中华人民共和国国家标准

GB 1886.174—××××

食品安全国家标准
食品添加剂　食品工业用酶制剂

（征求意见稿）

食品安全国家标准公开征求意见

××××-××-××发布　　××××-××-××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”和“固定化酶制剂”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。

食品安全国家标准公开征求意见

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

为酶制剂的进一步加工、贮存、溶解等工艺目的而使用的食品原料和食品添加剂。

2.5 固定化酶制剂

通过载体利用物理和（或）化学的方法，使酶制剂在食品生产过程中以不可溶解状态发挥作用的产品形态。

食品安全国家标准公开征求意见

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必须符合肉类检疫要求。

4.1.3　用于提取酶制剂的植物组织不得霉变。

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 GB2760 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　商品化的酶制剂为产品活性保存、流通贮存、标准化使用，允许加入必要的酶制剂用辅料成分。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有关规定。

4.2 理化指标

产品酶活力应符合声称。

注：本标准附录B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。

4.3 污染物限量

污染物限量符合表 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。

表 2 微生物限量

项　　目	限　　量	检验方法
菌落总数/（CFU/g 或 CFU/mL）　≤	50000	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 CFU/g（固体剂型） ＜1 CFU/ml（液体剂型）	GB 4789.38
沙门氏菌/（25g 或 25mL）	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。

4.5 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。

食品安全国家标准公开征求意见

附　录　A

酶制剂用辅料名单

A.1　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
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

食品安全国家标准公开征求意见

表 A.1 酶制剂用辅料名单（续）

序号	名称	CNS 号	INS 号
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	抗坏血酸纳	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
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	1520
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	黄原胶（又名汉生胶）	20.009	415
76	纤维素	—	—
77	氧化镁（包括重质和轻质）	—	—
78	乙醇	—	—

食品安全国家标准公开征求意见

表 A.1 酶制剂用辅料名单（续）

序号	名称	CNS 号	INS 号
79	明胶	20.002	—
80	海藻酸钠(又名褐藻酸钠)	20.004	401
81	羧甲基纤维素钠	20.003	466
82	聚葡萄糖	20.022	1200
83	瓜尔胶	20.025	412
84	磷酸酯双淀粉	20.034	1412
85	氯化钾	00.008	508
86	硫酸镁	00.021	518
87	L-半胱氨酸盐酸盐	13.003	920
88	硬脂酸（又名十八烷酸）	14.009	570
89	聚乙二醇	14.012	1521
90	肌醇	—	—
91	乙酸锌	—	—
92	L-半胱氨酸	—	—
93	硫酸铵	—	—
94	硫酸钠	—	—
95	硫酸锰	—	—
96	氯化铵	—	—
97	醋酸钙（乙酸钙）	—	—
注：合适的各种食品原料可作为酶制剂用辅料，不在本表列出。			

食品安全国家标准公开征求意见

附　录　B

酶活力测定参考方法

B. 1　部分酶制剂酶活力测定方法的参考标准见表B.1。

表B. 1　部分酶活力测定方法的参考标准

序号	种类	参考方法
1	α-淀粉酶	GB/T 24401
2	α-乙酰乳酸脱羧酶	附录 B 中 B.2
3	β-葡聚糖酶	QB/T 4481
4	菠萝蛋白酶	GB/T 23527
5	蛋白酶(包括乳凝块酶)	GB/T 23527
6	果胶酶	附录 B 中 B.3 或 QB/T 4482
7	过氧化氢酶	GB/T 35538
8	木瓜蛋白酶	GB/T 23527
9	木聚糖酶	QB/T 4483
10	葡糖淀粉酶(淀粉葡糖苷酶)	附录 B 中 B.4
11	普鲁兰酶	GB/T 35538
12	乳糖酶(β-半乳糖苷酶)	GB/T 35538
13	无花果蛋白酶 Ficin	GB/T 23527
14	纤维素酶 Cellulase	QB/T 2583
15	蔗糖 1-果糖转移酶（又名果糖基转移酶）	QB/T 5357
16	脂肪酶	GB/T 23535
17	转葡糖苷酶	附录 B 中 B.5
18	溶菌酶	GB 1886.257

食品安全国家标准公开征求意见

B. 2　α-乙酰乳酸脱羧酶酶活力的测定

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℃、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 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*-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

B. 2. 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5000 mL容量瓶中，用水定容，搅拌均匀。该溶液在常温（15℃～20℃）下的保存期为一周。

B. 2. 3. 3. 2　*α*-乙酰乳酸底物（2.00mL/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到6.00±0.05。然后，再用缓冲液定容。该溶液使用前配制。

B. 2. 3. 3. 3　萘酚（10.0g/L）/肌酸（1.0g/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1mol/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。对眼和粘膜有刺激性。吞咽或经皮肤吸收都能引起中毒。

B. 2. 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℃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0.0001 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℃～6℃）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。

B. 2. 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0.0001 g。

[1] Brij® 35 是适合的市售产品。也可用同等分析效果的产品。。

食品安全国家标准公开征求意见

B. 2. 3. 4. 2　酸度计：精度为0.01pH单位。

B. 2. 3. 4. 3　恒温水浴锅：30℃±0.1℃。

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　漩涡震荡器。

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　μL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，用漩涡震荡器充分混合均匀。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试料，精确至0.0005 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℃水浴中预热约10 min，然后吸取酶样品溶液 200.0 μL于30℃±0.1℃水浴中的 10 mL 试管里，然后加入底物 200.0 μL，用漩涡震荡器充分混匀，迅速放回到水浴中，并开始计时。反应20.0 min后，依次向试管中加入显色剂4.60 mL，用漩涡震荡器充分混匀。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/mL或 U/g，按式（B.1）计算：

$$X_1 = \frac{(H_1 - H_2) \times 0.0011351 \times F_1}{m \times h} \quad \text{（B.1）}$$

式中：

H_1——样品的吸光度；

H_2——空白的吸光度；

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；

食品安全国家标准公开征求意见

0.0011351 ——0.1 g的乙偶姻所对应的摩尔数。

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%。

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它含醇产品中α－乙酰乳酸脱羧酶酶活力的测定。

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。

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.2.3.3.1。

B. 2. 4. 3. 2　α－乙酰乳酸底物（2.00 mL/L）:见B.2.3.3.2。

B. 2. 4. 3. 3　萘酚（10.0 g/L）/肌酸（1.0 g/L）显色剂:见B.2.3.3.3。

B. 2. 4. 4　仪器和设备

B. 2. 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℃±0.2℃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。

B. 2. 4. 4. 2　分析天平：精度为0.0001 g。

B. 2. 4. 4. 3　酸度计：精度为0.01 pH。

B. 2. 4. 5　分析步骤

B. 2. 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0.0005 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。

食品安全国家标准公开征求意见

然后，按照表B.3配制标准曲线：

表 B.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] 用缓冲液做标准点 1。				

标准储备液和标准曲线应每日配制。

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℃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0.0001 g，用缓冲液B.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一周。

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。

B. 2. 4. 5. 3　样品溶液的制备

从样品中称取一定量的试料，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27.5mU/mL～62.5mU/mL范围内。移取2.0 mL稀释后的样品溶液至样品管中，置于全自动生化分析仪中待测。

B. 2. 4. 5. 4　酶活力自动分析参考条件

B. 2. 4. 5. 4. 1　底物保温周期

——温度：30℃；

——时间：480 s；

——底物：40 μL；

——水：20 μL。

B. 2. 4. 5. 4. 2　酶反应周期

——温度：30℃；

——时间：650 s；

——样品稀释液：40 μL；

——水：20 μL。

B. 2. 4. 5. 4. 3　显色反应周期

——温度：30℃；

——时间：240 s；

——显色试剂：80 μL；

——水：15 μL。

B. 2. 4. 5. 4. 4　测定周期

——测定模式：动力学法；

——波长：510 nm；

食品安全国家标准公开征求意见

——曲线类型：非线性；

——时间：145 s；

——读数：9 次；

——间隔：18 s。

B. 2. 4. 6　结果计算

B. 2. 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。

B. 2. 4. 6. 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/mL或U/g，按式（B.2）计算：

$$X_2 = \frac{A_1 \times F_2 \times D}{W \times 1000} \quad \text{（B.2）}$$

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——试料的质量，单位为克（g）；

1000——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，样品的实验结果有效，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0.6U/g（或mL）时，表示为＜0.6U/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%。

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，1g固体酶粉（或1mL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。

食品安全国家标准公开征求意见

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1.0000 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100mL，冰箱储存备用。使用时间不超过3天。

注：果胶底物对实验的影响大。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。

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　2mol/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　0.1mol/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1000 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0.0001 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。

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

食品安全国家标准公开征求意见

果胶酶制剂的酶活力X_3，单位为U/mL或U/g，按式（B.3）计算：

$$X_3 = \frac{(A_2-B_1)\times C_1\times 0.51\times 194.14\times n_1\times 10}{5\times 1\times 0.5} \quad \text{（B.3）}$$

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浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

n_1——稀释倍数；

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）；

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（淀粉葡糖苷酶）活力的测定

B.4.1 葡糖淀粉酶（淀粉葡糖苷酶）

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（淀粉葡糖苷酶）活力

1.0 mL酶液或1.0 g酶粉在40℃、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。

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($CH_3COONa\cdot 3H_2O$) 6.7 g，吸取冰乙酸2.6 mL，用水溶解并定容至1000 mL。上述缓冲溶液的pH，应使用酸度计加以校正。

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(比重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。

B.4.3.6 200 g/L氢氧化钠溶液：称取氢氧化钠20g，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。

食品安全国家标准公开征求意见

B.4.4 仪器和设备

B.4.4.1 分析天平：精度0.2 mg。

B.4.4.2 酸度计：精度0.01。

B.4.4.3 分析天平：精度0.2 mg。

B.4.4.4 恒温水浴：40℃±0.5℃。

B.4.4.5 移液器 。

B.4.4.6 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50 mL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。

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)。

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，摇匀。于40℃±0.5℃的恒温水浴中预热5 min～10 min。在第一只管中加入待测酶液2.0 mL，立即记时，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，摇匀，同时将两管取出，迅速用水冷却，并于第二只管中补加待测酶液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

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

$$X_4 = \frac{(A_3-B_2)\times C_2\times 90.05\times 32.2\times n_2\times 2}{5}\times\frac{1}{2} \quad \text{（B.4）}$$

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）；

n_2——稀释倍数；

90.05——与1.00mL 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)；

食品安全国家标准公开征求意见

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；

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%。

B.5 转葡糖苷酶活力的测定

B.5.1 转葡糖苷酶

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 转葡糖苷酶活力

在40℃、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的葡萄糖，即为1个酶活力单位，以 U/mL或U/g表示。

B.5.3 原理

转葡糖苷酶作用于底物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（$CH_3COOHNa$）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（pH5.0）：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pH至5.0。

B.5.4.4 Tris-磷酸缓冲液（pH 7.2）：将Tris（羟甲基）氨基甲烷[$H_2NC(CH_2OH)_3$]36.3 g和二水磷酸二氢钠（NAH_2PO_4•$2H_2O$）50.0 g溶于900 mL水，用2mol/L盐酸溶液调pH至7.2，用水稀释至1000 mL。

B.5.4.5 0.4% 4-氨基安替比林溶液：将4-氨基安替比林（$C_{11}H_{13}ON_3$）200 mg溶于水，稀释至50 mL。

B.5.4.6 5%苯酚溶液：将苯酚（C_6H_5OH）5 g于60℃溶于50 mL水，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）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（现配现用）。

B.5.4.8 底物溶液：将α-甲基葡萄糖（$C_7H_{14}O_6$）2.0 g溶解于水50 mL中，用水稀释至100 mL（现配现用）。

食品安全国家标准公开征求意见

B.5.5 分析步骤

B.5.5.1 样品溶液的制备

称取1g酶样，精确至±0.0001g或吸取酶样1 mL，精确至0.01 mL，加到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0.5mL的A_{60}～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×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，5.0 mL ，用水定容至100 mL（每1mL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℃±0.5℃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}。

B.5.6 结果计算

转葡糖苷酶活力X_5，单位为U/mL或U/g，按式（B.5）计算：

$$X_5 = （A_{60} - A_0） \times G \times \frac{2.5}{0.1} \times \frac{n_3}{0.5} \quad \text{……（B.5）}$$

其中，G按式（B.6）计算：

$$G = \frac{\frac{10}{A_{S10} - A_{s0}} + \frac{20}{A_{S20} - A_{s0}} + \frac{30}{A_{S30} - A_{s0}} + \frac{40}{A_{S40} - A_{s0}} + \frac{50}{A_{S50} - A_{s0}}}{5} \quad \text{……（B.6）}$$

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）；

n_3——酶样品的稀释倍数；

As_x——各反应液对应的吸光度值；

As_0——各反应液对应的吸光度值；

2.5——反应体系的总容量，单位为毫升（mL）；

食品安全国家标准公开征求意见

0.1——反应体系的取样量，单位为毫升（mL）；

0.5——反应体系中酶样品的添加量，单位为毫升（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5%。

B.5.7 转葡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500mL用煮沸过的冷却水稀释，所得溶液的总体积为1000 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乙酸钠溶液加入到1 mol/L乙酸溶液中，调pH到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5.0 mL，用水定容到100 mL。

B.5.7.2.6 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。

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}）×f×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加入到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

在上述实验条件下，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个葡糖淀粉酶活力单位。

食品安全国家标准公开征求意见

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

$$X_6 = (T_0 - T_{30}) \times f \times 1.62 \times \frac{1}{10} \times n \quad \text{（B.7）}$$

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——0.05mol/L硫代硫酸钠标准溶液浓度的矫正系数；

n——样品的稀释倍数；

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）。

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%。

食品安全国家标准公开征求意见