



中华人民共和国国家标准

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

2016-08-31 发布

2017-01-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB 25594—2010《食品安全国家标准 食品工业用酶制剂》,GB 8276—2006《食品添加剂 糖化酶制剂》,GB 20713—2006《食品添加剂 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂》,GB 8275—2009《食品添加剂 α -淀粉酶制剂》。

本标准与 GB 25594—2010 相比,主要变化如下:

- 增加了酶活力的术语和定义;
- 增加了产品分类、理化要求;
- 在附录中给出了部分酶制剂的酶活力测定方法。

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 GB 2760 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,或由传统或通过基因修饰的微生物(包括但不限于细菌、放线菌、真菌菌种)发酵、提取制得,用于食品加工,具有特殊催化功能的生物制品。

注:商品化的酶制剂产品允许加入易于产品贮存、使用的配料成分。

2.2 酶活力

酶在一定条件下催化某一特定反应的能力,即为酶活力,是表达酶制剂产品的一个特征性专属指标。

2.3 抗菌活性

抑制或杀灭微生物的能力。

3 产品分类

按产品形态分为固体剂型和液体剂型两类。

4 技术要求

4.1 原料要求

4.1.1 用于生产酶制剂的原料必须符合良好生产规范或相关要求,在正常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 来源于动物的酶制剂,其动物组织必须符合肉类检疫要求。

4.1.3 来源于植物的酶制剂,其植物组织不得霉变。

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,并应符合有关规定。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。

4.2 产品要求

4.2.1 理化指标

产品酶活力在标示值的 85%~115%。

注：本标准附录 A 给出的酶活力测定方法供参考。企业可按相应标准中给出的或企业规定的方法测定。

4.2.2 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	指 标	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 5009.11

4.2.3 微生物指标

微生物指标应符合表 2 的规定。

表 2 微生物指标

项 目	指 标	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 <	10	GB 4789.38
	MPN/g 或 MPN/mL ≤	3.0	
沙门氏菌(25 g 或 25 mL)	不得检出	GB 4789.4	

注：经基因重组技术得到的微生物生产的酶制剂不应检出生产菌。

4.2.4 抗菌活性

微生物来源的酶制剂不得检出抗菌活性,抗菌活性按 GB 4789.43 执行。

附录 A 酶活力测定方法

A.1 一般规定

本标准所用试剂和水,在没有注明其他要求时,均指分析纯试剂和 GB/T 6682 规定的三级水。试验中所用标准溶液、杂质标准溶液、制剂及制品,在没有注明其他要求时,均按 GB/T 601、GB/T 602 和 GB/T 603 的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

A.2 α -淀粉酶活力的测定

A.2.1 α -淀粉酶

能水解淀粉分子链中的 α -1,4 葡萄糖苷键,将淀粉链切断成为短链糊精和少量麦芽糖和葡萄糖,使淀粉黏度迅速下降的酶。

A.2.2 α -淀粉酶活力

A.2.2.1 中温 α -淀粉酶活力单位

1 g 固体酶粉(或 1 mL 液体酶),于 60 °C、pH 6.0 条件下,1 h 液化 1 g 可溶性淀粉,即为 1 个酶活力单位,以 U/g(U/mL)表示。

A.2.2.2 耐高温 α -淀粉酶活力单位

1 g 固体酶粉(或 1 mL 液体酶),于 70 °C、pH 6.0 条件下,1 min 液化 1 mg 可溶性淀粉,即为 1 个酶活力单位,以 U/g(U/mL)表示。

A.2.3 原理

α -淀粉酶制剂能将淀粉分子链中的 α -1,4 葡萄糖苷键随机切断成长短不一的短链糊精、少量麦芽糖和葡萄糖,而使淀粉对碘呈蓝紫色的特性反应逐渐消失,呈现棕红色,其颜色消失的速度与酶活性有关,据此可通过反应后的吸光度计算酶活力。

A.2.4 试剂和材料

A.2.4.1 碘。

A.2.4.2 碘化钾。

A.2.4.3 原碘液:称取 11.0 g 碘和 22.0 g 碘化钾,用少量水使碘完全溶解,定容至 500 mL,贮存于棕色瓶中。

A.2.4.4 稀碘液:吸取原碘液 2.00 mL,加 20.0 g 碘化钾用水溶解并定容至 500 mL,贮存于棕色瓶中。

A.2.4.5 可溶性淀粉溶液(20 g/L):称取 2.000 g(精确至 0.001 g)可溶性淀粉(以绝干计)于烧杯中,用少量水调成浆状物,边搅拌边缓缓加入 70 mL 沸水中,然后用水分次冲洗装淀粉的烧杯,洗液倒入其中,搅拌加热至完全透明,冷却定容至 100 mL。溶液现配现用。

注:可溶性淀粉应采用酶制剂分析专用淀粉。

A.2.4.6 磷酸缓冲液(pH 6.0):称取 45.23 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)和 8.07 g 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$),用水溶解并定容至 1 000 mL。用 pH 计校正后使用。

A.2.4.7 盐酸溶液 $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ 。

A.2.5 仪器和设备

A.2.5.1 分光光度计。

A.2.5.2 恒温水浴:精度 $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

A.2.5.3 自动移液器。

A.2.5.4 试管:25 mm \times 200 mm。

A.2.5.5 秒表。

A.2.6 分析步骤

A.2.6.1 待测酶液的制备

称取试样 1 g~2 g(精确至 0.000 1 g)或准确吸取 1.00 mL,用少量磷酸缓冲液充分溶解,将上清液小心倾入容量瓶中,若有残余残渣,再加少量磷酸缓冲液充分研磨,最终样品全部移入容量瓶中,用磷酸缓冲液定容至刻度,摇匀。用四层纱布过滤,滤液待用。

注:待测中温 α -淀粉酶酶液酶活力控制酶浓度在 3.4 U/mL~4.5 U/mL 范围内,待测耐高温 α -淀粉酶活力控制酶浓度在 60 U/mL~65 U/mL 范围内。

A.2.6.2 测定

- 吸取 20.0 mL 可溶性淀粉溶液于试管中,加入磷酸缓冲液 5.00 mL,摇匀后,置于 $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ (耐高温 α -淀粉酶制剂置于 $70 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$)恒温水浴中预热 8 min;
- 加入 1.00 mL 稀释好的待测酶液,立即计时,摇匀,准确反应 5 min;
- 立即用自动移液器吸取 1.00 mL 反应液,加到预先盛有 0.5 mL 盐酸溶液和 5.00 mL 稀碘液的试管中,摇匀,并以 0.5 mL 盐酸溶液和 5.00 mL 稀碘液为空白,于 660 nm 波长下,用 10 mm 比色皿迅速测定其吸光度(A)。根据吸光度查表附录 B,求得测试酶液的浓度。

A.2.6.3 结果计算

A.2.6.3.1 中温 α -淀粉酶制剂的酶活力

中温 α -淀粉酶制剂的酶活力 X_1 ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.1)计算:

$$X_1 = c \times n \quad \dots\dots\dots(A.1)$$

式中:

c ——测试酶样浓度,单位为 U/mL 或 U/g;

n ——样品的稀释倍数。

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 5%。

A.2.6.3.2 耐高温 α -淀粉酶制剂的酶活力

耐高温 α -淀粉酶制剂的酶活力 X_2 ,以 U/mL 或 U/g 计,按式(A.2)计算:

$$X_2 = c \times n \times 16.67 \quad \dots\dots\dots(A.2)$$

式中:

c ——测试酶样的浓度,单位为 U/mL 或 U/g;

n ——样品的稀释倍数;

16.67——根据酶活力定义计算的换算系数。

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相对误差不得超过5%。

A.3 葡糖淀粉酶(淀粉葡萄糖苷酶)活力的测定(黑曲霉及其变异株来源)

A.3.1 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。

A.3.2 葡糖淀粉酶(淀粉葡萄糖苷酶)活力

1 mL 酶液或 1 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/mL(或 U/g)表示。

A.3.3 试剂和材料

A.3.3.1 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,应使用酸度计加以校正。

A.3.3.2 0.05 mol/L 硫代硫酸钠标准滴定溶液。

A.3.3.3 0.1 mol/L 碘标准溶液。

A.3.3.4 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液。

A.3.3.5 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,用水定容至 100 mL,摇匀。

A.3.3.6 200 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。

A.3.3.7 20 g/L 可溶性淀粉溶液:称取可溶性淀粉 2 g \pm 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。

A.3.4 仪器和设备

A.3.4.1 分析天平:精度 0.2 mg。

A.3.4.2 酸度计:精度 0.01 pH。

A.3.4.3 分析天平:精度 0.2 mg。

A.3.4.4 恒温水浴:40 °C \pm 0.1 °C。

A.3.4.5 连续多档分配器(移液枪)。

A.3.4.6 磁力搅拌器。

A.3.5 分析步骤

A.3.5.1 待测酶液的制备

A.3.5.1.1 液体酶:使用连续多档分配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。

A.3.5.1.2 固体酶:用 50 mL 小烧杯准确称取适量酶样,精确至 1 mg,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适当的容量瓶中,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,磁力搅拌 30 min 以充分混匀,取上清液测定。

注:1. 制备待测酶液时,样液浓度应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(酶活力约为 120 U/mL~150 U/mL)。

2. 液体酶根据产品特性也可称取,按克计算。

A.3.5.2 测定

取 A、B 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,摇匀。于 40 °C ±0.2 °C 的恒温水浴中预热 5 min~10 min。在 B 管中加入待测酶液 2.0 mL,立即计时,摇匀。在此温度下准确反应 30 min 后,立即向 A、B 两管中各加氢氧化钠溶液 0.2 mL,摇匀,同时将两管取出,迅速用水冷却,并于 A 管中补加待测酶液 2.0 mL(作为空白对照)。

吸取上述 A、B 两管中的反应液各 5.0 mL,分别于两个碘量瓶中,准确加入碘标准溶液 0.0 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(A、B)。

A.3.6 结果计算

葡萄糖淀粉酶制剂的酶活力 X_3 ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.3)计算:

$$X_3 = \frac{(A - B) \times c_1 \times 90.05 \times 32.2 \times n \times 2}{5} \times \frac{1}{2} \dots\dots\dots(A.3)$$

式中:

A —— 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 —— 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_1 —— 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,g/mol($M=90.05$);

32.2 —— 反应液的总体积,单位为毫升(mL);

5 —— 吸取反应液的体积;

1/2 —— 折算成 1 mL 酶液的量;

n —— 稀释倍数;

2 —— 反应 30 min,换算成 1 h 的酶活力系数。

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%。

A.4 蛋白酶活力的测定

A.4.1 蛋白酶

能切断蛋白质分子内部的肽键,使蛋白质分子变成小分子多肽和氨基酸的酶。

A.4.2 蛋白酶活力

蛋白酶活力以蛋白酶活力单位表示,定义为 1 g 或 1 mL 酶,在一定温度和 pH 条件下,1 min 水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸,即为 1 个酶活力单位,以 U/g(U/mL)表示。

A.4.3 原理

蛋白酶在一定的温度与 pH 条件下,水解酪蛋白底物,产生含有酚基的氨基酸(如:酪氨酸、色氨酸等),在

碱性条件下,将福林试剂还原,生成钼蓝与钨蓝,用分光光度计于波长 680 nm 下测定溶液的吸光度。酶活力与吸光度成比例,由此可以计算产品的酶活力。

A.4.4 试剂和材料

A.4.4.1 福林试剂:于 2 000 mL 磨口回流装置中加入钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)100.0 g、钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)25.0 g、水 700 mL、85%磷酸 50 mL、浓盐酸 100 mL。小火沸腾回流 10 h,取下回流冷却器,在通风橱中加入硫酸锂(Li_2SO_4)50 g、水 50 mL 和数滴浓溴水(99%),再煮沸 15 min,以除去多余的溴(冷后仍有绿色需再加溴水,再煮沸除去过量的溴),冷却,加水定容至 1 000 mL。混匀,过滤。制得的试剂应呈金黄色,贮存于棕色瓶内。

A.4.4.2 福林使用溶液:一份福林试剂与二份水混合,摇匀。也可使用市售福林溶液配制。

A.4.4.3 碳酸钠溶液(42.4 g/L):称取无水碳酸钠(Na_2CO_3) 42.4 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

A.4.4.4 三氯乙酸(65.4 g/L):称取三氯乙酸 65.4 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

A.4.4.5 氢氧化钠溶液(20 g/L):称取氢氧化钠片剂 20.0 g,加水 900 mL 并搅拌溶解。待溶液到室温后续水定容至 1 000 mL,搅拌均匀。

A.4.4.6 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=1 \text{ mol/L}$ 。

A.4.4.7 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ 。

A.4.4.8 缓冲溶液。

以下各种缓冲溶液配制时需用 pH 计测定并调整 pH。

A.4.4.8.1 磷酸缓冲液($\text{pH}=7.5$,适用于中性蛋白酶制剂)。

分别称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)6.02 g 和磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)0.5 g,加水溶解并定容至 1 000 mL。

A.4.4.8.2 乳酸钠缓冲液($\text{pH}=3.0$,适用于酸性蛋白酶制剂)。

取乳酸(80%~90%) 4.71 g 和乳酸钠(70%)0.89 g,加水至 900 mL,搅拌至均匀。用乳酸或乳酸钠调整 pH 到 3.0 ± 0.05 ,定容至 1 000 mL。

A.4.4.8.3 硼酸缓冲溶液($\text{pH}=10.5$,适用于碱性蛋白酶制剂)。

称硼酸钠 9.54 g,氢氧化钠 1.60 g,加水 900 mL,搅拌至均匀。用 1 mol/L 盐酸溶液或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调整 $\text{pH}=10.5 \pm 0.05$,定容至 1 000 mL。

A.4.4.9 酪蛋白溶液(10.0 g/L):称取标准酪蛋白(NICBPB 国家药品标准物质)1.000 g,精确到 0.001 g,用少量氢氧化钠溶液(若酸性蛋白酶制剂则用浓乳酸 2 滴~3 滴)湿润后,加入相应的缓冲溶液约 80 mL,在沸水浴中加热煮沸 30 min,并不时搅拌至酪蛋白全部溶解。冷却到室温后转入 100 mL 容量瓶中,用适宜的 pH 缓冲溶液稀释至刻度。定容前检查并调整 pH 至相应缓冲液的规定值。此溶液在冰箱内贮存,有效期为 3 天。使用前重新确认并调整 pH 至规定值。

注:不同来源或批号的酪蛋白对试验结果有影响。如使用不同的酪蛋白作为底物,使用前应与以上标准酪蛋白进行结果比对。

A.4.4.9.1 L-酪氨酸标准储备溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):精确称取预先于 105 $^\circ\text{C}$ 干燥至恒重的 L-酪氨酸 0.100 0 g \pm 0.000 2 g,用 1 mol/L 盐酸溶液 60 mL 溶解后定容至 100 mL,即为 1 mg/mL 酪氨酸溶液。

吸取 1 mg/mL 酪氨酸溶液 10.00 mL,用 0.1 mol/L 盐酸溶液定容至 100 mL,即得到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 L-酪氨酸标准储备溶液。

注:除上述蛋白酶的溶解/稀释缓冲体系外,生产者和使用者还可以探讨使用其他适用的缓冲体系。

A.4.5 仪器和设备

A.4.5.1 分析天平:精度为 0.000 1 g。

A.4.5.2 紫外-可见分光光度计。

A.4.5.3 恒温水浴锅:精度 ± 0.2 °C。

A.4.5.4 pH计:精度为0.01 pH单位。

A.4.6 分析步骤

A.4.6.1 标准曲线的绘制

标准曲线的绘制按如下操作:

a) L-酪氨酸标准溶液:按表 A.1 配制。

表 A.1 L-酪氨酸标准溶液

管号	酪氨酸标准溶液的浓度 $\mu\text{g/mL}$	酪氨酸标准储备溶液的体积 mL	加水的体积 mL
0	0	0	10
1	10	1	9
2	20	2	8
3	30	3	7
4	40	4	6
5	50	5	5

b) 分别取上述溶液各 1.00 mL(应做平行试验),各加碳酸钠溶液 5.00 mL、福林试剂使用溶液 1.00 mL,振荡均匀,置于 $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中显色 20 min,取出,用分光光度计于波长 680 nm,10 mm 比色皿,以不含酪氨酸的 0 管为空白,分别测定其吸光度。以吸光度 A 为纵坐标,酪氨酸的浓度 c 为横坐标,绘制标准曲线。

c) 利用回归方程,计算出当吸光度为 1 时的酪氨酸的量(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,进行试验。

注: L-酪氨酸稀释液应在稀释后立即进行测定。

A.4.6.2 待测酶液的制备

称取酶样品 1 g~2 g,精确至 0.000 2 g。然后用相应的缓冲液溶解并稀释到一定浓度,推荐浓度范围为酶活力 10 U/mL~15 U/mL。

对于粉状的样品,可以用相应的缓冲液充分溶解,然后取滤液(慢速定性滤纸)稀释至适当浓度。

A.4.6.3 测定

按如下进行测定:

a) 先将酪蛋白溶液放入 $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中,预热 5 min;

b) 按下列程序操作:

试管 A(空白)

↓

加酶液 1.00 mL

↓ $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min

试管 B(酶试样,需作三个平行试样)

↓

加酶液 1.00 mL

↓ $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min

加三氯乙酸 2.00 mL(摇匀)	加酪蛋白溶液 1.00 mL(摇匀)
↓ 40 °C ± 0.2 °C, 10 min	↓ 40 °C ± 0.2 °C, 10 min
加酪蛋白溶液 1.00 mL(摇匀)	加三氯乙酸 2.00 mL(摇匀)
↓	↓
取出静置 10 min, 过滤(慢速定性滤纸)	取出静置 10 min, 过滤(慢速定性滤纸)
↓	↓
取 1.00 mL 滤液	取 1.00 mL 滤液
↓	↓
加碳酸钠溶液 5.0 mL	加碳酸钠溶液 5.0 mL
↓	↓
加福林试剂使用溶液 1.00 mL	加福林试剂使用溶液 1.00 mL
↓ 40 °C ± 0.2 °C, 显色 20 min	↓ 40 °C ± 0.2 °C, 显色 20 min
于 680 nm 波长, 用 10 mm 比色皿测定吸光度	于 680 nm 波长, 用 10 mm 比色皿测定吸光度
注: 枯草芽孢来源的中性蛋白酶制剂, 除反应与显色温度为 30 °C ± 0.2 °C 外, 其他操作同上, 标准曲线做同样处理。	

A.4.7 结果计算

从标准曲线上读出样品最终稀释液的酶活力, 蛋白酶制剂的酶活力 X_4 , 单位为 U/mL 或 U/g, 按式 (A.4) 计算:

$$X_4 = \frac{A_1 \times V_1 \times 4 \times n_1}{m_1 \times 10} \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

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 U/mL;

V_1 ——溶解样品所使用的容量瓶的体积, 单位为毫升(mL);

4 ——反应试剂的总体积, 单位为毫升(mL);

n_1 ——样品的稀释倍数;

m_1 ——样品的质量, 单位为克(g);

10 ——反应时间, 单位为分钟(min)。

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%。

A.5 果胶酶活力的测定(黑曲霉来源)

A.5.1 果胶酶

能水解果胶, 生成含有还原性基团产物的酶。

A.5.2 果胶酶活力

在 50 °C、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。

A.5.3 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性。

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。

A.5.4 试剂和材料

A.5.4.1 10 g/L 柑橘果胶溶液:称取果胶粉 1.000 0 g(Sigma P9135 或相当,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,冰箱储存备用。使用时间不超过 3 天。

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,应与旧批次进行对照试验。

A.5.4.2 硫代硫酸钠标准溶液: $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.05 \text{ mol/L}$ 。

A.5.4.3 碳酸钠标准溶液: $c\left(\frac{1}{2} \text{Na}_2\text{CO}_3\right)=2 \text{ mol/L}$ 。

A.5.4.4 碘标准溶液: $c\left(\frac{1}{2} \text{I}_2\right)=0.1 \text{ mol/L}$ 。

A.5.4.5 2 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。

A.5.4.6 可溶性淀粉指示液(10 g/L)。

A.5.4.7 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.5):称取柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)14.71 g,柠檬酸三钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)8.82 g,加 950 mL 水溶解,调节 pH 至 3.5,再用水定容至 1 000 mL。

A.5.5 仪器和设备

A.5.5.1 比色管:25 mL。

A.5.5.2 带加热装置的恒温水浴:控温精度 $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

A.5.5.3 碘量瓶:250 mL。

A.5.5.4 滴定管:25 mL。

A.5.6 分析步骤

A.5.6.1 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-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。用四层纱布过滤,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。必要时可先做预备试验。

A.5.6.2 测定

于甲、乙两支比色管中,分别加入 5 mL 果胶溶液,置于 $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中预热 8 min;向甲管(空白)加入 5 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;向乙管(样品)中加入 1 mL 稀释酶液和 4 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,立即摇匀,计时,准确反应 30 min 后,立即取出,加热煮沸 5 min 终止反应,冷却;取上述甲、乙管反应液各 5 mL 放入碘量瓶中,准确加入 4 mL 碳酸钠标准溶液和 5 mL 碘标准溶液,摇匀,于暗处放置 20 min;取出,加入 2 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,记录甲管、乙管反应液消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积。同时做平行样品测定。

A.5.7 结果计算

果胶酶制剂的酶活力 X_5 ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.5)计算:

$$X_5 = \frac{(A_2 - B_2) \times c_2 \times 0.51 \times 194.14 \times n \times 10}{5 \times 1 \times 0.5} \dots\dots\dots(A.5)$$

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_2 ——样品消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,单位为毫升(mL);
 c_2 ——硫代硫酸钠标准溶液的浓度,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 ——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%。

A.6 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定

A.6.1 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。

A.6.2 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 -乙酰乳酸起反应,每分钟生成 1 μ mol 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。

A.6.3 分光光度计法

A.6.3.1 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。

A.6.3.2 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。

A.6.3.3 试剂和材料

A.6.3.3.1 MES(9.76 g/L)-氯化钠(35.064 g/L)-聚氧化乙烯十二烷基醚¹⁾(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 到 6.00 ± 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($15\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$)下的保存期为一周。

A.6.3.3.2 α -乙酰乳酸底物(2.00 mL/L):吸取乙基-2-乙酰基-2-甲基乙酰乙酸 100 μL 于 50 mL 容量瓶中,加入约 0.50 mol/L 的氢氧化钠溶液 6.0 mL,搅拌 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 到 6.00 ± 0.05 。然后,再用缓冲液定容。该溶液使用前配制。

A.6.3.3.3 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。

A.6.3.3.4 乙偶姻(3-羟基-2-丁酮)储备液(1.000 g/L):取一定量的乙偶姻于试管中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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,因此应放置在干燥器中冷藏($2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 6\text{ }^{\circ}\text{C}$)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一周。

A.6.3.3.5 乙偶姻标准溶液

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

A.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 ^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。

A.6.3.4 仪器和设备

A.6.3.4.1 分析天平:精度为 0.000 1 g。

A.6.3.4.2 酸度计:精度为 0.01 pH 单位。

A.6.3.4.3 恒温水浴锅: $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1) Brij[®] 35 是适合的市售产品。也可用同等分析效果的产品。

A.6.3.4.4 分光光度计:可在 522 nm 下测定吸光度。

A.6.3.4.5 计时器。

A.6.3.4.6 涡旋振荡器。

A.6.3.5 分析步骤

A.6.3.5.1 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 μL (表 A.2)到 10 mL 的试管中。然后,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。置于室温,并开始计时。

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。

A.6.3.5.2 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。

A.6.3.5.3 样品溶液的制备

从样品中称取一定量的试料,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。

A.6.3.5.4 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)。

A.6.3.5.5 酶样品的反应

将试样溶液和底物先置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热约 10 min,然后,按下述方法处理每一个试样溶液:

- 样品吸光度值 H_1 :吸取酶样品溶液 200.0 μL 于 30 $^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ $^{\circ}\text{C}$ 水浴中的 10 mL 试管里,然后加入预热好的底物 200.0 μL ,用涡旋振荡器充分混匀,迅速放回到水浴中,并开始计时。
- 空白吸光度值 H_2 :用缓冲液代替试料溶液,依上述步骤进行操作。
- 反应 20.0 min 后,依次向每支试管中加入显色剂 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。

A.6.3.6 结果计算

α -乙酰乳酸脱羧酶制剂的酶活力 X_6 ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.6)计算:

$$X_6 = \frac{(H_1 - H_2) \times 0.001\ 135\ 1 \times F}{m \times h} \dots\dots\dots(\text{A.6})$$

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 ——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。

A.6.3.7 结果表示

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

A.6.4 全自动生化分析仪法

A.6.4.1 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0.6 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。

A.6.4.2 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。

A.6.4.3 试剂和材料

A.6.4.3.1 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A.6.3.3.1。

A.6.4.3.2 α -乙酰乳酸底物(2.00 mL/L):见A.6.3.3.2。

A.6.4.3.3 萘酚(10.0 g/L)/肌酸(1.0 g/L)显色剂:见A.6.3.3.3。

A.6.4.4 仪器和设备

A.6.4.4.1 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 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

如:Konelab 30(Thermo Clinical Labsystems,芬兰)或同等分析效果的仪器。

A.6.4.4.2 分析天平:精度为0.000 1 g。

A.6.4.4.3 酸度计:精度为0.01 pH。

A.6.4.5 分析步骤

A.6.4.5.1 标准曲线的制备

称取一定量的 α -乙酰乳酸脱羧酶标准品,精确到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。

按表A.3配制标准曲线。标准储备液和标准曲线应每日配制。

表 A.3 α -乙酰乳酸脱羧酶标准曲线

标准点	标准储备液 μL	缓冲液 μL	稀释倍数	稀释后活性 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 用缓冲液做标准点 1。

A.6.4.5.2 标准对照品的制备

标准对照品的制备按如下操作：

- 取一定量的乙偶姻于试管中，在 37 °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，精确到 0.000 1 g，用缓冲液溶解并定容至 200 mL，得到标准对照品储备液。然后再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。

标准对照品储备液在 4 °C ~ 8 °C 并且避光的条件下的保存期为一周。

A.6.4.5.3 样品溶液的制备

从样品中称取一定量的试样，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 mU/mL ~ 62.5 mU/mL 范围内。

A.6.4.5.4 酶活力自动分析参考条件

A.6.4.5.4.1 底物保温周期

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

A.6.4.5.4.2 酶反应周期

- 温度：30 °C；
- 时间：650 s；
- 样品稀释液：40 μL ；
- 水：20 μL 。

A.6.4.5.4.3 显色反应周期

- 温度：30 °C；
- 时间：240 s；

- 显色试剂:80 μL ;
- 水:15 μL 。

A.6.4.5.4.4 测定周期

- 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。

A.6.4.6 结果计算和表示

A.6.4.6.1 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。

A.6.4.6.2 样品活性的计算

从标准曲线上读出样品最终稀释液的活性力,单位为 mU/mL。

α -乙酰乳酸脱羧酶制剂的酶活力 X_7 ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.7)计算:

$$X_7 = \frac{A_4 \times F \times D}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(A.7)$$

式中:

- A_4 ——由标准曲线得出的样品最终稀释液的活性力,单位为 mU/mL;
- F ——溶解样品用的容量瓶的体积,单位为毫升(mL);
- D ——稀释倍数;
- m ——试样的质量,单位为克(g);
- 1 000 ——mU 到 U 的单位转换因子。

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实验值在 0.48 mU/mL~0.52 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 mL)时给出 1 位有效数字;当结果大于等于 1 U/g(或 mL)且小于 100 U/g(或 mL)时给出 2 位有效数字;当结果大于等于 100 U/g(或 mL)时给出 3 位有效数字。当结果小于 0.6 U/g(或 mL)时,表示为<0.6 U/g(或 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%。

A.7 转葡萄糖苷酶活力的测定

A.7.1 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-糖苷链,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 键,生成异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等含 α -1,6 键的寡糖的酶。

A.7.2 转葡萄糖苷酶活力

在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、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 μg 的葡

葡萄糖,即为1个酶活力单位,以U/mL或U/g表示。

A.7.3 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。

A.7.4 试剂和材料

A.7.4.1 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。

A.7.4.2 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。

A.7.4.3 0.02 mol/L 乙酸-乙酸钠溶液(pH 5.0):将乙酸溶液(A.7.4.1)20 mL 溶于水,稀释至100 mL(试剂A);将乙酸钠溶液(A.7.4.2)20 mL 溶于水,稀释至100 mL(试剂B);将A和B混合,调pH至5.0。

A.7.4.4 Tris-磷酸缓冲液(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pH至7.2,用水稀释至1 000 mL。

A.7.4.5 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。

A.7.4.6 5% 苯酚溶液:将苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)5 g 于60 °C 溶于50 mL 水,将溶液冷却至室温,用水稀释至100 mL。

A.7.4.7 4-氨基安替比林-苯酚显色剂:在Tris-磷酸缓冲液40 mL 中,加入葡萄糖氧化酶(5 mg 葡萄糖氧化酶“Amano”)550U 和过氧化物酶(0.76 mg,165 U/mg 的过氧化物酶“Amano”)125U,再加入4-氨基安替比林溶液1 mL 和苯酚溶液1.4 mL,用Tris-磷酸缓冲液稀释至50 mL(随配随用)。

A.7.4.8 底物溶液:将 α -甲基葡萄糖($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6$)2.0 g 溶解于水50 mL 中,用水稀释至100 mL(5 °C ~ 15 °C 可稳定两周)。

A.7.5 分析步骤

A.7.5.1 样品溶液的制备

称取1 g 酶样,精确至 ± 0.000 1 g 或吸取酶样1 mL,精确至0.01 mL,加到适当大小的容量瓶中,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。

A.7.5.2 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 \times 150 mm 的试管中,在40 °C \pm 0.5 °C 的恒温水浴箱中保温10 min。加入样品溶液0.5 mL,混匀,于40 °C \pm 0.5 °C 的恒温水浴箱中准确保温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。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 °C \pm 0.5 °C 的恒温水浴箱中,保温20 min,测定500 nm 处的吸光度 A_{60} 。

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 \times 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 °C \pm 0.5 °C 的恒温水浴箱中,保温20 min,测定500 nm 处的吸光度 A_{60} 。

精确称取105 °C 干燥6 h 的葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)1 000 g,溶于100 mL 水中,分别取1 mL,2 mL,3 mL,4 mL,5 mL,用水定容至100 mL(每1 mL 该溶液分别含有100 μg ,200 μg ,300 μg ,400 μg 和

500 μg 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 $^{\circ}\text{C}$ ±0.5 $^{\circ}\text{C}$ 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} , 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} 。

A.7.6 结果计算

转葡萄糖苷酶活力 X_8 ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.8)计算:

$$X_8 = (A_{s60} - A_{s0}) \times G \times \frac{2.5}{0.1} \times \frac{n}{0.5} \quad \dots\dots\dots (A.8)$$

其中, G 按式(A.9)计算:

$$G = \frac{\frac{10}{A_{s10} - A_{s0}} + \frac{20}{A_{s20} - A_{s0}} + \frac{30}{A_{s30} - A_{s0}} + \frac{40}{A_{s40} - A_{s0}} + \frac{50}{A_{s50} - A_{s0}}}{5} \quad \dots\dots (A.9)$$

式中:

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 ——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);

A_{sx} ——各反应液对应的吸光度值;

A_{s0} ——空白对照液液的吸光度值。

平行试验相对误差不得超过 5%。

A.7.7 转葡萄糖苷酶中葡萄糖淀粉酶活力的测定

A.7.7.1 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。

A.7.7.2 试剂和材料

A.7.7.2.1 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。

A.7.7.2.2 25%硫酸溶液:硫酸 125 g 溶于 375 mL 水。

A.7.7.2.3 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。

A.7.7.2.4 1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 4.5):将 1 mol/L 乙酸钠溶液加入到 1 mol/L 乙酸溶液中,调 pH 到 4.5。

A.7.7.2.5 可溶性淀粉溶液(pH 4.5):将可溶性淀粉(试剂级)在 105 $^{\circ}\text{C}$ 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,缓慢加入到沸水 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 mL,用水定容到 100 mL。

A.7.7.2.6 费林试剂:称取硫酸铜 34.66 g 溶解于水中,定容至 500 mL。另称取酒石酸钾钠 173 g 和氢

氧化钠 50 g 溶解于水中,定容至 500 mL。使用前,精确地取等体积的上述两种溶液,充分混合。

A.7.7.3 分析步骤

A.7.7.3.1 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。

A.7.7.3.2 测定

将可溶性淀粉溶液 10 mL 加入到 100 mL 锥形瓶中,置于 $40\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ 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。将锥形瓶直接在煤气喷灯(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,在另一个锥形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。

A.7.7.4 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,转葡萄糖苷酶中葡萄糖淀粉酶活力 X_9 ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.10)计算:

$$X_9 = (T_0 - T_{30}) \times f \times 1.62 \times \frac{1}{10} \times n \quad \dots\dots\dots (A.10)$$

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矫正系数;

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%。

A.8 α -淀粉酶活力测定(米曲霉来源)

A.8.1 α -淀粉酶

可以水解胶凝淀粉、直链淀粉和支链淀粉水溶液内部的 α -1,4 葡萄糖苷键,产生麦芽糖、寡糖和少量葡萄糖的酶。

A.8.2 α -淀粉酶活力

在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下,1 g 或 1 mL 酶样品与底物可溶性淀粉起反应,30 min 生成相当于 10 mg 的葡萄糖,即为 1 个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

A.8.3 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,立即用硫代硫酸钠滴定。

A.8.3.1 试剂和材料

A.8.3.1.1 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。

A.8.3.1.2 25%硫酸溶液:硫酸 125 g 溶于 375 mL 水。

A.8.3.1.3 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。

A.8.3.1.4 1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 5.0):将 1 mol/L 乙酸钠溶液加入到 1 mol/L 乙酸溶液中,调 pH 到 5.0。

A.8.3.1.5 可溶性淀粉溶液(pH 5.0):将可溶性淀粉(试剂级)在 105 °C 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,缓慢加入到沸水 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(pH 5.0)5 mL,用水定容到 100 mL。

A.8.3.1.6 费林试剂

——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。

A.8.3.2 分析步骤

A.8.3.2.1 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~6 mg 葡萄糖量。

A.8.3.2.2 测定

将可溶性淀粉溶液 10 mL 加入到 100 mL 锥形瓶中,置于 40 °C ± 0.5 °C 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。将锥形瓶直接在煤气喷灯(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 和 25%的硫酸溶液 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,在另一个锥形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。

A.8.3.3 结果计算

α -淀粉糖化酶活力 X_{10} ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.11)计算:

$$X_{10} = (T_0 - T_{30}) \times f \times 1.62 \times \frac{1}{10} \times n \quad \dots\dots\dots (A.11)$$

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矫正系数;

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%。

A.9 普鲁兰酶活力的测定

A.9.1.1 普鲁兰酶

能够专一性切开支链淀粉分支点中的 α -1,6-糖苷键,从而剪下整个侧枝,形成直链淀粉的脱支酶。

A.9.1.2 普鲁兰酶活力(比色法)

在给定的反应条件下,1 mL 或 1 g 产品每分钟反应产生相当于 1 μ mol 葡萄糖,即为一个酶活力单位,以 U/mL 或 U/g 表示。

A.9.1.3 原理

普鲁兰酶在一定条件下催化水解普鲁兰多糖生成葡萄糖等还原糖,3,5-二硝基水杨酸与还原糖溶液共热后可生成显棕红色的氨基络合物,在一定范围内颜色深浅与产生的还原糖的量成正比。在 550 nm 的波长下测定反应溶液的吸光度,测定值与样品中普鲁兰酶的活力成正比。

注:样品中其他可水解普鲁兰多糖的糖酶(如葡萄糖淀粉酶)的存在会干扰本方法。加入一定量的阿卡波糖可以抑制样品中葡萄糖淀粉酶的活力,此时方法仍适用。

A.9.1.4 试剂和材料

A.9.1.4.1 乙酸-乙酸钠缓冲液(0.2 mol/L, pH 4.5):准确称取无水乙酸钠 4.92 g 溶于水中,加冰乙酸 4 mL,用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL,配好后用酸度计校正溶液的 pH 至 4.5,用乙酸或乙酸钠进行调节。

注:如样品中含有葡萄糖淀粉酶时,按 0.03% 的浓度在缓冲溶液中加入阿卡波糖。

A.9.1.4.2 0.03% 阿卡波糖溶液:取阿卡波糖 30 mg 到 100 mL 容量瓶中,用去离子水定容。搅拌 15 min 至完全溶解,然后分装,冷冻保存。

注:冷冻下保存 1 年。不应冻融反复使用。

A.9.1.4.3 3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS 试剂):准确称取 3,5-二硝基水杨酸 6.3 g 于盛有 500 mL 蒸馏水的烧杯中,加氢氧化钠 21 g 加热至 50 $^{\circ}$ C 全溶,称取酒石酸钾钠 182 g 放于 300 mL 水中,加热溶解倒入前溶液中,加重蒸苯酚 5 g,加无水亚硫酸钠 5 g,搅拌至溶,冷却后用蒸馏水定容至 1 000 mL,过滤,贮于棕色瓶中放置 7 d 后使用。

A.9.1.4.4 0.5% 的普鲁兰多糖溶液:准确称取普鲁兰多糖(如 Sigma p4516 或等同)0.5 g,用 pH 4.5 的缓冲液溶解定容至 100 mL。溶液冷藏保存可使用 3 d。

A.9.1.4.5 0.1% 葡萄糖标准溶液:称取于 103 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C 下烘干至恒重的无水葡萄糖 0.1 g,精确至 0.1 mg,用水溶解并定容至 100 mL。

A.9.1.5 仪器和设备

A.9.1.5.1 自动移液管。

A.9.1.5.2 酸度计。

A.9.1.5.3 秒表。

A.9.1.5.4 带加热装置的恒温水浴:控温精度 \pm 0.1 $^{\circ}$ C。

A.9.1.5.5 分光光度计。

A.9.1.5.6 恒温水浴。

A.9.1.6 分析步骤

A.9.1.6.1 葡萄糖标准曲线的绘制

葡萄糖标准曲线的绘制按如下操作：

- 分别吸取 0.1% 葡萄糖标准溶液 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, 1.0 mL, 1.2 mL 和 1.4 mL, 分别加入到 7 个刻度试管中, 用蒸馏水补加至 2.0 mL, 配制成每毫升分别含有葡萄糖 100 μg , 200 μg , 300 μg , 400 μg , 500 μg , 600 μg 和 700 μg 的标准溶液；
- 试管中各加入 DNS 试剂 3 mL, 于沸水中沸腾 7 min (沸腾时开始算起), 取出, 迅速冷却到室温, 加入蒸馏水 10 mL, 混匀；
- 用分光光度计在 550 nm 下测量溶液的吸光度, 用空白管溶液调零点, 记录吸光度值, 以吸光度为纵坐标, 以对应的标准葡萄糖浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

注：以 0.5 mL 蒸馏水代替 0.5 mL 标准葡萄糖液作为空白对照。

A.9.1.6.2 样品的制备

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, 用乙酸-乙酸钠缓冲液溶解, 磁力搅拌混匀, 准确稀释定容 (使试样液与空白液的吸光度之差恰好落在 0.3~0.4 范围内), 放置 10 min, 待测。如样品中含有葡糖淀粉酶, 必须使用含有阿卡波糖的缓冲溶液。

A.9.1.6.3 测定

取四支 25 mL 刻度具塞试管 (一支空白管, 三支样品管); 分别向四支管中, 准确加入预热的 1.00 mL 普鲁兰多糖溶液, 将试管置于 $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 10 min; 按一定的时间间隔向三支样品管中分别加入 1.0 mL 稀释好的待测酶液 (空白管不加), 如样品中含有葡糖淀粉酶, 可在试管中再加入 40 μL 的阿卡波糖溶液, 准确计时, 反应 30 min 后依次取出; 立即向各试管中加入 3.0 mL DNS 试剂, 震荡混匀; 在空白管中加入 1.0 mL 待测酶液; 将四支管同时放入沸水浴中, 加热 7 min 后取出, 迅速冷却至室温, 加 10 mL 水, 摇匀; 以空白管中溶液 (对照液) 调仪器零点, 用分光光度计在波长 550 nm 下测量溶液的吸光度, 取平均值; 以吸光度平均值查标准曲线或用线性回归方程求出葡萄糖的含量。

A.9.1.7 酶活力的计算

普鲁兰酶活力 (比色法) X_{11} , 单位为 U/mL 或 U/g, 按式 (A.12) 计算:

$$X_{11} = \frac{(A - b) \times n}{k \times 30 \times 180} \quad \dots\dots\dots (A.12)$$

式中:

A —— 样品在 550 nm 处吸光度的平均值;

b —— 标准曲线的截距;

n —— 稀释倍数;

k —— 标准曲线的斜率;

30 —— 酶反应时间, 单位为分钟 (min);

180 —— 葡萄糖的摩尔质量, 单位为克每摩尔 (g/mol)。

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%。

A.9.1.8 普鲁兰酶活力的测定〔染色普鲁兰(红)法〕

A.9.1.8.1 测定原理

普鲁兰酶在一定条件下催化水解染色红普鲁兰多糖,产生红色降解产物。用乙醇沉淀未降解底物。在 510 nm 下,用分光光度计测定上清液的吸光度,测定值与样品中普鲁兰酶活力成正比。

注:样品中其他可水解红普鲁兰多糖的糖酶(如葡萄糖淀粉酶)的存在会干扰本方法。加入一定量的阿卡波糖可以抑制样品中葡萄糖淀粉酶的活力,此时方法仍适用。

A.9.1.8.2 试剂和材料

A.9.1.8.2.1 缓冲液

根据产品提供的最适 pH 配制相应浓度的缓冲液,4 ℃ 贮藏,溶液稳定 1 个月。

注:如样品中含有葡萄糖淀粉酶时,按 0.03% 的浓度在缓冲溶液中加入阿卡波糖。

A.9.1.8.2.2 2% 红普鲁兰溶液:称取 1.00 g 红普鲁兰底物(Megazyme lot.61201),用缓冲液定容到 50 mL。保证红色普鲁兰溶解完全。4 ℃ 贮藏,溶液稳定 2 周。

A.9.1.8.2.3 标准品和样品制备

A.9.1.8.2.3.1 标准品和标准曲线的制备

精确称取一定量的普鲁兰酶制剂标准品,用相应缓冲液溶解定容,作为标准储备液;用标准储备液配制不同浓度的酶标准液;以标准液酶活力和它们对应的吸光度(减去空白吸光度)作标准曲线,要求线性相关系数不小于 0.998。

注:标准品的确定可以根据产品提供的最适条件,以 A.9.1.2 法测定并计算其酶活力,该酶活力作为标准曲线制备时的酶活力计算依据。

A.9.1.8.2.3.2 样品的制备

称取一定量的样品稀释到缓冲液中。需控制样品稀释液的活力在标准曲线的范围内。需要二个平行样。如样品中含有葡萄糖淀粉酶,应使用含有阿卡波糖的缓冲溶液。

A.9.1.8.3 仪器和设备

A.9.1.8.3.1 自动移液管。

A.9.1.8.3.2 磁力搅拌器。

A.9.1.8.3.3 酸度计。

A.9.1.8.3.4 秒表。

A.9.1.8.3.5 带加热装置的恒温水浴:控温精度 ± 0.1 ℃。

A.9.1.8.3.6 分析天平。

A.9.1.8.3.7 分光光度计。

A.9.1.8.3.8 台式离心机。

A.9.1.8.3.9 一次性离心管。

A.9.1.8.4 测定

酶活力的测定按如下操作:

- a) 准确吸取一定量的样品、标准品溶液分别加入到不同试管中;
- b) 将试管置于一定温度的水浴中,预热 5 min;

- c) 按一定的时间间隔在试管中分别加入定量的红普鲁兰溶液,震荡 3 s;
- d) 准确计时,反应一定时间后依次后向试管中加入足量的 95% 的乙醇终止反应,震荡混匀;
- e) 将试管在室温下放置一定时间后离心分离(4 000 r/min 时约 10 min);
- f) 取上清液用分光光度计在 510 nm 处测定溶液的吸光度,用水调零。

A.9.1.8.5 结果计算

普鲁兰酶活力(染色法) X_{12} ,单位为 U/mL 或 U/g,按式(A.13)计算:

$$X_{12} = \frac{S \times V \times F}{W} \quad \dots\dots\dots (A.13)$$

式中:

- S ——由线性回归计算出的样品稀释液的酶活力;
- V ——溶解样品用的容量瓶体积,单位为毫升(mL);
- F ——稀释因子;
- W ——样品称量。

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%。

附 录 B
吸光度与 α -淀粉酶酶浓度对照表

表 B.1 吸光度与 α -淀粉酶酶浓度对照表

吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)
0.100	4.694	0.138	4.502	0.176	4.319
0.101	4.689	0.139	4.497	0.177	4.315
0.102	4.684	0.140	4.492	0.178	4.310
0.103	4.679	0.141	4.487	0.179	4.306
0.104	4.674	0.142	4.482	0.180	4.301
0.105	4.669	0.143	4.477	0.181	4.297
0.106	4.664	0.144	4.472	0.182	4.292
0.107	4.659	0.145	4.467	0.183	4.288
0.108	4.654	0.146	4.462	0.184	4.283
0.109	4.649	0.147	4.457	0.185	4.279
0.110	4.644	0.148	4.452	0.186	4.275
0.111	4.639	0.149	4.447	0.187	4.270
0.112	4.634	0.150	4.442	0.188	4.266
0.113	4.629	0.151	4.438	0.189	4.261
0.114	4.624	0.152	4.433	0.190	4.257
0.115	4.619	0.153	4.428	0.191	4.253
0.116	4.614	0.154	4.423	0.192	4.248
0.117	4.609	0.155	4.418	0.193	4.244
0.118	4.604	0.156	4.413	0.194	4.240
0.119	4.599	0.157	4.408	0.195	4.235
0.120	4.594	0.158	4.404	0.196	4.231
0.121	4.589	0.159	4.399	0.197	4.227
0.122	4.584	0.160	4.394	0.198	4.222
0.123	4.579	0.161	4.389	0.199	4.218
0.124	4.574	0.162	4.385	0.200	4.214
0.125	4.569	0.163	4.380	0.201	4.210
0.126	4.564	0.164	4.375	0.202	4.205
0.127	4.559	0.165	4.370	0.203	4.201
0.128	4.554	0.166	4.366	0.204	4.197
0.129	4.549	0.167	4.361	0.205	4.193
0.130	4.544	0.168	4.356	0.206	4.189
0.131	4.539	0.169	4.352	0.207	4.185
0.132	4.534	0.170	4.347	0.208	4.181
0.133	4.529	0.171	4.342	0.209	4.176
0.134	4.524	0.172	4.338	0.210	4.172
0.135	4.518	0.173	4.333	0.211	4.168
0.136	4.513	0.174	4.329	0.212	4.164
0.137	4.507	0.175	4.324	0.213	4.160

表 B.1 (续)

吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)
0.214	4.156	0.256	3.998	0.298	3.875
0.215	4.152	0.257	3.995	0.299	3.872
0.216	4.148	0.258	3.991	0.300	3.869
0.217	4.144	0.259	3.988	0.301	3.866
0.218	4.140	0.260	3.984	0.302	3.863
0.219	4.136	0.261	3.981	0.303	3.860
0.220	4.132	0.262	3.978	0.304	3.857
0.221	4.128	0.263	3.974	0.305	3.854
0.222	4.124	0.264	3.971	0.306	3.851
0.223	4.120	0.265	3.968	0.307	3.848
0.224	4.116	0.266	3.964	0.308	3.845
0.225	4.112	0.267	3.961	0.309	3.842
0.226	4.108	0.268	3.958	0.310	3.839
0.227	4.105	0.269	3.954	0.311	3.836
0.228	4.101	0.270	3.951	0.312	3.833
0.229	4.097	0.271	3.948	0.313	3.830
0.230	4.093	0.272	3.944	0.314	3.827
0.231	4.089	0.273	3.941	0.315	3.824
0.232	4.085	0.274	3.938	0.316	3.821
0.233	4.082	0.275	3.935	0.317	3.818
0.234	4.078	0.276	3.932	0.318	3.815
0.235	4.074	0.277	3.928	0.319	3.812
0.236	4.070	0.278	3.925	0.320	3.809
0.237	4.067	0.279	3.922	0.321	3.806
0.238	4.063	0.280	3.919	0.322	3.803
0.239	4.059	0.281	3.916	0.323	3.800
0.240	4.056	0.282	3.913	0.324	3.797
0.241	4.052	0.283	3.922	0.325	3.794
0.242	4.048	0.284	3.919	0.326	3.791
0.243	4.045	0.285	3.915	0.327	3.788
0.244	4.041	0.286	3.912	0.328	3.785
0.245	4.037	0.287	3.909	0.329	3.782
0.246	4.034	0.288	3.906	0.330	3.779
0.247	4.03	0.289	3.903	0.331	3.776
0.248	4.026	0.290	3.900	0.332	3.774
0.249	4.023	0.291	3.897	0.333	3.771
0.250	4.019	0.292	3.894	0.334	3.768
0.251	4.016	0.293	3.891	0.335	3.765
0.252	4.012	0.294	3.888	0.336	3.762
0.253	4.009	0.295	3.885	0.337	3.759
0.254	4.005	0.296	3.881	0.338	3.756
0.255	4.002	0.297	3.878	0.339	3.753

表 B.1 (续)

吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)
0.340	3.750	0.382	3.632	0.424	3.517
0.341	3.747	0.383	3.629	0.425	3.515
0.342	3.744	0.384	3.626	0.426	3.512
0.343	3.741	0.385	3.623	0.427	3.509
0.344	3.739	0.386	3.621	0.428	3.507
0.345	3.736	0.387	3.618	0.429	3.504
0.346	3.733	0.388	3.615	0.430	3.502
0.347	3.730	0.389	3.612	0.431	3.499
0.348	3.727	0.390	3.610	0.432	3.497
0.349	3.724	0.391	3.607	0.433	3.494
0.350	3.721	0.392	3.604	0.434	3.492
0.351	3.718	0.393	3.602	0.435	3.489
0.352	3.716	0.394	3.599	0.436	3.487
0.353	3.713	0.395	3.596	0.437	3.484
0.354	3.710	0.396	3.594	0.438	3.482
0.355	3.707	0.397	3.591	0.439	3.479
0.356	3.704	0.398	3.588	0.440	3.477
0.357	3.701	0.399	3.585	0.441	3.474
0.358	3.699	0.400	3.583	0.442	3.472
0.359	3.696	0.401	3.580	0.443	3.469
0.360	3.693	0.402	3.577	0.444	3.467
0.361	3.690	0.403	3.575	0.445	3.464
0.362	3.687	0.404	3.572	0.446	3.462
0.363	3.684	0.405	3.569	0.447	3.459
0.364	3.682	0.406	3.567	0.448	3.457
0.365	3.679	0.407	3.564	0.449	3.454
0.366	3.676	0.408	3.559	0.450	3.452
0.367	3.673	0.409	3.556	0.451	3.449
0.368	3.670	0.410	3.554	0.452	3.447
0.369	3.668	0.411	3.551	0.453	3.444
0.370	3.665	0.412	3.548	0.454	3.442
0.371	3.662	0.413	3.546	0.455	3.440
0.372	3.659	0.414	3.543	0.456	3.437
0.373	3.656	0.415	3.541	0.457	3.435
0.374	3.654	0.416	3.538	0.458	3.432
0.375	3.651	0.417	3.535	0.459	3.430
0.376	3.648	0.418	3.533	0.460	3.427
0.377	3.645	0.419	3.530	0.461	3.425
0.378	3.643	0.420	3.528	0.462	3.423
0.379	3.640	0.421	3.525	0.463	3.420
0.380	3.637	0.422	3.522	0.464	3.418
0.381	3.634	0.423	3.520	0.465	3.415

表 B.1 (续)

吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)
0.466	3.413	0.508	3.317	0.550	3.229
0.467	3.411	0.509	3.315	0.551	3.227
0.468	3.408	0.510	3.313	0.552	3.225
0.469	3.406	0.511	3.311	0.553	3.223
0.470	3.404	0.512	3.308	0.554	3.221
0.471	3.401	0.513	3.306	0.555	3.219
0.472	3.399	0.514	3.304	0.556	3.217
0.473	3.397	0.515	3.302	0.557	3.215
0.474	3.394	0.516	3.300	0.558	3.213
0.475	3.392	0.517	3.298	0.559	3.211
0.476	3.389	0.518	3.295	0.560	3.209
0.477	3.387	0.519	3.293	0.561	3.207
0.478	3.385	0.520	3.291	0.562	3.205
0.479	3.383	0.521	3.289	0.563	3.204
0.480	3.380	0.522	3.287	0.564	3.202
0.481	3.378	0.523	3.285	0.565	3.200
0.482	3.376	0.524	3.283	0.566	3.198
0.483	3.373	0.525	3.280	0.567	3.196
0.484	3.371	0.526	3.278	0.568	3.194
0.485	3.369	0.527	3.276	0.569	3.192
0.486	3.366	0.528	3.274	0.570	3.190
0.487	3.364	0.529	3.272	0.571	3.188
0.488	3.362	0.530	3.270	0.572	3.186
0.489	3.359	0.531	3.268	0.573	3.184
0.490	3.357	0.532	3.266	0.574	3.183
0.491	3.355	0.533	3.264	0.575	3.181
0.492	3.353	0.534	3.262	0.576	3.179
0.493	3.350	0.535	3.260	0.577	3.177
0.494	3.348	0.536	3.258	0.578	3.175
0.495	3.346	0.537	3.255	0.579	3.173
0.496	3.344	0.538	3.253	0.580	3.171
0.497	3.341	0.539	3.251	0.581	3.169
0.498	3.339	0.540	3.249	0.582	3.168
0.499	3.337	0.541	3.247	0.583	3.166
0.500	3.335	0.542	3.245	0.584	3.164
0.501	3.333	0.543	3.243	0.585	3.162
0.502	3.330	0.544	3.241	0.586	3.160
0.503	3.328	0.545	3.239	0.587	3.158
0.504	3.326	0.546	3.237	0.588	3.157
0.505	3.324	0.547	3.235	0.589	3.155
0.506	3.321	0.548	3.233	0.590	3.153
0.507	3.319	0.549	3.231	0.591	3.151

表 B.1 (续)

吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)
0.592	3.149	0.634	3.078	0.676	3.014
0.593	3.147	0.635	3.076	0.677	3.012
0.594	3.146	0.636	3.074	0.678	3.011
0.595	3.144	0.637	3.073	0.679	3.01
0.596	3.142	0.638	3.071	0.680	3.008
0.597	3.140	0.639	3.070	0.681	3.007
0.598	3.139	0.640	3.068	0.682	3.005
0.599	3.137	0.641	3.066	0.683	3.004
0.600	3.135	0.642	3.065	0.684	3.003
0.601	3.133	0.643	3.063	0.685	3.001
0.602	3.131	0.644	3.062	0.686	3
0.603	3.130	0.645	3.060	0.687	2.998
0.604	3.128	0.646	3.058	0.688	2.997
0.605	3.126	0.647	3.057	0.689	2.996
0.606	3.124	0.648	3.055	0.690	2.994
0.607	3.123	0.649	3.054	0.691	2.993
0.608	3.121	0.650	3.052	0.692	2.992
0.609	3.119	0.651	3.051	0.693	2.99
0.610	3.118	0.652	3.049	0.694	2.989
0.611	3.116	0.653	3.048	0.695	2.988
0.612	3.114	0.654	3.046	0.696	2.986
0.613	3.112	0.655	3.045	0.697	2.985
0.614	3.111	0.656	3.043	0.698	2.984
0.615	3.109	0.657	3.042	0.699	2.982
0.616	3.107	0.658	3.04	0.700	2.981
0.617	3.106	0.659	3.039	0.701	2.98
0.618	3.104	0.660	3.037	0.702	2.978
0.619	3.102	0.661	3.036	0.703	2.977
0.620	3.101	0.662	3.034	0.704	2.976
0.621	3.099	0.663	3.033	0.705	2.975
0.622	3.097	0.664	3.031	0.706	2.973
0.623	3.096	0.665	3.03	0.707	2.972
0.624	3.095	0.666	3.028	0.708	2.971
0.625	3.094	0.667	3.027	0.709	2.969
0.626	3.092	0.668	3.025	0.710	2.968
0.627	3.089	0.669	3.024	0.711	2.967
0.628	3.087	0.670	3.022	0.712	2.966
0.629	3.086	0.671	3.021	0.713	2.964
0.630	3.084	0.672	3.02	0.714	2.963
0.631	3.082	0.673	3.018	0.715	2.962
0.632	3.081	0.674	3.017	0.716	2.961
0.633	3.079	0.675	3.015	0.717	2.959

表 B.1 (续)

吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c)/(U/mL)
0.718	2.958	0.735	2.938	0.752	2.919
0.719	2.957	0.736	2.937	0.753	2.918
0.720	2.956	0.737	2.936	0.754	2.917
0.721	2.955	0.738	2.935	0.755	2.916
0.722	2.953	0.739	2.933	0.756	2.915
0.723	2.952	0.740	2.932	0.757	2.914
0.724	2.951	0.741	2.931	0.758	2.913
0.725	2.95	0.742	2.93	0.759	2.912
0.726	2.949	0.743	2.929	0.760	2.911
0.727	2.947	0.744	2.928	0.761	2.91
0.728	2.946	0.745	2.927	0.762	2.909
0.729	2.945	0.746	2.926	0.763	2.908
0.730	2.944	0.747	2.925	0.764	2.907
0.731	2.943	0.748	2.923	0.765	2.906
0.732	2.941	0.749	2.922	0.766	2.905
0.733	2.94	0.750	2.921		
0.734	2.939	0.751	2.92		