白酶(包括乳凝块酶)	《酶制剂质量要求 第 1 部分:蛋白酶制剂》(GB/T 23527.1)
6	果胶酶	附录 B 中 B.3 或《碱性果胶酶制剂》(QB/T 4482)
7	过氧化氢酶	《工业用酶制剂测定技术导则》(GB/T 35538)
8	木瓜蛋白酶	《酶制剂质量要求 第 1 部分:蛋白酶制剂》(GB/T 23527.1)
9	木聚糖酶	《木聚糖酶制剂》(QB/T 4483)
10	葡萄糖淀粉酶(淀粉葡萄糖苷酶)	附录 B 中 B.4
11	普鲁兰酶	《工业用酶制剂测定技术导则》(GB/T 35538)
12	乳糖酶(β -半乳糖苷酶)	《工业用酶制剂测定技术导则》(GB/T 35538)
13	无花果蛋白酶 Ficin	《酶制剂质量要求 第 1 部分:蛋白酶制剂》(GB/T 23527.1)
14	纤维素酶 Cellulase	《纤维素酶制剂》(QB/T 2583)
15	蔗糖 1-果糖转移酶(又名果糖基转移酶)	《果糖基转移酶制剂》(QB/T 5357)
16	脂肪酶	《脂肪酶制剂》(GB/T 23535)
17	转葡萄糖苷酶	附录 B 中 B.5
18	溶菌酶	《食品安全国家标准 食品添加剂 溶菌酶》(GB 1886.257)

B.2 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定**B.2.1 α -乙酰乳酸脱羧酶**

可以与 α -乙酰乳酸反应脱羧,将 α -乙酰乳酸羧基转化为 3-羟基-2-丁酮的酶。

B.2.2 α -乙酰乳酸脱羧酶活力

在 30 °C、pH 6.0 的条件下,1 g 或 1 mL 酶样品与底物 α -乙酰乳酸发生反应,每分钟生成 1 μmol 的 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻),即为 1 个酶活力单位,以 U/g(或 U/mL)表示。

B.2.3 分光光度计法**B.2.3.1 范围**

本方法规定了 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定方法。

本方法适用于用分光光度计测定 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂中 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力。本方法

不适用于啤酒和其他含醇产品中 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力的测定。

试样中 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)和/或双乙酰的存在会使试验结果偏大。

乙偶姻在贮存时易形成二聚体,从而影响试验结果。但若遵循配制步骤中所述的措施去预防,本方法仍可使用。

B.2.3.2 原理

α -乙酰乳酸脱羧酶与底物 α -乙酰乳酸反应脱羧生成乙偶姻。乙偶姻在碱性条件下与萘酚和肌酸的混合物反应生成红色产物。通过在 522 nm 下测定溶液的吸光度,可以从乙偶姻标准曲线上得出反应生成的乙偶姻的量,进而计算出 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力。

B.2.3.3 试剂和材料

除特殊说明外,所用的试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682 中规定的二级水。

B.2.3.3.1 乙偶姻(3-羟基-2-丁酮)[$\text{CH}_3\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$, CAS 号:513-86-0],纯度 $\geqslant 95\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

B.2.3.3.2 MES(9.76 g/L)-氯化钠(35.064 g/L)-聚氧化乙烯十二烷基醚(1.52 mL/L)缓冲液:分别称取 2-[N-吗啉代]乙基磺酸(2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, MES)48.80 g 和氯化钠 175.32 g 于烧杯中,用约 4.5 L 水溶解,然后加入 15% 的聚氧化乙烯十二烷基醚溶液 7.60 mL,搅拌均匀;用约 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.00 \pm 0.05。然后移入 5 000 mL 容量瓶中,用水定容,搅拌均匀。该溶液在常温(15 °C~20 °C)下的保存期为 1 周。

B.2.3.3.3 α -乙酰乳酸底物(2.00 mL/L):吸取乙基-2-乙酸基-2-甲基乙酰乙酸 100 μ L 于 50 mL 容量瓶中,加入约 0.50 mol/L 的氢氧化钠溶液 6.0 mL,振摇 20 min 后,加入缓冲液到约 40.0 mL;用约 1 mol/L 盐酸调节溶液的 pH 至 6.00 \pm 0.05。然后,再用缓冲液定容。该溶液使用前配制。

B.2.3.3.4 萘酚(10.0 g/L)/肌酸(1.0 g/L)显色剂:分别称取 1-萘酚 5.0 g 和肌酸 0.5 g 移入 500 mL 容量瓶中,用约 1 mol/L 的氢氧化钠溶液溶解并定容。该溶液使用前配制。配制时需避光,并且冰浴。

警告:1-萘酚可燃,有毒。对眼和黏膜有刺激性。吞咽或经皮肤吸收都能引起中毒。

B.2.3.3.5 乙偶姻储备液(1.000 g/L):取一定量的乙偶姻于试管中,在 37 °C 恒温箱中溶解。然后将试管置于冰水中使乙偶姻重结晶。重结晶后,乙偶姻不含有影响试验结果的乙偶姻二聚体,可用于储备液的配制;称取重结晶后的乙偶姻 0.100 g,精确至 0.000 1 g,移入 100 mL 容量瓶中,用水溶解并定容。

注:乙偶姻对热不稳定,且容易吸潮,因此需放置在干燥器中冷藏(2 °C~6 °C)保存。如发现物质有明显的吸潮现象,建议放弃不用。该溶液在冷藏条件下的保存期为 1 周。

B.2.3.3.6 乙偶姻标准溶液,用乙偶姻储备液和水按照表 B.2 稀释而成,该溶液应每天配制。

表 B.2 乙偶姻标准溶液

标准点	乙偶姻储备液/mL	水/mL	稀释倍数	乙偶姻/(mg/L)
1	—	100.0	—	0.0 ^a
2	1.0	99.0	100.0	10.0
3	2.0	98.0	50.0	20.0
4	4.0	96.0	25.0	40.0
5	6.0	94.0	16.7	60.0
6	8.0	92.0	12.5	80.0

^a 用水做第一个标准点。

B.2.3.4 仪器和设备

- B.2.3.4.1 分析天平:精度为 0.000 1 g。
 - B.2.3.4.2 pH 计:精度为 0.01。
 - B.2.3.4.3 恒温水浴锅: $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
 - B.2.3.4.4 分光光度计:可在 522 nm 下测定吸光度。
 - B.2.3.4.5 计时器。
 - B.2.3.4.6 涡旋振荡器。

B.2.3.5 分析步骤

B.2.3.5.1 乙偶姻标准曲线的制备

分别吸取配制好的乙偶姻标准溶液 400 μ L 于 6 个不同的 10 mL 试管中。然后按表 B.2 依次在每个试管中加入显色剂 4.60 mL, 用涡旋振荡器充分混合均匀。室温下反应 40.0 min 后, 使用分光光度计, 在 522 nm 下测定各管溶液的吸光度。

B.2.3.5.2 标准对照品的制备

建议使用一个有代表性的、稳定的样品作为标准对照品。

在每次分析中,将该标准对照品与样品一同进行检测,以判断试验的重复性。

B.2.3.5.3 样品溶液的制备

从样品中称取一定量的样品,精确至 0.000 5 g,用溶液稀释。其稀释的倍数要使样品的最终吸光度 H_1 落在乙偶姻标准曲线的范围内。

B.2.3.5.4 标准曲线的绘制

以 522 nm 波长下的吸光度为 Y 轴,乙偶姻的浓度(mg/L)为 X 轴,绘制标准曲线,计算出标准曲线的斜率 h (或用回归方程计算)。

B.2.3.5.5 测定

将试样溶液和底物先置于 30 °C 水浴中预热约 10 min, 吸取酶样品溶液 200.0 μ L 于 30 °C \pm 0.1 °C 水浴中的 10 mL 试管里, 然后加入底物 200.0 μ L, 立即计时, 并用涡旋振荡器充分混匀, 迅速放回水浴中。反应 20.0 min 后, 依次向试管中加入显色剂 4.60 mL, 用涡旋振荡器充分混匀。置于室温, 重新开始计时。反应 40.0 min 后, 使用分光光度计, 在 522 nm 波长下测定各管溶液的吸光度。同时用缓冲液代替试样溶液进行空白试验。

B.2.3.6 结果计算

α -乙酰乳酸脱羧酶制剂的酶活力 X_1 , 单位为 U/g(或 U/mL), 按式(B.1)计算:

式中：

H_1 ——样品的吸光度；

H_2 ——空白的吸光度；

0.001 135 1—0.1 g 的乙偶姻所对应的摩尔数；

F_1 ——样品溶液反应前的总稀释倍数；
 m ——试料的质量，单位为克(g)；
 h ——标准曲线的斜率。

样品的测定结果用算术平均值表示。

当结果小于 1 U/g(或 U/mL)时给出 1 位有效数字；当结果大于或等于 1 U/g(或 U/mL)且小于 100 U/g(或 U/mL)时给出 2 位有效数字；当结果大于或等于 100 U/g(或 U/mL)时给出 3 位有效数字。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%。

B.2.4 全自动生化分析仪法

B.2.4.1 范围

本方法规定了 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定方法。

本方法适用于用全自动生化分析仪测定 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂中 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力。本方法不适用于啤酒和其他含醇产品中 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定。

本方法的检测限为 0.6 U/g(或 U/mL)。

试样中 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)和/或双乙酰的存在会使试验结果偏大。

乙偶姻在贮存时易形成二聚体，从而影响试验结果。但若遵循配制步骤中所述的措施去预防，本方法仍可使用。

B.2.4.2 原理

α -乙酰乳酸脱羧酶与底物 α -乙酰乳酸反应脱羧生成乙偶姻。乙偶姻在碱性条件下与萘酚和肌酸的混合物反应生成红色产物。通过在 510 nm 波长下测定标准溶液的吸光度绘制出标准曲线，对照标准曲线进一步计算出酶样品的活力。

B.2.4.3 试剂和材料

B.2.4.3.1 MES(9.76 g/L)-氯化钠(35.064 g/L)-聚氧化乙烯十二烷基醚(1.52 mL/L)缓冲液：见 B.2.3.3.2。

B.2.4.3.2 α -乙酰乳酸底物(2.00 mL/L)：见 B.2.3.3.3。

B.2.4.3.3 萘酚(10.0 g/L)/肌酸(1.0 g/L)显色剂：见 B.2.3.3.4。

B.2.4.4 仪器和设备

B.2.4.4.1 全自动生化分析仪

B.2.4.4.1.1 全自动生化分析仪要求带有进样系统、搅拌系统、温度控制系统 30 °C ± 0.2 °C 和检测系统。检测系统要求可在 510 nm 波长处，用动力学法检测吸光度变化，时间间隔最少 18 s。

B.2.4.4.1.2 底物保温周期如下：

- 温度：30 °C；
- 时间：480 s；
- 底物：40 μL；
- 水：20 μL。

B.2.4.4.1.3 酶反应周期如下：

- 温度：30 °C；

——时间:650 s;
 ——样品稀释液:40 μ L;
 ——水:20 μ L。

B.2.4.4.1.4 显色反应周期如下:

——温度:30 $^{\circ}$ C;
 ——时间:240 s;
 ——显色试剂:80 μ L;
 ——水:15 μ L。

B.2.4.4.1.5 测定周期如下:

——测定模式:动力学法;
 ——波长:510 nm;
 ——曲线类型:非线性;
 ——时间:145 s;
 ——读数:9 次;
 ——间隔:18 s。

B.2.4.4.2 分析天平

精度为 0.000 1 g。

B.2.4.4.3 pH 计

精度为 0.01。

B.2.4.5 分析步骤

B.2.4.5.1 系列标准溶液的制备

称取一定量的 α -乙酰乳酸脱羧酶标准品(精确至 0.000 5 g),用缓冲液溶解并定容至 100 mL,得到标准储备液。标准品称取的量要使标准储备液中 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力约为 0.75 U/mL。

按照表 B.3 配制系列标准溶液。标准储备液和标准曲线溶液应每日配制。

表 B.3 α -乙酰乳酸脱羧酶系列标准溶液

标准点	标准储备液/ μ L	缓冲液/ μ L	稀释倍数	稀释后活力/(mU/mL)
1	—	600.0	—	0.0 ^a
2	20.0	580.0	30.0	25.0
3	30.0	570.0	20.0	37.5
4	40.0	560.0	15.0	50.0
5	50.0	550.0	12.0	62.5
6	60.0	540.0	10.0	75.0

^a 用缓冲液作标准点 1。

B.2.4.5.2 标准对照品的制备

取一定量的乙偶姻于试管中,在 37 $^{\circ}$ C 的恒温箱中溶解。然后将试管置于冰水中使乙偶姻重结晶。

称取 0.197 g 重结晶后的乙偶姻(精确至 0.000 1 g),用缓冲液 B.2.4.3.1 溶解并定容至 200 mL,得到标准对照品储备液。标准对照品储备液在 4 ℃~8 ℃并且避光的条件下的保存期为 1 周。

测定前将标准对照品储备液用相同的缓冲液稀释 20 倍备用。二次稀释后的乙偶姻溶液的浓度相当于 50 mU/mL 的酶活。

B.2.4.5.3 样品溶液的制备

从样品中称取一定量的试剂，用缓冲液溶解稀释。稀释的倍数要使得最终稀释液的酶活力在 $27.5 \text{ mU/mL} \sim 62.5 \text{ mU/mL}$ 范围内。

B.2.4.6 测定

B.2.4.6.1 分别移取 600 μL 系列标准溶液和 2.0 mL 标准对照品溶液和释后的样品溶液，置于全自动生化分析仪中待测。

B.2.4.6.2 按照设定参数进行检测,读取结果。

B.2.4.7 结果计算

B.2.4.7.1 标准曲线的计算

用参数 Logit-Log 法计算出标准曲线。其中 Y 轴单位为 OD/min, X 轴单位为标准点的酶活力 mU/mL。

B.2.4.7.2 样品活力的计算

从标准曲线上读出样品最终稀释液的活力,单位为 mU/mL。

α -乙酰乳酸脱羧酶制剂的酶活力 X_2 , 单位为 U/g(或 U/mL), 按式(B.2)计算:

式中：

A_1 ——由标准曲线得出的样品最终稀释液的活力,单位为毫酶活力单位每毫升(mU/mL);

F_2 ——溶解样品用的容量瓶的体积,单位为毫升(mL);

D ——稀释倍数；

m ——样品的质量,单位为克(g);

1 000 ——换算系数。

样品的测定结果用算术平均值表示。当标准对照品稀释液的试验值在 $0.48 \text{ mU/mL} \sim 0.52 \text{ mU/mL}$ 时，样品的试验结果有效，可计算平均值。否则，应重新进行试验。

当结果小于 1 U/g(或 U/mL)时给出 1 位有效数字;当结果大于或等于 1 U/g(或 U/mL)且小于 100 U/g(或 U/mL)时给出 2 位有效数字;当结果大于或等于 100 U/g(或 U/mL)时给出 3 位有效数字。当结果小于 0.6 U/g(或 U/mL)时,表示为<0.6 U/g(或 U/mL)。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 4%。

B.3 果胶酶活力的测定

B.3.1 果胶酶

能水解果胶，生成含有还原性基团产物的酶。

B.3.2 果胶酶活力

在 50 ℃、pH 3.5 的反应条件下,1 g 固体酶粉(或 1 mL 液体酶),1 h 分解果胶产生 1 mg 半乳糖醛酸,即为 1 个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

B.3.3 原理

果胶酶能水解果胶,生成的半乳糖醛酸的还原性糖醛基可用次亚碘酸法定量测定,以此来表示果胶酶的活力。

本方法主要用于检测果胶酶产品中多聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶的活力,对于果胶酶中的果胶(甲基)酯酶不适用。

B.3.4 试剂和材料

B.3.4.1 10 g/L 柑橘果胶溶液:称取果胶粉 1.000 0 g(精确至 0.1 mg),加水溶解,煮沸,冷却,过滤。调整 pH 至 3.5,用水定容至 100 mL,冰箱贮存备用。使用时间不超过 3 d。

注:果胶底物对试验的影响大。如使用不同来源或批号的果胶粉,需与旧批次进行对照试验。

B.3.4.2 0.05 mol/L 硫代硫酸钠标准溶液。

B.3.4.3 1 mol/L 碳酸钠标准溶液。

B.3.4.4 0.1 mol/L 碘标准溶液。

B.3.4.5 1 mol/L 硫酸溶液:取浓硫酸 5.6 mL,缓慢加入适量水中,冷却后用水定容至 100 mL,摇匀,备用。

B.3.4.6 10 g/L 可溶性淀粉指示液。

B.3.4.7 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 3.5):称取柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)14.71 g,柠檬酸三钠($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)8.82 g,加 950 mL 水溶解,调节 pH 至 3.5,再用水定容至 1 000 mL。

B.3.5 仪器和设备

B.3.5.1 比色管:25 mL。

B.3.5.2 带加热装置的恒温水浴:控温精度±0.5 ℃。

B.3.5.3 碘量瓶:100 mL。

B.3.5.4 滴定管:25 mL。

B.3.6 分析步骤**B.3.6.1 样品溶液的制备**

用已知质量的 50 mL 烧杯,称取 1 g~2 g 酶粉(精确至 0.000 1 g)或准确吸取 1.00 mL,用少量柠檬酸钠缓冲液充分溶解,并用玻璃棒捣研,将上清液小心倾入 100 mL 容量瓶中,若有剩余残渣,再加少量上述缓冲液充分研磨,最终样品全部移入容量瓶中,定容至刻度,摇匀。用 4 层纱布过滤,滤液待用。

注:待测酶液需准确稀释至一定倍数,酶液浓度控制在消耗硫代硫酸钠标准溶液与空白消耗之差在 0.5 mL~1.0 mL 范围内。必要时先做预备试验。

B.3.6.2 测定

取两只比色管,分别加入 5.0 mL 果胶溶液,置于 50 ℃±0.5 ℃恒温水浴中预热 8 min;向一只比色管(空白)中加入 5.0 mL 柠檬酸钠缓冲液;向另一只比色管(样品)中加入 1.0 mL 稀释酶液和 4.0 mL 柠檬酸钠缓冲液,立即计时并摇匀,准确反应 30 min 后立即取出,加热煮沸 5 min 终止反应,冷却。取上述比色管反应液 5.0 mL 放入碘量瓶中,准确加入 1.0 mL 碳酸钠标准溶液和 5.0 mL 碘标准溶液,摇

匀,于暗处放置 20 min 后取出,加入 2.0 mL 硫酸溶液,用硫代硫酸钠标准溶液滴定至浅黄色,加淀粉指示液 3 滴,继续滴定至蓝色刚好消失为其终点,记录消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积。同时做平行样品测定。

B.3.7 结果计算

果胶酶制剂的酶活力 X_3 , 单位为 U/g(或 U/mL), 按式(B.3)计算:

$$X_3 = \frac{(A_2 - B_1) \times c_1 \times 0.51 \times 194.14 \times n_1 \times 10}{5 \times 1 \times 0.5} \quad \dots \dots \dots \quad (B.3)$$

式中：

A_2 ——空白消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);

B_1 ——样品消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);

c_1 ——硫代硫酸钠标准溶液的摩尔浓度,单位为摩尔每升(mol/L);

0.51 ——1 mmol 硫代硫酸钠相当于 0.51 mmol 的游离半乳糖醛酸；

194.14 ——半乳糖醛酸的毫摩尔质量,单位为毫克(mg);

n_1 ——稀释倍数；

10 ——反应液总体积,单位为毫升(mL);

5 ——滴定时取反应混合物的总体积,单位为毫升(mL);

1 ——反应时加入稀释酶液的体积,单位为毫升(mL);

0.5 ——反应时间,单位为小时(h)。

所得结果表示至整数。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 3%。

B.4 葡糖淀粉酶(淀粉葡萄糖苷酶)活力的测定

B.4.1 葡糖淀粉酶(淀粉葡萄糖苷酶)

以淀粉为底物，在一定条件下从淀粉的非还原性末端开始水解 α -1,4、 α -1,6、 α -1,3 葡萄糖苷键产生葡萄糖的淀粉葡萄糖苷酶。

B.4.2 葡糖淀粉酶(淀粉葡萄糖苷酶)活力

1.0 mL 酶液或 1.0 g 酶粉在 40 °C、pH 4.6 的条件下, 1 h 水解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖, 即为一个酶活力单位, 以 U/g(或 U/mL) 表示。

B.4.3 试剂和材料

B.4.3.1 0.05 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 4.6):称取乙酸钠($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)6.7 g,吸取冰乙酸2.6 mL,用水溶解并定容至1 000 mL。上述缓冲溶液的pH,应使用pH计加以校正。

B.4.3.2 0.05 mol/L 硫代硫酸钠标准滴定溶液。

B.4.3.3 0.1 mol/L 碘标准溶液。

B.4.3.4 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液。

B.4.3.5 2 mol/L 硫酸溶液:吸取分析纯浓硫酸(相对密度 1.84)5.6 mL 缓缓加入适量水中,冷却后,用

B.4.3.6 200 g/L 氢氧化钠溶液:称取氢氧化钠 20 g,用水溶解,并定容至 100 mL。

B.4.3.7 20 g/L 可溶性淀粉溶液：称取可溶性淀粉(2 ± 0.001)g，然后用少量水调匀，缓缓倾入已沸腾

的水中,煮沸、搅拌直至透明,冷却,用水定容至 100 mL。此溶液需当天配制。

注：可溶性淀粉应采用酶制剂分析专用淀粉。

B.4.4 仪器和设备

- B.4.4.1 分析天平:精度为 0.1 mg。
 - B.4.4.2 pH 计:精度为 0.01。
 - B.4.4.3 恒温水浴:40 °C ± 0.5 °C。
 - B.4.4.4 移液器。
 - B.4.4.5 磁力搅拌器。

B.4.5 测定程序

B.4.5.1 待测酶液的制备

B.4.5.1.1 液体酶: 使用移液器准确吸取适量酶样, 移入容量瓶中, 用缓冲溶液稀释至刻度, 充分摇匀, 待测。

B.4.5.1.2 固体酶:用50mL小烧杯准确称取适量酶样,精确至1mg,用少量乙酸-乙酸钠缓冲溶液溶解,并用玻璃棒仔细捣研,将上层清液小心倾入50mL容量瓶中,在沉渣中再加入少量缓冲溶液,如此反复捣研3次~4次,取上清液,最后全部移入容量瓶中,用缓冲溶液定容,待测。

注 1：制备待测酶液时，样液浓度需控制在滴定空白和样品时消耗 0.05 mol/L 硫代硫酸钠标准滴定溶液的差值在 4.5 mL~5.5 mL 范围内(酶活力为 120 U/mL~150 U/mL)。

注 2：液体酶根据产品特性也可称取，按克计算。

B.4.5.2 测定

取两支 50 mL 比色管, 分别加入可溶性淀粉溶液 25 mL 和乙酸-乙酸钠缓冲溶液 5 mL, 摆匀。于 40 °C ± 0.5 °C 的恒温水浴中预热 5 min~10 min。在第 1 支管中加入待测酶液 2.0 mL, 立即计时并摇匀。在此温度下准确反应 30 min 后, 立即向两管中各加氢氧化钠溶液 0.2 mL, 摆匀, 同时将两管取出, 迅速用水冷却, 并于第 2 支管中补加待测酶液 2.0 mL(作为空白对照)。吸取上述两管中的反应液各 5 mL, 分别于两个碘量瓶中, 准确加入碘标准溶液 10.0 mL, 再加氢氧化钠溶液 15 mL, 边加边摇匀, 并于暗处放置 15 min, 取出。用水淋洗瓶盖, 加入硫酸溶液 2 mL, 用硫代硫酸钠标准滴定溶液滴定蓝紫色溶液, 直至刚好无色为其终点, 分别记录空白和样品消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积。

B.4.6 结果计算

葡萄糖淀粉酶制剂的酶活力 X_4 , 单位为 U/g(或 U/mL), 按式(B.4)计算:

$$X_4 = \frac{(A_3 - B_2) \times c_2 \times 90.05 \times 32.2 \times n_2 \times 2}{5} \times \frac{1}{2} \quad \dots \dots \dots \text{ (B.4)}$$

式中：

A_3 ——滴定空白时,消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积,单位为毫升(mL);

B_2 ——滴定样品时,消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积,单位为毫升(mL);

c_2 ——硫代硫酸钠标准滴定溶液的准确浓度,单位为摩尔每升(mol/L);

90.05——与 1.00 mL 硫代硫酸钠标准溶液相当的葡萄糖的摩尔质量, 单位为克每摩尔(g/mol) ($M=90.05$);

32.2 ——反应液的总体积,单位为毫升(mL);

n_2 —— 稀释倍数：

2 ——反应 30 min, 换算成 1 h 的酶活力系数;

5 ——吸取反应液的体积,单位为毫升(mL);

1/2 ——折算成 1 mL 酶液的量。

以样品测定结果的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%。

B.5 转葡萄糖苷酶活力的测定

B.5.1 转葡萄糖苷酶

可水解麦芽糖分子及直链麦芽糊精中 α -1,4-糖苷键,同时将游离出来的葡萄糖残基转移到一个葡萄糖分子或麦芽糖、麦芽三糖分子上,形成 α -1,6 糖苷键,生成异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等含 α -1 键的寡糖的酶。

B.5.2 转葡萄糖苷酶活力

在 40 °C、pH 5.0 的条件下,1 mL 酶样品与底物 α -甲基-D-葡萄糖苷起反应,60 min 生成 1 μ g 的葡萄糖,即为 1 个酶活力单位,以 U/g(或 U/mL)表示。

B.5.3 原理

转葡萄糖苷酶作用于底物 α -甲基-D-葡萄糖苷,生成的葡萄糖与含有葡萄糖氧化酶、过氧化酶的 4-氨基安替比林和酚试剂进行显色反应定量测定。

B.5.4 试剂和材料

B.5.4.1 0.1 mol/L 乙酸溶液: 将乙酸(CH_3COOH)6.0 g 溶于水,稀释至 1 000 mL。

B.5.4.2 0.1 mol/L 乙酸钠溶液: 将乙酸钠(CH_3COONa)8.20 g 溶于水,稀释至 1 000 mL。

B.5.4.3 0.02 mol/L 乙酸-乙酸钠溶液(pH 5.0): 将乙酸溶液(B.5.4.1)20 mL 溶于水,稀释至 100 mL(试剂 A);将乙酸钠溶液(B.5.4.2)20 mL 溶于水,稀释至 100 mL(试剂 B);将 A 和 B 混合,调节 pH 至 5.0。

B.5.4.4 Tris-磷酸盐缓冲液(pH 7.2): 将 Tris(羟甲基)氨基甲烷 [$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$]36.3 g 和二水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)50.0 g 溶于 900 mL 水,用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 7.2,用水稀释至 1 000 mL。

B.5.4.5 0.4% 4-氨基安替比林溶液: 将 4-氨基安替比林($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ON}_3$)200 mg 溶于水,稀释至 50 mL。

B.5.4.6 5% 苯酚溶液: 将苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)5 g 溶于 50 mL 60 °C 水中,将溶液冷却至室温,用水稀释至 100 mL。

B.5.4.7 4-氨基安替比林-苯酚显色剂: 在 Tris-磷酸盐缓冲液 40 mL 中,加入葡萄糖氧化酶(5 mg 葡萄糖氧化酶)550 U 和过氧化物酶(0.76 mg,165 U/mg 的过氧化物酶)125 U,再加入 4-氨基安替比林溶液 1 mL 和苯酚溶液 1.4 mL,用 Tris-磷酸盐缓冲液稀释至 50 mL(现用现配)。

B.5.4.8 底物溶液: 将 α -甲基葡萄糖($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6$)2.0 g 溶解于 50 mL 水中,用水稀释至 100 mL(现用现配)。

B.5.5 分析步骤

B.5.5.1 样品溶液的制备

称取 1 g 酶样,精确至 ± 0.0001 g 或吸取酶样 1 mL,精确至 0.01 mL,于 50 mL 容量瓶中,用经冷却的水稀释至刻度,混匀。

注:配制的样品溶液使其 0.5 mL 的 $A_{60} \sim A_0$ 介于 0.15~0.32 之间。

B.5.5.2 测定

吸取底物溶液 1 mL 和 0.02 mol/L 乙酸-乙酸钠溶液 1 mL 加入 15 mm×150 mm 的试管中，在 40 ℃±0.5 ℃ 的恒温水浴箱中保温 10 min。加入样品溶液 0.5 mL，混匀，于 40 ℃±0.5 ℃ 的恒温水浴箱中保温 60 min 后，将试管转移至沸水浴中加热 5 min，然后用流水快速冷却后，吸取此溶液 0.1 mL 到试管中，并加入 4-氨基安替比林-苯酚显色剂 3 mL，混匀。将此试管放入 40 ℃±0.5 ℃ 的恒温水浴箱中，保温 20 min 后，测定 500 nm 处的吸光度 A₅₀。

空白对照:吸取 0.02 mol/L 乙酸-乙酸钠溶液 1 mL 和样品溶液 0.5 mL 加入 15 mm×150 mm 的试管中,混匀。将试管转移至沸水浴中加热 5 min,然后用流水快速冷却。冷却后,加入底物溶液 1 mL,混匀。吸取此溶液 0.1 mL 到空试管中,加入 4-氨基安替比林-苯酚显色剂 3 mL,混匀。将此试管放入 40 ℃±0.5 ℃ 的恒温水浴箱中,保温 20 min,测定 500 nm 处的吸光度 A_0 。

精确称取 105 ℃下干燥 6 h 的葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)1.000 g, 溶于 100 mL 水中, 分别取 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL 和 5.0 mL, 用水定容至 100 mL(每 1 mL 该溶液分别含有 100 μ g、200 μ g、300 μ g、400 μ g 和 500 μ g 的葡萄糖)。

分别吸取以上葡萄糖标准液 0.1 mL 和 4-氨基安替比林-苯酚显色剂 3 mL 加入 15 mm×150 mm 的试管中, 混匀。将这些试管放入 40 °C±0.5 °C 的恒温水浴箱中, 保温 20 min, 测定 500 nm 处的吸光度 A_{s10} 、 A_{s20} 、 A_{s30} 、 A_{s40} 和 A_{s50} 。

标准液的空白对照：用水来替代葡萄糖标准液，按上述方法测定空白对照液吸光度 A_{s0} 。

B.5.6 结果计算

转葡萄糖苷酶活力 X_5 , 单位为 U/g(或 U/mL), 按式(B.5)计算:

式中：

A_{60} ——酶样品反应液的吸光度值；

A_0 —— 空白对照液的吸光度值；

G ——吸光度差为 1.000 时,由葡萄糖标准曲线求得的葡萄糖量,单位为微克(μg);

2.5——反应体系的总容量,单位为毫升(mL);

0.1——反应体系的取样量,单位为毫升(mL);

n_3 ——酶样品的稀释倍数；

0.5——反应体系中酶样品的添加量,单位为毫升(mL)。

其中, G 按式(B.6)计算:

$$G = \frac{10}{A_{\text{s}10} - A_{\text{s}0}} + \frac{20}{A_{\text{s}20} - A_{\text{s}0}} + \frac{30}{A_{\text{s}30} - A_{\text{s}0}} + \frac{40}{A_{\text{s}40} - A_{\text{s}0}} + \frac{50}{A_{\text{s}50} - A_{\text{s}0}} \quad \dots \dots \dots \text{(B.6)}$$

式中：

A_{sx} ——各反应液对应的吸光度值；

A_{s0} ——空白对照液对应的吸光度值。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 5%。

B.5.7 转葡萄糖苷酶中糖化酶活力的测定

B.5.7.1 原理

酶作用于淀粉溶液生成还原糖。然后加入费林试剂，在加热的情况下，定量生成氧化亚铜沉淀。在

加入碘化钾和硫酸后，生成游离碘，此时，立即用硫代硫酸钠溶液滴定。

B.5.7.2 试剂和材料

B.5.7.2.1 30%碘化钾溶液:碘化钾150 g溶解于350 mL水,保存在褐色试剂瓶中,避免阳光直射。

B.5.7.2.2 25%硫酸溶液:硫酸 125 g 溶于 375 mL 水。

B.5.7.2.3 0.05 mol/L 硫代硫酸钠溶液: 将定量分析用的 0.1 mol/L 硫代硫酸钠溶液 500 mL 用煮沸过的冷却水稀释, 所得溶液的总体积为 1 000 mL。配制好后, 应进行标定, 求出浓度校正系数 f 值。

B.5.7.2.4 1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 4.5):将 1 mol/L 乙酸钠溶液加入 1 mol/L 乙酸溶液中，调节 pH 至 4.5。

B.5.7.2.5 可溶性淀粉溶液(pH 4.5):将可溶性淀粉(试剂级)在 105 ℃干燥 4 h 后称量计算含水量。然后,根据可溶性淀粉的含水量称取 0.50 g(折干)的可溶性淀粉,缓慢加入沸水 50 mL 中,煮沸 5 min,用自来水冷却后,加入 1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液 5.0 mL,用水定容至 100 mL。

B.5.7.2.6 费林试剂如下：

——铜溶液：硫酸铜 34.66 g 溶解于水中，定容至 500 mL；

——酒石酸钾钠碱溶液：酒石酸钾钠 173 g 和氢氧化钠 50 g 溶解于水中，定容至 500 mL；

——上述溶液使用前,精确地取等体积的铜溶液和碱液充分混合。

B.5.7.3 分析步骤

B.5.7.3.1 样品溶液的制备

用水稀释酶样品,使得到酶液的 $(T_0 - T_{30}) \times f \times 1.62$ 值为 3 mg~10 mg 葡萄糖量。

B.5.7.3.2 测定

将可溶性淀粉溶液 10 mL 加入 100 mL 三角瓶中, 置于 40 ℃ ± 0.5 ℃ 的恒温水浴箱中, 预热 10 min~15 min, 加入样品稀释酶液 1 mL。准确加热 30 min 后, 加入费林试剂 4 mL 使酶失活。将三角瓶直接在煤气喷灯(或电炉)上加热 2 min 后, 立即放在自来水中冷却。随后, 加入 30% 碘化钾溶液 2 mL, 用硫代硫酸钠溶液滴定游离出的碘, 以蓝色消失为滴定终点 T_{30} (mL)。

空白对照试验：以水取代酶液，在另一个三角瓶中用上述同样的操作步骤测定空白对照值 T_0 (mL)。临近终点时，加入 1% 可溶性淀粉溶液[应使用可溶性淀粉(试剂级)另行配制]1 滴～2 滴，以蓝色消失作为滴定终点。

B.5.7.4 结果计算

在上述试验条件下,反应 30 min,反应液中产生相当于 10 mg 葡萄糖的还原糖所需的酶量,定义为 1 个葡萄糖淀粉酶活力单位。

转葡萄糖苷酶中糖化酶活力 X_6 , 单位为 U/g(或 U/mL), 按式(B.7)计算:

式中：

T_0 ——空白溶液滴定消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);

T_{30} ——酶反应液滴定消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);

f ——0.05 mol/L 硫代硫酸钠标准溶液浓度的校正系数；

1.62 ——换算系数;

1/10 ——该分析方法的常数(相当于 10 mg 葡萄糖的还原糖);

n ——样品的稀释倍数。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 5%。
