



# 中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—××××

## 工业用酶制剂测定技术导则

Technical guides for industrial enzyme preparations assay

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会(SAC/TC 64)提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分技术委员会(SAC/TC 64/SC 5)归口。

本标准起草单位:中国食品发酵工业研究院、浙江艾杰斯生物科技有限公司、山东隆科特酶制剂有限公司、青岛蔚蓝生物集团有限公司、诺维信(中国)投资有限公司。

本标准主要起草人:张蔚、田亚琼、刘明、滕智津、武竹英、李聪、翟文景、张世童、潘宏涛、郭庆文、陈亮珍。

# 工业用酶制剂测定技术导则

## 1 范围

本标准规定了工业用酶制剂的术语和定义、理化指标分类、酶活力测定导则及酶活力测定方法的实施与评价等要求。

本标准适用于工业用酶制剂产品关键测定指标测定方法的建立、实施及评价的指导。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

QB/T 1803 工业酶制剂通用试验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### **酶制剂 enzyme preparation**

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,具有特殊催化功能的生物制品。

注:商品化的工业用酶制剂产品允许加入易于产品贮存、使用的配料成分。

### 3.2

#### **酶活力 enzyme activity**

酶在一定条件下催化某一特定反应的能力。

## 4 工业用酶制剂理化指标分类

4.1 工业用酶制剂测定关键性指标:酶活力。

4.2 工业用酶制剂测定通用性指标如下:

- a) 容重;
- b) 细度;
- c) pH。

4.3 其他指标。

## 5 工业用酶制剂酶活力测定方法建立指导

### 5.1 酶活力测定反应条件关键因素的选择确立指导

#### 5.1.1 底物的选择

底物的选择方法如下:

- 应对可用的底物做筛选；
- 专一性不强的酶,可作用于多种底物时,在多种底物中,选择米氏常数  $K_m$  最小的底物；
- 专一性较强的酶,选择该酶的专一性催化底物；
- 根据检测仪器和实际检测条件,选择便于检测的底物或产物；
- 选择合适的底物浓度(一般控制在米氏常数  $K_m$  的 20 倍~100 倍,在实际工作考虑到底物溶解度的限制,价格因素,可将底物浓度降为  $K_m$  的 10 倍)。

#### 示例 1:

蛋白酶:以酪蛋白作为底物。酪蛋白是哺乳类动物乳汁的主要成分,以大分子蛋白作为底物,可以准确反映蛋白酶的催化性能和活力。

#### 示例 2:

脂肪酶:以甘油三丁酸酯作为底物,基于酸碱滴定的原理建立检测方法。虽然脂肪酶种类繁多,但由于该类酶多属于非专一性催化,以甘油三丁酸酯作为底物能反映绝大多数脂肪酶的活性。

#### 示例 3:

纤维素酶:以羟甲基纤维素(CMC)作为底物,检测还原糖产物在一定时间内的增量;或者用黏度法,以一定时间内反应体系中黏度的降低反映底物的降解程度,从而获得纤维素酶的活力。此外,还可以测定酶的滤纸酶活力,即以特定的纤维素滤纸为底物,测定纤维素酶对滤纸的降解能力。

#### 示例 4:

$\alpha$ -淀粉酶:选择淀粉作为底物,用碘试剂检测淀粉被降解的程度反映淀粉酶的活力;或者采用亚乙基-G7-PNP 作为底物, $\alpha$ -淀粉酶与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶共同作用将该底物水解释放黄色的 *p*-硝基苯酚,利用全自动生化分析仪进行检测。

### 5.1.2 温度的选择

温度的选择方法如下:

- 建立方法时,需要提前确定酶的最适反应温度；
- 根据酶的种类,预估其最适反应温度,在估计值附近选择一个范围( $\pm 10^\circ\text{C}$ ),测定酶在此温度区间酶活力的变化,从而确定该酶在某种反应体系中的最适温度；

注 1: 从温血动物组织中提取的酶最适温度一般在  $35^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$  之间;植物酶的最适温度一般在  $40^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$  之间;大多数酶在  $60^\circ\text{C}$  以上会发生变性并逐渐失去活力。

- 在条件允许的情况下,应尽量选择在酶最适温度或附近温度下反应,还要依据实际条件调整反应温度,并通过其他反应条件的优化最终得到可行的检测方法；

注 2: 有些检测设备或原理对于温度有一定限制,可以通过延长反应时间、增加底物或酶的浓度等途径得到改善和解决。

- 有时,为了更好体现酶制剂在实际应用条件下的酶活力,需以实际应用时的温度条件作为反应温度。

### 5.1.3 pH 的选择

pH 是酶活力测定的一个重要参数,选择方法如下:

- 酶的最适 pH 需通过实验的方法测得,因底物的种类和浓度、温度、反应时间、缓冲液的种类和浓度等不同而不同；

- 同一类酶的反应最适 pH 相近,酶制剂新产品可以参照现有的同类酶的反应最适 pH,经过反应条件的筛选最终确定最适反应 pH；

- 在选择最适 pH 时要保证酶的稳定性,把酶的反应 pH 曲线和酶的稳定 pH 曲线结合起来,选择底物和缓冲溶液体系以达到最适的反应 pH。

### 5.1.4 缓冲溶液的选择

缓冲溶液的选择方法如下:

——缓冲溶液的选择要充分考虑缓冲液的缓冲条件；

注 1: 缓冲溶液的作用不仅是维持酶反应的最适 pH,其中含有的大量离子可以通过影响酶的构型或影响底物的解离程度从而影响酶活性,因此,选择合适的缓冲体系及离子强度对于酶反应非常重要。

——缓冲溶液应具有足够的缓冲能力(缓冲液的电离平衡常数  $pK_a$  与最适 pH 越接近,缓冲容量越大)；

注 2: 酸和盐浓度相等时,缓冲液的缓冲效率为最高,比例相差越大,缓冲效率越低。

——随缓冲液浓度增加,电解质干扰酶和底物结合,酶活性将逐步下降,选择缓冲液浓度时,需在浓度较高以保持足够缓冲能力和浓度较低以免抑制酶活性两个作用之间取得平衡；

——对于解离受温度影响较大的缓冲物质(如 Tris、三乙醇胺),配制、使用此类缓冲溶液时还应注意配制时的温度；

——缓冲溶液的选择要考虑离子强度的影响。在选择离子强度时,除了要保证反应体系的 pH 恒定外,也应考虑它可能对反应体系及酶本身带来的影响；

——当缓冲溶液的 pH、离子强度和缓冲离子选定后,该缓冲系统不应轻易变动。

### 5.1.5 反应时间的选择

反应时间的选择方法如下：

——当反应测定的是最终产物的生成量时,不同酶活力大小的酶制剂在相同条件及反应时间固定的情况下,反应产物的生成量与酶制剂的活力成正比。反应时间可以通过在确定其他反应条件的基础上,不断调节酶促反应时间和适宜测定的反应时间来获得；

注 1: 从效率的角度考虑,时间越短越有效,但要同时考虑反应的稳定程度及结果的可靠性。

——当反应测定的是产物生成的速率时,随着酶浓度的变化,酶与底物的反应速率成正比。要求酶制剂与底物的反应速率有足够的灵敏度,且动态变化的过程可通过一般的测量手段检测。确定反应时间时,需要注意测定出的产物量以及动态斜率两个参数,即在确保反应速率正常的情况下,注意产物的量在仪器测量最佳范围内。

注 2: 反应时间同样可以在反应底物、温度等其他条件确定的情况下通过实验测得,最初选取较长的反应时间范围,得到反应时间-产物浓度速率图,在初速度时间范围内可以结合仪器等的测量的要求来选择适合的范围。

### 5.1.6 其他条件因素的选择

#### 5.1.6.1 激活剂

激活剂的选择方法如下：

——作为酶的辅助因子,金属离子可以作为酶分子中的组成部分；

——作为酶的激活剂,如:  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  和  $Co^{2+}$  等常见的酶的激活剂；

注 1: 金属离子对不同的酶的作用具有一定的选择性,一些金属离子可能对某种酶具有激活作用,同时对另一种酶起抑制作用。

注 2: 不同的金属离子之间还有拮抗现象,如  $Na^+$  抑制  $K^+$  的激活作用, $Mg^{2+}$  能够激活的酶又常被  $Ca^{2+}$  所抑制。

注 3: 金属离子的浓度对激活作用也有影响,随着浓度升高,它的作用可以从激活转化为抑制,如对于  $NADP^+$  合成酶, $Mg^{2+}$  在  $5 \times 10^{-3}$  mol/L ~  $10 \times 10^{-3}$  mol/L 时,具有激活作用,但当浓度上升至  $30 \times 10^{-3}$  mol/L 时,酶活性下降。

——增加酶的稳定性,如枯草芽孢杆菌淀粉酶在  $Ca^{2+}$  存在时对碱性环境的稳定性大为增加；

——强化酶的专一性,如羧肽酶 A 可以水解合成底物苯甲酰甘氨酸丙氨酸(BGP)和乳酸马尿酸苯酯(HPLA),如果将羧肽酶 A 中的  $Zn^{2+}$  除去,再与其他金属离子重新结合,其对于 BGP 和 HPLA 的相对活性会发生很大改变；

——激活剂可以分为无机离子、有机化合物和蛋白质三类。

### 5.1.6.2 抑制剂

- 不可逆抑制剂。能够以牢固的共价键和酶蛋白中的基团结合或能够专一的和活性部位的有关基团反应,发生不可逆的化学反应,酶失活后不能用透析、超滤等物理方法恢复活性。
- 可逆抑制剂(竞争性抑制剂和非竞争性抑制剂)。与酶非共价结合,因而是可逆的。抑制后可以用透析法除去抑制剂从而恢复酶的活性。

## 5.2 酶活力测定条件标准化关键因素指导

### 5.2.1 待测酶浓度的选择

5.2.1.1 酶浓度的选择应保证相对于底物浓度的充分饱和,酶活性测定就是要使酶促反应的初速度达到最大速度,此时反应速度与酶浓度之间有线性关系。在相对于底物浓度充分饱和的酶浓度范围内才能得到准确反应酶活的测定方法。

5.2.1.2 应做酶浓度选择试验,考虑产物浓度以保证测定的准确性。对于某一确定的底物浓度应选择相对于该底物浓度充分饱和的酶浓度范围来进行标准曲线绘制。通过测定反应时单位体积中底物的减少量或产物的增加量可以得到酶促反应速度。一般选择测定产物的增加量,因为酶促反应中,底物往往是过量的,不容易准确测得它的减少量;产物的生成量只要方法足够灵敏,容易准确测得。保证测量的准确性需要考察酶促反应的产物所产生的信号是否在相应测量仪器的检测范围以内。

### 5.2.2 标准曲线的制作及浓度选择

5.2.2.1 标准曲线的制作应保证足够的相关性系数;通常要求曲线拟合所得的相关性系数平方( $R^2$ )应大于 0.98。

注:某些反应中基质背景影响难以扣除,标准曲线的拟合不需要经过零点。

5.2.2.2 标准曲线制作标准溶液浓度的选择要与酶反应相匹配。标准溶液浓度值应尽量等距离地分布在检测范围内,并至少有 5 个浓度。如果采用非直线拟合,则建议设置至少 7 个浓度;标准曲线的浓度范围应覆盖正常操作条件下所需检测的样品浓度。标准曲线的线性范围应至少大于或等于 2.5。为获得更准确的结果,尽量将测试样品的浓度落在标准曲线的浓度范围中间。若采用酶促反应的产物(或产物类似物)作为标准样品,则更需结合酶的反应速率选择最佳的曲线浓度范围,获得可靠的结果以及较好的灵敏度。避免高浓度或低浓度的酶样品因为反应速率过快或过慢超出曲线范围,或不能与标准曲线呈良好的线性关系。

## 5.3 酶活力测定方法相对准确校正因素的选择和确立

### 5.3.1 标准底物的筛选与确定

#### 5.3.1.1 纯度要求

需要选择纯度高的化学品和批次;需确保足够的储备量(可以购买到足够量的试剂,以便分装后在一段时期使用的试剂作为标准底物)。

#### 5.3.1.2 标准底物来源

尽量选择商品试剂,将质量稳定且可以长期订购到的试剂作为标准底物;选择使用的批次底物有可替代批次的底物。

#### 5.3.1.3 准确度

通过选定的两个批次的底物的结果比较确定。实验中每个样品称重两个平行样品;样品类型要有

代表性；至少应引入两名实验人员；得到至少 24 个样品的结果。

#### 5.3.1.4 线性关系

如果方法中涉及标准曲线，对于线性范围内的不同浓度点进行考查。实验中每个样品称重两个平行样品；将样品稀释至标准曲线范围内的不同的浓度上，将其他浓度点得到的结果与中点值进行比对，确认回收率。

#### 5.3.1.5 灵敏度

如果方法中涉及标准曲线，需要对标准曲线的斜率、截距、试剂或样品空白等进行比对和评估。

#### 5.3.1.6 接受标准

不同批次对照的准确度在 0.95~1.05 置信区间范围内，两个批次表明底物之间没有明显的差异。

### 5.3.2 对照酶的筛选与确定

#### 5.3.2.1 对照酶特点

5.3.2.1.1 质量：生产过程正常，能代表正常工艺流程。

5.3.2.1.2 稳定性：稳定的液体、固体成品，酶浓缩液。

5.3.2.1.3 均一性：液体酶标准品要澄清透明，没有沉淀，物理稳定性好，可加入一定比例的防腐剂避免标准品菌落总数超标；固体产品需保证较小的粒径分布范围。

5.3.2.1.4 贮存量：对照酶要有足够的量以确保在一定的使用时间。

5.3.2.1.5 专属性：成品酶配方中的化学品应不影响方法的使用和酶活力的测定。

#### 5.3.2.2 对照酶需考虑的检验项目

5.3.2.2.1 酶含量的检验：即每克对照酶制剂所含的酶活力单位。测量的次数不少 25 天，每天至少两个称重。

5.3.2.2.2 交叉污染检测：确保对照酶制剂没有被其他酶尤其是蛋白酶所污染进而影响酶活性检测结果或降低对照酶的稳定性。可用灵敏度较高的分析方法，如采用酶联免疫吸附测定(ELISA)对潜在的污染酶进行检测，控制在 50 000 ng/g 以内。

5.3.2.2.3 总活菌计数(TVC)检测：一般控制细菌数小于  $10^4$ /mL。

5.3.2.2.4 均一性检测：随机选择分装好的标准品中的 10 瓶~12 瓶送到相关实验室，从每瓶样品中取两个平行称量进行检测，对得到结果进行均一性评估以确认接受或放弃。

5.3.2.2.5 其他：如采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对目标酶蛋白进行定性实验；重金属的检测，以排除重金属离子如铅离子抑制酶活性；水分检测，保证固体对照酶制剂足够干燥。

#### 5.3.2.3 对照酶的贮藏

将对照酶分装在小玻璃瓶或冷冻管中密封保存；取少量作为长期贮藏标准品保存在温度  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；一般标准品储存温度为  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；基于酶的性质，固体和液体成品标准品推荐保质期 10 年~20 年；未进行防腐处理或稳定性不确定的浓缩液标准品，推荐保质期 2 年；已开瓶或使用过程中的标准品可以存放在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中，固体和液体成品标准品开启后在此条件下可使用和存放 30 天，浓缩液标准品开启后在此条件下可使用和存放 5 天。

注：基于 5.1~5.3 中所述要求建立的具体酶的测定方法可参照附录 A~附录 D 给出的方法。

### 5.4 工业用酶制剂通用指标测定方法

#### 5.4.1 容重测定方法

按 QB/T 1803 执行。

## 5.4.2 细度测定方法

按 QB/T 1803 执行。

## 5.4.3 pH 测定方法

按 QB/T 1803 执行。

## 5.5 其他指标

按相应方法检测。

# 6 工业用酶活力测定方法的实施与评价指导

## 6.1 酶活力测定方法的准确性评价

6.1.1 如果有可选择的对照酶样品,可以通过该方法测定对照酶样品的回收率进行评价,即通过对照酶的测量值与标准值计算得出方法的准确度。

6.1.2 如果方法建立基于参照实验室,可以通过本实验室结果与参照实验室间结果之间的比值定义准确度,即对于相同样品在本实验室和参照实验室并在同一时期进行分析,将分析结果进行比对得出方法的准确度。

6.1.3 对于已有标准方法(基准方法)存在的情况,可以将新方法对于标准方法的回收率定义为方法的准确度,通过进行相同样品在新方法和标准方法下的分析,对比两个方法下结果的差异。

6.1.4 在有标准物质存在的情况下,方法的准确度需要在 95%~105%之间。

6.1.5 参照实验室对比得到的方法准确度也需要在 95%~105%这个范围内,方可接受。

6.1.6 对于有标准方法对比的情况,例如建立一个和标准方法原理不同的方法,准确度在一些情况下会超出±5%的范围,因为对于方法间比较的决定因素较多,而且通常比较复杂,例如反应条件(温度、pH)、底物、仪器等会造成方法的灵敏度、响应度不同,进而决定了准确度的差异。但如果该准确度在方法应用的条件下针对所有样品类型都相对恒定,该准确度可被认可。

6.1.7 对于准确度的评定,需要进行多次测量以确保引起方法波动的变量被充分考虑在内,如:样品数量、平行测定的次数和天数、试剂和溶液的配制、引入的仪器数量、操作者等。

## 6.2 酶活力测定标准方法可接受允许差水平

### 6.2.1 酶活力测定方法的精密度

对于同一实验条件下平行样品的测定,通常以相对误差 2%作为通用原则。但对于酶活力测定方法的精密度而言,该重复性贡献是很小的。根据反应原理,操作的复杂程度,样品的复杂程度,绝对法或相对法的区别,方法的中间精密度以相对标准偏差计,绝大多数控制在 4%~10%之间。这一相对标准偏差没有考虑实验室之间差异,仅反映同一方法在一个实验室运行的状况。

### 6.2.2 酶活力测定方法的不确定度

6.2.2.1 酶活力的结果建议引入方法的重复性进行表示;或者对同一样品在不同天进行多次测定来确认最终结果。

6.2.2.2 方法的不确定度可以在评价方法的准确度的同时进行考量,即选择一定数量的具有代表性的样品,选择不同的试剂配制溶液,在不同天通过不同的仪器和操作者进行分析测定,通过实验结果获得的相对标准差,进而计算出单次测量的标准差。

## 6.3 酶活力指标与工业用酶制剂产品应用评价

6.3.1 若将酶活力的检验方法及其结果作为反映产品应用性能的唯一控制方法和指标,则通过该分析方法得到的酶活力应能够代表该酶产品在实际应用中的性能的表现,即酶活力指标和应用性能之间应该存在正相关性。如果酶的应用领域和条件不是单一的,酶活力指标至少需要反映酶在其典型应用条件下的应用性能。

6.3.2 由于酶活力测定的方法是基于分析仪器的分析原理进行建立,考虑到分析方法中存在的一些限制以及方法通量,酶制剂实际应用的所有条件往往不能全部复制于酶活力测定的分析方法中,例如反应底物的选择,反应温度和 pH 的设定。因此,存在酶活力与实际使用不完全体现正相关性的现象,实际应用时应结合酶活力指标匹配实际应用效果实验。

6.3.3 基于产品质量问题或纯度问题导致酶活力结果和应用评价不匹配,同时没有其他的酶活力方法或测定原理可供选择,那么可以通过建立杂质的分离及分析方法对杂质的含量进行检定和控制,进而间接保证酶活力对其应用性能的代表性。

## 附录 A

(资料性附录)

## 普鲁兰酶活力测定方法

## A.1 DNS 法

## A.1.1 方法原理

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 540 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: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  $\mu$ mol 葡萄糖,即为一个酶活力单位,以 u/mL 或 u/g 表示。

## A.1.2 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—2008 中规定的二级水。

## A.1.2.1 乙酸-乙酸钠缓冲液(0.2 mol/L, pH 4.5)

准确称取无水乙酸钠 8.16 g(或者 13.54 g 三水醋酸钠)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  $4.50 \pm 0.01$ ,用乙酸或乙酸钠进行调节。

## A.1.2.2 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 置于 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 1 天后使用,有效期 6 天。

## A.1.2.3 1.5%的普鲁兰多糖溶液

准确称取普鲁兰多糖(Sigma p4516 或同等分析效果)( $1.500 0 \pm 0.001 0$ )g,用 pH 4.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液溶解定容至 100 mL。现配现用。

## A.1.2.4 0.6%葡萄糖标准溶液

称取于( $103 \pm 2$ ) $^{\circ}$ C 下烘干至恒重的无水葡萄糖( $0.600 0 \pm 0.000 6$ )g,用水溶解并定容至 100 mL,搅拌至完全溶解。

## A.1.3 仪器和设备

A.1.3.1 分析天平:精确至 0.000 2 g。

A.1.3.2 移液器。

A.1.3.3 磁力搅拌器。

A.1.3.4 酸度计。

A.1.3.5 秒表。

A.1.3.6 恒温水浴:控温精度  $\pm 0.1$   $^{\circ}$ C。

A.1.3.7 分光光度计。

## A.1.3.8 沸水浴。

## A.1.4 分析步骤

## A.1.4.1 葡萄糖标准曲线的绘制

葡萄糖标准曲线绘制步骤如下：

——葡萄糖标准溶液按照表 A.1 配置，稀释后立即进行测定。

表 A.1

管号	葡萄糖标准溶液的浓度/(mg/mL)	稀释倍数	0.6%葡萄糖标准溶液的体积/ $\mu$ L	取水的体积/ $\mu$ L	总体积/ $\mu$ L
0	0	0	0	1 500	1 500
1	0.10	60	25	1 475	1 500
2	0.12	50	30	1 470	1 500
3	0.20	30	50	1 450	1 500
4	0.30	20	75	1 425	1 500
5	0.40	15	100	1 400	1 500

——分别取试管加入 2 mL 上述稀释后的标准溶液，各加入 DNS 试剂 3.0 mL，于沸水中沸腾 7 min（样品放入重新沸腾时算起），取出，迅速冰水浴冷却到室温，加入蒸馏水 10 mL，混匀；

——用分光光度计在 540 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。

## A.1.4.2 样品的制备

准确称取酶样品 1 g~2 g 精确至 0.000 2 g，或者吸取液体酶样 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标准 2 点~4 点之间），待测。

## A.1.4.3 测定

测定步骤如下：

a) 先将适量底物普鲁兰多糖溶液放入  $(60 \pm 0.1)^\circ\text{C}$  恒温水浴中，预热 2 min；

b) 按下列程序操作：

试管 A(空白)

↓

加酶液 1.00 mL

↓

加 DNS 溶液 3.00 mL(摇匀)

↓

加普鲁兰多糖溶液 1.00 mL(摇匀)

↓

同时放入沸水浴加热 7 min

↓

试管 B(酶试样,需作 3 个平行样)

↓

加酶液 1.00 mL

↓

加普鲁兰多糖溶液 1.00 mL(摇匀)

↓  $(60 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ , 30 min

加 DNS 溶液 3.00 mL(摇匀)

↓

同时放入沸水浴加热 7 min

↓

取出冷却至室温



加入 10 mL 水(摇匀)



于 540 nm 波长测其吸光度

取出冷却至室温



加入 10 mL 水(摇匀)



于 540 nm 波长测其吸光度(以空白试管调零)

### A.1.5 结果计算

酶活力  $X$  按式(A.1)计算:

$$X = \frac{(A - b) \times n}{k \times 30 \times 180} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- $X$  ——酶活力,单位为 u/mL(g);
- $A$  ——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(min);
- 180 ——葡萄糖的分子量。

### A.1.6 允许差

同一试样两次测试结果的绝对差值,不得超过算术平均值的 10%,变异系数不超过 12%。

## A.2 染色红普鲁兰法

### A.2.1 方法原理

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。

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(Acarbose)可以抑制样品中葡萄糖淀粉酶的活力,此时方法仍适用。

### A.2.2 试剂和材料

#### A.2.2.1 缓冲液

按生产厂商的指导配制。

#### A.2.2.2 阿卡波糖溶液

取阿卡波糖 100 mg 到 150 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。不许冻融反复使用。

#### A.2.2.3 2%红普鲁兰溶液

称取(1.00±0.000 5) g 红普鲁兰底物(Megazyme lot.61201 或同等分析效果),用缓冲液定容到 50 mL,使红色普鲁兰完全溶解。

### A.2.3 仪器和设备

- A.2.3.1 移液器。  
 A.2.3.2 磁力搅拌器。  
 A.2.3.3 酸度计。  
 A.2.3.4 秒表。  
 A.2.3.5 带加热装置的恒温水浴:控温精度±0.1℃。  
 A.2.3.6 分析天平。  
 A.2.3.7 分光光度计。  
 A.2.3.8 台式离心机。  
 A.2.3.9 一次性离心管。

### A.2.4 分析步骤

#### A.2.4.1 标准品和标准曲线的制备

精确称取一定量的标准品,按照生产厂商的指导配制标准曲线。

#### A.2.4.2 样品的制备

称取一定量的样品稀释到缓冲液中。需保证样品稀释液的活力在标准曲线的范围内。

#### A.2.4.3 测定

酶活力测定的总体步骤如下。相关的技术细节需与生产厂商确定。

- 取一定量的样品、标准品溶液到试管中;
- 如样品中含有葡糖淀粉酶,可在试管中加入定量的阿卡波糖溶液;
- 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;
- 将试管置于一定温度的水浴中,准确计时,反应一定时间后依次取出;
- 反应后向试管中加入足量的无水乙醇终止反应,震荡混匀;
- 将试管在室温下放置一定时间,然后在  $3\ 200\times g$  下离心;
- 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.2.4.4 标准曲线制作

以标准品溶液酶活力为  $X$  轴,其对应的吸光度(减去空白吸光度)为  $Y$  轴绘制标准曲线。标准曲线的相关系数 $\geq 0.998$ 。

### A.2.5 结果计算

酶活力  $X$  按式(A.2)计算:

$$X = \frac{S \times V \times F}{m} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

- $X$  ——酶活力,单位为 u/mL 或 u/g;
- $S$  ——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;
- $m$  ——样品称量,单位为毫升或克(mL 或 g)。

## 附录 B

(资料性附录)

 $\beta$ -半乳糖苷酶(中性)活力测定方法

## B.1 方法原理

本方法是用来测定中性  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,酶样品与底物-ONPG(邻硝基苯  $\beta$ -D-半乳吡喃糖苷)混合保温, $\beta$ -半乳糖苷酶能水解 ONPG 得到邻硝基苯酚,邻硝基苯酚在碱性环境中显黄色,测定反应液的吸光值,测定值与样品中乳糖酶活性成正比。

注:在给定的反应条件下,单位时间释放  $1 \mu\text{mol}$  邻硝基苯酚的酶量。

## B.1.1 试剂和溶液

除特殊说明外,所用的试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682—2008 中规定的二级水。

## B.1.1.1 硫酸镁溶液

准确称量 24.65 g 七水合硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )并转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水定容,搅拌至溶解。

## B.1.1.2 EDTA 溶液

准确称量 1.86 g 二水合 EDTA 二钠( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )并转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水定容,搅拌至溶解。

## B.1.1.3 P-E-M 缓冲液

准确称量 8.8 g 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )和 8.0 g 三水合磷酸氢二钾( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )并转移至 1 000 mL 容量瓶中,加入约 900 mL 水,再加入 10.0 mL 硫酸镁溶液和 10.0 mL EDTA 溶液,加水定容,搅拌至溶解。pH 应在  $6.50 \pm 0.05$ 。

## B.1.1.4 ONPG 底物溶液

称量 250.0 mg ONPG 并转移至 100 mL 容量瓶中,加 P-E-M 缓冲液定容,搅拌至溶解。使用前两小时内配置完毕。

## B.1.1.5 碳酸钠溶液

称量 50.0 g 碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )和 37.2 g 二水合 EDTA 二钠( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )并转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水定容,搅拌至溶解。

## B.1.2 仪器和设备

B.1.2.1 分析天平:精确至 0.000 2 g。

B.1.2.2 磁力搅拌器。

B.1.2.3 酸度计。

B.1.2.4 秒表。

B.1.2.5 恒温水浴:控温精度  $\pm 0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$ 。

B.1.2.6 分光光度计。

B.1.2.7 移液器。

### B.1.3 分析步骤

#### B.1.3.1 标准溶液的制备

称量 139.0 mg 邻硝基苯酚并转移至 1 000 mL 容量瓶中,加入 10 mL 96%乙醇溶解完全溶解,加水定容,搅拌至溶解。将配置好的溶液分别吸取 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL、12 mL 和 14 mL 分别转移到 100 mL 容量瓶中,各加入 25 mL 碳酸钠溶液,然后用 P-E-M 缓冲液定容,搅拌至完全溶解。这一标准溶液系列所含有的邻硝基苯酚的浓度分别为 0.02  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.04  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.06  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.08  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.10  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.12  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.14  $\mu\text{mol/mL}$ 。以水为参比,在 420 nm 下测量各个浓度溶液的吸光值,并计算摩尔消光系数(最终范围应在  $4.60 \pm 0.05$  之内)。

#### B.1.3.2 摩尔消光系数的计算

摩尔消光系数  $f$  按式(B.1)计算:

$$f = \frac{\sum_{i=1}^7 (A_i/B_i)}{7} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

$f$  ——摩尔消光系数;

$A_i$  ——标准溶液各个浓度点的吸光值;

$B_i$  ——标准溶液各个点的浓度,单位为微摩尔每毫升( $\mu\text{mol/mL}$ );

7 ——标准溶液系列数。

#### B.1.3.3 样品的制备

准确称量至少 1 g  $\beta$ -半乳糖苷酶样品并转移至容量瓶中,加入 P-E-M 缓冲液,定容,搅拌至溶解。吸取上述溶液 1 mL,放到 10 mL 的试管中,每个样品取两个平行样,并分别做样品空白。

#### B.1.3.4 测定

将 ONPG 底物溶液预热至少 10 min,将准备好的样品试管放到  $(30.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  的水浴中保温,时间为 5 min~15 min。将所有的试管按照一定的顺序在相同的间隔时间快速加入 5 mL ONPG 底物溶液,震荡,混合均匀,在  $(30.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$  的水浴中反应 10 min,然后再以相同的顺序和时间间隔加入 2 mL 碳酸钠溶液,震荡,混合均匀,置于室温下。反应终止后 30 min 内在 420 nm 条件下读取吸光值。样品空白同法处理,只是按照相反顺序加入 ONPG 底物溶液和碳酸钠溶液。

### B.1.4 结果计算

酶活力  $X$  按式(B.2)计算:

$$X = \frac{A \times 8 \times n}{f \times 10 \times m} \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

$X$  ——酶活力,单位为 u/g;

$A$  ——样品溶液与空白溶液吸光值之差;

8 ——酶活力反应总体积,单位为毫升(mL);

$n$  ——样品稀释倍数;

$f$  ——摩尔消光系数；

10 ——酶活力反应时间,单位为分(min)；

$m$  ——样品质量,单位为克(g)。

### B.1.5 允许差

同一实验结果以平行测定的算术平均值为准。平行测定结果的变异系数不应超过 8%。

## 附录 C

(资料性附录)

## 过氧化氢酶活力测定方法

## C.1 硫代硫酸钠滴定法

## C.1.1 方法原理

过氧化氢酶是催化过氧化氢分解成氧和水的酶,存在于细胞的过氧化物体内。在稀硫酸中氧化碘化钾产生定量的碘,用硫代硫酸钠滴定,可测出过氧化氢酶的总量,从而计算出过氧化氢酶的活力。

## C.1.2 试剂与溶液

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。

## C.1.2.1 100 g/L 碘化钾溶液

称取 10 g 碘化钾溶于 80 mL 水中,搅拌至完全溶解,用水定容至 100 mL。

## C.1.2.2 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液(pH 7.0)

准确称取 2.33 g 无水磷酸二氢钠、9.7 g 十二水合磷酸氢二钠用去离子水溶解后定容至 1 000 mL,用 pH 计校准至 7.0,即成磷酸盐缓冲液。

## C.1.2.3 1 mol/L 硫酸溶液

将 30 mL 浓硫酸溶于 800 mL 水,再用水稀释至 1 000 mL。

## C.1.2.4 10 g/L 淀粉指示剂

在约 30 mL 沸水中加入 1 g 溶于少量水的可溶性淀粉,加热沸腾 2 min~3 min 后,定容至 100 mL,24 h 内使用。

## C.1.2.5 0.01 mol/L 硫代硫酸钠溶液

将无水硫代硫酸钠 24.9 g 和无水碳酸钠 0.2 g 溶于水并定容至 1 L,煮沸 10 min 静置 10 天后标定,得 0.1 mol/L 硫代硫酸钠溶液,稀释 10 倍即得 0.01 mol/L 的硫代硫酸钠溶液,棕色试剂瓶保存。

## C.1.2.6 底物溶液

用缓冲溶液将市售的 30%过氧化氢稀释 400 倍,现配现用。

## C.1.2.7 1%钼酸铵溶液

称取 1 g 钼酸铵,溶于 80 mL 水中,搅拌至完全溶解,用水定容至 100 mL。

## C.1.3 仪器与设备

C.1.3.1 分析天平:精确至 0.000 2 g。

C.1.3.2 pH 计:精确至 0.01。

C.1.3.3 恒温水浴锅：温度控制范围在 $(30 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 之间。

C.1.3.4 秒表：每小时误差不超过 5 s。

C.1.3.5 磁力搅拌器。

C.1.3.6 碱式滴定管。

## C.1.4 分析步骤

### C.1.4.1 固体酶液的制备

称取试样两份，精确至 0.000 2 g，加入 80 mL 缓冲溶液溶解，磁力搅拌 30 min，定容至 100 mL，取上清液，再用缓冲溶液做二次稀释（稀释后的待测酶液中过氧化氢酶活力应控制在 8 u/mL~12 u/mL）。

### C.1.4.2 液体酶液的制备

液体试样可以直接用缓冲溶液稀释、定容（稀释后的酶液中过氧化氢酶活力应控制在 8 u/mL~12 u/mL）。

### C.1.4.3 测定

在 100 mL 的三角瓶中加入 5.0 mL 底物溶液，置于 30 °C 水浴锅保温平衡 5 min，加入 1.0 mL 稀释好的待测酶液，立即计时，摇匀，反应 5 min。加入 2.0 mL 硫酸溶液，摇匀，终止反应。再加入 1.0 mL 碘化钾溶液，1 滴钼酸铵溶液和 2 滴~3 滴淀粉指示剂，用硫代硫酸钠溶液滴定游离碘，所消耗体积毫升数为  $V_1$ 。

另做空白对照，在 100 mL 的三角瓶中加入 5.0 mL 底物溶液，置于 30 °C 水浴锅保温平衡 5 min，加入 2.0 mL 硫酸溶液，立即计时，摇匀，反应 5 min，加入 1.0 mL 稀释好的待测酶液，再加入 1.0 mL 碘化钾溶液、1 滴钼酸铵溶液和 2 滴~3 滴淀粉指示剂，用硫代硫酸钠溶液滴定游离碘，所消耗体积毫升数为  $V_2$ ， $V_2$  约为 22 mL。

## C.1.5 结果计算

$$X = \frac{(V_2 - V_1) \times \frac{0.01}{2} \times 1\,000 \times N}{5} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

$X$  ——过氧化氢酶酶活力，单位为 u/mL 或 u/g；

$V_2$  ——空白消耗标准硫代硫酸钠的体积，单位为毫升(mL)；

$V_1$  ——样品消耗标准硫代硫酸钠的体积，单位为毫升(mL)；

0.01 ——硫代硫酸钠溶液的浓度，单位为摩尔每毫升(mol/mL)；

$N$  ——稀释倍数；

2 ——2 mmol 硫代硫酸钠相当于 1 mmol 的双氧水；

1 000——转化因子，1 mmol=1 000 mmol；

5 ——酶解反应时间，单位为分(min)。

所得结果保留至整数。

## C.1.6 允许差

实验结果以平行测定结果的算术平均值为准。平行测定结果的绝对差值不得超过 8%。

## C.2 紫外分光光度法

### C.2.1 方法原理

过氧化氢在 240 nm 波长下有强烈吸收,过氧化氢酶能分解过氧化氢,使反应溶液的吸光度( $A_{240}$ )随反应时间增加而降低。根据测量 240 nm 处吸光度在一定范围内的变化速度即可计算出过氧化氢酶的活力。

### C.2.2 试剂和溶液

除非特殊说明,所用的试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682—2008 中规定的二级水。

#### C.2.2.1 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液(pH 7.0)

准确称取 2.33 g 无水磷酸二氢钠、9.7 g 十二水合磷酸氢二钠,用水溶解后定容至 1 000 mL。用 pH 计校准至 7.0。

#### C.2.2.2 底物溶液

吸取 30%过氧化氢 100  $\mu$ L,用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液稀释至 100 mL。用 1 cm 的石英比色皿,于吸收波长 240 nm 处测得该溶液的吸收值  $A$  在 0.520~0.550 之间,即成底物溶液(如溶液吸收值不在此范围,可加少量 30%过氧化氢或磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液进行调节),置于 25  $^{\circ}$ C 环境下恒温保存,在 2 h 内使用。

### C.2.3 仪器和设备

C.2.3.1 分析天平:精确至 0.000 2 g。

C.2.3.2 紫外可见分光光度计。

C.2.3.3 恒温水浴锅:温度控制范围在(25 $\pm$ 0.2) $^{\circ}$ C 之间。

C.2.3.4 秒表:误差不超过 5 s/h。

### C.2.4 分析步骤

#### C.2.4.1 酶溶液的制备

称取试样两份,每份约 1.0 g,置于容量瓶中。加入磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液定容。磁力搅拌 30 min。取上清液。用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液做二次稀释,每个称量做 3 个平行稀释样。稀释后的酶溶液置于 25  $^{\circ}$ C 环境中保温,时间不超过 30 min。

#### C.2.4.2 测定

空白:准确移取 2.9 mL 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液至 1 cm 石英比色皿中,移取 100  $\mu$ L 待测稀释样品,加入上述石英比色皿中,摇匀后在吸收波长 240 nm 处调零。

样品:准确移取 2.9 mL 底物溶液至 1 cm 石英比色皿中,移取 100  $\mu$ L 待测稀释样品,加入上述石英比色皿中,摇匀后在吸收波长 240 nm 处测量吸光度  $A$  值。待  $A$  值降至 0.450 时开始计时, $A$  值降为 0.400 时结束计时,记录时间  $t$ (s), $t$  值应控制在 16 s~24 s 之间。如  $t$  值超出规定范围,需调整二次稀释倍数,重新稀释样品并检测。分别求得每个称量对应的 3 个平行稀释样品的平均反应时间。

### C.2.5 结果计算

每个称量样品的过氧化氢酶活力按式(C.2)计算:

$$X = \frac{3.45 \times D \times V}{0.1 \times \frac{t}{60} \times m} \dots\dots\dots (C.2)$$

式中：

$X$  ——样品的酶活力,单位为 u/g;

3.45 ——在吸收波长 240 nm 处 3 mL 标准底物溶液  $A$  值从 0.450 降至 0.400 消耗的过氧化氢量,单位为微摩尔( $\mu\text{mol}$ );

$D$  ——样品的二次稀释倍数;

$V$  ——样品溶解的容量瓶体积,单位为毫升(mL);

0.1 ——反应时加入的稀释样品体积,单位为毫升(mL);

$t/60$  ——平均反应时间,单位为分(min);

$m$  ——样品质量,单位为克(g)。

所得结果表示至整数。

### C.3 允许差

实验结果以平行测定的算术平均值为准。平行测定结果的变异系数不应超过 8%。

## 附录 D

(资料性附录)

## 溶菌酶活力测定方法

## D.1 一般规定

本标准除另有规定外,所用试剂的纯度应在分析纯以上,所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品,应按 GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603 的规定制备,实验用水应符合 GB/T 6682—2008 中三级水的规定。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

## D.2 酶活力的测定

## D.2.1 方法原理

溶菌酶可水解细菌的细胞壁,造成藤黄微球菌的溶解而引起溶液吸光度值的降低。

一个溶菌酶活力单位定义为 25 °C、pH 6.2 条件下,使用藤黄微球菌悬浊液在 450 nm 处每分钟引起吸光度变化 0.001 所需溶菌酶的量。

## D.2.2 试剂和材料

D.2.2.1 藤黄微球菌:ATCC 4698 或 CICC10680。

D.2.2.2 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH 6.2。

称取 10.40 g 磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),于 500 mL 无菌水中,稀释定容至 1 000 mL;溶解 9.465 g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )用无菌水稀释定容至 1 000 mL。将 815 mL 磷酸二氢钠溶液与 185 mL 磷酸氢二钠溶液混合,调整缓冲溶液 pH 至  $6.2 \pm 0.1$ 。

注:用小份缓冲溶液检查 pH,以避免缓冲溶液被污染。如果需要,通过加入更多的磷酸二氢钠溶液或磷酸氢二钠溶液调整 pH。

D.2.2.3 溶菌酶标准品:相同来源的溶菌酶。

D.2.2.4 底物溶液:用磷酸盐缓冲液菌制备 50 mL 藤黄微球菌悬浊液。使用前,底物于 37 °C 培养 30 min。该底物溶液室温下可稳定 2 h。以磷酸盐缓冲液调分光光度计零点,然后测定底物溶液的吸光度,450 nm 下读数应为  $0.70 \pm 0.1$ 。

## D.2.3 仪器和设备

D.2.3.1 分光光度计:精度  $\pm 0.001$ 。

D.2.3.2 pH 计。

注:所用的器皿应保持无菌,保证工作环境的清洁。

## D.2.4 分析步骤

## D.2.4.1 试样溶液的制备

准确称取( $100 \pm 0.1$ )mg 试样,置于 50 mL 容量瓶中,用约 25 mL 磷酸钠缓冲溶液搅拌溶解并稀释定容,充分混匀。再转移 1 mL 上述试样制备溶液至 100 mL 容量瓶中,用磷酸钠缓冲溶液搅拌溶解并稀释定容。

#### D.2.4.2 标准溶液的制备

精确称取 50 mg 蛋清溶菌酶标准品于 50 mL 容量瓶中,用约 25 mL 磷酸钠缓冲溶液搅拌溶解并稀释定容,充分混匀(如果需要,冷冻该溶液以备后续测定)。转移 3 mL 上述标准制备溶液至 100 mL 容量瓶中,用磷酸钠缓冲溶液搅拌溶解并稀释定容。

#### D.2.4.3 测定

取 3 份标准溶液和 3 份试样溶液进行测定。25 °C 室温下,将 1 cm 比色皿放入分光光度计,调整吸光度零点。吸 2.9 mL 底物溶液于比色皿,最初 450 nm 处吸光度应为  $0.70 \pm 0.1$ ,3 min 之内初始吸光度值变化应小于或等于 0.003 时,方可开始测定。吸 0.1 mL 标准溶液加入底物溶液,充分混合。记录 3 min 吸光度值的变化,每 15 s 记录一次吸光值。每分钟吸光度值变化应在 0.03~0.08 之间,若不在要求范围需调整试样溶液的浓度。重复操作测定试样溶液。反应 1 min 后稳定,计算时忽略最初 1 min 的读数。

#### D.2.4.4 结果计算

酶活力  $X$  按式(D.1)计算:

$$X = \frac{(A_1 - A_2)}{2 \times W \times 0.001} \dots\dots\dots (D.1)$$

式中:

- $X$  ——样品的酶活力,单位为 u/g;
- $A_1$  ——试样在 450 nm 处反应 1 min 时的吸光度;
- $A_2$  ——试样在 450 nm 处反应 3 min 时的吸光度;
- 2 ——获得 1 min 和 3 min 吸光度读数所用的时间,单位为分(min);
- $W$  ——用于分析的试样制备溶液中的溶菌酶质量,单位为克(g);
- 0.001——由单位溶菌酶每分钟引起的吸光度降低的值。

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 10%。