

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T XXXX—XXXX

褐藻胶裂解酶制剂

alginate lyase preparations

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件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/TC64）归口。

本文件主要起草单位：暂略。

本文件主要起草人：暂略。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——本次为首次发布。

褐藻胶裂解酶制剂

1 范围

本文件规定了褐藻胶裂解酶制剂的感官、理化和安全等要求，描述了相应的试验方法，规定了检验规则、标志、包装、运输和贮存的内容，并给出了便于技术规定的产品分类。

本文件适用于经微生物发酵制得的褐藻胶裂解酶制剂的生产、检验和销售。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB 1886.243 食品安全国家标准 食品添加剂 海藻酸钠(又名褐藻酸钠)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

QB/T 1803 工业酶制剂通用试验方法

QB/T 1804 工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

褐藻胶 alginate

由 β -D-甘露糖醛酸(β -D-mannuronic acid, M)和 α -L-古罗糖醛酸(α -L-guluronic acid, G)两种糖单元通过1,4糖苷键聚合而成的线性大分子多糖，主要存在于海带、马尾藻、巨藻等褐藻的细胞壁中。

褐藻胶裂解酶 alginate lyase

能够通过 β -消除反应催化断裂褐藻胶的1,4糖苷键，生成在非还原端含有C4,5不饱和双键糖醛酸产物的酶。

3.2

褐藻胶裂解酶制剂 alginate lyase preparations

以提取、纯化的褐藻胶裂解酶为主要催化活性组分，通过制剂等工艺制得的产品。

注：制剂工艺中可加入有助于产品贮存、稳定和使用的配料。

3.3

褐藻胶裂解酶活力单位 alginate lyase activity unit

在40℃、pH值7.0条件下，每分钟裂解褐藻酸钠产生1 μ mol还原糖的酶量，以“U”表示。

3.4

褐藻胶裂解酶活力 alginate lyase activity

褐藻胶裂解酶制剂的酶活力 activity of alginate lyase preparations

1g(或1mL)褐藻胶裂解酶或褐藻胶裂解酶制剂含有的酶活力单位，以U/g(或U/mL)表示。

4 产品分类

按产品形态分为固体剂型和液体剂型。

5 要求

5.1 感官要求

应符合表1的规定。

表 1 感官要求

项目	固体剂型	液体剂型
色泽	色泽均一，淡黄色至深褐色	淡黄色至深褐色液体
状态	粉末或颗粒状、无结块、无霉变、无潮解	液体，可有少量絮状物
气味	本品特有的发酵气味，无异味	

5.2 理化指标

应符合表2的规定。

表 2 理化指标

项 目	固 态 剂 型	液 体 剂 型
鉴别	通过试验	
褐藻胶裂解酶制剂的酶活力 ^a [U/g(或 U/mL)]	≥	1000
pH	—	4.0~9.0
干燥失重/%	≤	10.0
细度，网孔尺寸 0.40 mm 试验筛的通过率 ^b /%	≥	80
a 如有特殊要求，可按供需双方合同规定的酶活力规格执行。		
b 不适用于颗粒产品。		

5.3 安全要求

符合相关要求的规定。

6 试验方法

6.1 感官

取适量试样置于洁净的白色盘（磁盘或同类容器）中，在自然光状态下，观察其色泽、状态，闻其气味。

6.2 鉴别

按附录B规定的方法进行测定。

6.3 酶活力

按附录A规定的方法进行测定。

6.4 干燥失重、pH、细度

按照QB/T 1803中规定的相应试验方法进行测定。

6.5 安全要求

符合相关要求的规定，按照相关规定的方法进行测定。

7 检验规则

7.1 组批

以同一次投料生产、同一规格、同一品种的均一质量的产品为一批。

7.2 取样规则和样本量

7.2.1 取样应均匀分布在整个灌装过程中，或均匀分布于灌装后的成品中。

7.2.2 取样时应采用适宜的方法保证取样具有代表性，保证取样部位和取样瓶的清洁。对用于微生物检验的取样，应使用无菌操作。

7.2.3 成品抽样的样本量见表 2。取样的样本量可以按照估计的批量参照表 2 执行，或由生产企业和（或）相关方确定。批取样量应不小于 300g（或 300mL），不足按照比例适当加取。

表 3 成品抽样的样本量

批量/桶或箱	样本量/桶或袋
≤50	2
51~500	3
>500	4

注：批量是指批中所包含的单位商品数，单位为桶或箱。样本量是指样本中所包含的样本单位数，单位为桶或袋。

7.3 出厂检验

7.3.1 产品出厂前，应由生产厂的质检部门负责按本文件规定逐批进行检验。检验符合本文件后方可出厂。

7.3.2 固体剂型的检验项目为感官、酶活力、干燥失重、细度；液体剂型的检验项目为感官、酶活力、pH。

7.4 型式检验

检验项目为本标准要求中规定的全部项目。一般情况下，型式检验半年进行一次。有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- a) 原辅材料有较大变化时；
- b) 更改关键工艺或设备时；
- c) 新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月后，重新恢复生产时；
- d) 出厂检验与上次型式检验结果有较大差异时；
- e) 国家市场监督管理总局按有关规定需要抽检时。

7.5 判定规则

7.5.1 检验项目全部符合本文件规定时，判定该批产品合格。

7.5.2 感官要求、理化指标不超过 2 项不合格，重新在该批产品中加倍取样复验，以复验结果为准。超过两项指标不符合本标准规定时，判为不合格，不得复验。

7.5.3 安全要求有 1 项不合格时，该批产品为不合格，不得复验。

8 标志、包装、运输、贮存

按照 QB/T 1804 中的规定执行。

附录 A
(规范性)
褐藻胶裂解酶活力的测定

A.1 原理

褐藻胶裂解酶能将褐藻酸钠降解成低聚糖和单糖。具有还原性末端的低聚糖和有还原基团的单糖在沸水浴条件下可以与3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂发生显色反应。反应液540 nm处吸光值与酶解产生的还原糖量成正比,而还原糖的生成量又与反应液中褐藻胶裂解酶的活力成正比。因此,通过分光比色测定反应液540 nm处的吸光值,可以计算褐藻胶裂解酶的酶活力。

A.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中规定的三级水。

A.2.1 盐酸溶液(1 mol/L)

量取8.3 mL浓盐酸,溶于适量水中,冷却后定容至100 mL。

A.2.2 氢氧化钠溶液(1 mol/L)

称取4.0 g氢氧化钠,溶于适量水中,冷却后定容至100 mL,聚乙烯瓶中储存备用。

A.2.3 磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH7.0, 含0.1 mol/L NaCl)

称取二水合磷酸二氢钠2.65 g,十二水合磷酸氢二钠11.83 g,氯化钠5.85 g于1000 mL烧杯中,加入约800 mL去离子水溶解,使用盐酸溶液(A.2.1)或氢氧化钠溶液(A.2.2)调节pH至 7.0 ± 0.05 ,用去离子水定容至1000 mL。

A.2.4 氢氧化钠溶液(200 g/L)

称取20.0 g氢氧化钠,溶于适量水中,冷却后定容至100 mL。

A.2.5 褐藻酸钠溶液(3 g/L)

取100 mL烧杯,加入约80 mL磷酸缓冲液(A.2.3)。准确称取0.300 g褐藻酸钠,磁力搅拌条件下均匀加入到烧杯中,搅拌至溶解,使用盐酸溶液(A.2.1)或氢氧化钠溶液(A.2.2)调节pH至 7.0 ± 0.05 ,用磷酸缓冲液(A.2.3)定容至100 mL,配制当天使用。

注:使用化学纯或以上级别的褐藻酸钠,10 g/L褐藻酸钠溶液的黏度范围20~1000 mPa·s,上述3 g/L褐藻酸钠溶液的还原糖浓度小于1.0 mg/mL。黏度测定方法可依据标准GB 1886.243步骤A.3。

A.2.6 葡萄糖标准储备溶液(5 mg/mL)

准确称取0.500 g经105℃烘干至恒重的无水葡萄糖,使用磷酸缓冲液(A.2.3)溶解,定容至100 mL。

A.2.7 葡萄糖系列标准溶液

分别吸取0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0和7.0 mL葡萄糖标准储备溶液(A.2.6)至10 mL容量瓶中,磷酸缓冲液(A.2.6)定容。葡萄糖标准储备溶液中葡萄糖的浓度为0 mg/mL~3.50 mg/mL。

A.2.8 DNS试剂

称取3.15 g 3,5-二硝基水杨酸,加入500 mL蒸馏水,搅拌3 s~5 s,45℃水浴。然后缓慢加入100 mL氢氧化钠溶液(A.2.4),同时不断搅拌,直到全部溶解(注意:在加入氢氧化钠溶液过程中,溶液温度不超过48℃)。再缓慢加入91.0 g四水酒石酸钾钠、2.50 g苯酚和2.50 g无水亚硫酸钠。期间不断搅拌,直到完全溶解。停止加热并冷却至室温后,蒸馏水定容至1000 mL。用烧结玻璃过滤器过滤。取滤液,储存在棕色瓶中,避光保存。室温下存放7天后使用,有效期为180天。

警告：处理酸碱和配制DNS试剂时，应在通风橱或通风良好的房间进行，佩戴护目镜和乳胶手套，一旦皮肤或眼睛接触了上述物质，及时用大量的水冲洗。

注：也可使用商品化的DNS试剂。

A.3 仪器与设备

- A.3.1 分析天平：感量0.1 mg。
- A.3.2 pH计：分辨率0.01。
- A.3.3 磁力搅拌器。
- A.3.4 电磁振荡器。
- A.3.5 恒温水浴锅：±0.5℃。
- A.3.6 秒表：每小时误差不超过5 s。
- A.3.7 紫外可见光分光光度计：使用10 mm 比色皿。
- A.3.8 移液器：200 μL、1000 μL和5000 μL。
- A.3.9 低速离心机。

A.4 标准曲线的绘制

吸取200 μL葡萄糖系列标准溶液（A.2.7）于试管中后，加入1.8 mL水和2.5 mL DNS试剂（A.2.8），混匀后沸水浴5 min。然后用自来水冷却到室温，水定容至10.0 mL。以0 mg/mL标准溶液管为标准空白，以标准空白调零，540 nm处测定其它标准溶液管吸光值。以葡萄糖浓度（0.5~3.5 mg/mL）为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线。

A.5 待测酶液的制备

固体样品：称取1.0 g样品（精确至0.0001 g），使用磷酸缓冲液（A.2.3）定容至50 mL，磁力搅拌溶解30 min，取溶解后酶液4000 rpm离心10 min，取上清液，再用磷酸缓冲液（A.2.3）进行二次稀释，酶活力应控制在0.5 U/mL~1.1 U/mL之间。

液体样品：量取1.0 mL样品，用磷酸缓冲液（A.2.3）定容至50 mL，再用磷酸缓冲液（A.2.3）进行二次稀释，酶活力应控制在0.5 U/mL~1.1 U/mL之间。

A.6 测定步骤

按表A.1程序操作：

表 A.1 操作程序

空白	试样
取3支150 mm×18 mm玻璃试管，分别标记0、1、2号，0号试管为空白管，1号、2号为试样管	
加入1.8 mL褐藻酸钠溶液（A.2.5），40℃水浴预热5 min	
/	加入200 μL待测酶液（A.5），混匀
40℃准确反应10 min	
加入2.5 mL DNS试剂（A.2.8）	
加入200 μL待测酶液（A.5），混匀	/
沸水浴加热5 min后，冷却至室温，加水定容至10.0 mL并混匀	
以标准空白调零，540nm处测定空白管和试样管的吸光值，并带入标准曲线计算还原糖浓度。	
注：沸水浴使用大功率设备，确保试管放入后持续沸腾。	

A.7 结果计算

试样的褐藻胶裂解酶活力按公式（A.1）计算。

$$X = \frac{C_s - C_0}{t \times M \times m} \times V \times N \times 1000 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

X——酶活力，单位为 U/mL 或 U/g；

C_s ——通过标准曲线计算获得 1 号试管和 2 号试管反应结束时还原糖浓度的平均值，单位为 mg/mL；

C_0 ——通过标准曲线计算获得 0 号试管反应结束时还原糖浓度，单位为 mg/mL；

t——酶促反应时间，单位为分钟（min）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

N——样品二次稀释倍数；

M——葡萄糖的摩尔质量，180.2；

m——试样质量（液体试样为体积），单位为克或毫升（g 或 mL）；

1000——毫摩尔和微摩尔的转换系数，1 mmol = 1000 μ mol

A.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值，不应超过平均值的10%。

附录 B

(规范性) 褐藻胶裂解酶的鉴别试验

B.1 原理

褐藻胶裂解酶可以通过 β -消除反应切断褐藻胶分子中的糖苷键，产生不饱和双键，不饱和双键位于产物非还原末端C4、C5之间，并235 nm处产生最大紫外吸收。因此，通过分光比色测定反应液235 nm处的吸光值变化，可专一性鉴别褐藻胶裂解酶。

B.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中规定的三级水。

B.2.1 磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.0, 含0.1 mol/L NaCl)

同A.2.3。

B.2.2 褐藻酸钠溶液 (3g/L)

同A.2.4。

B.3 仪器与设备

B.3.1 分析天平：感量0.1 mg。

B.3.2 pH计：分辨率0.01。

B.3.3 磁力搅拌器：附加加热功能。

B.3.4 电磁振荡器。

B.3.5 恒温水浴锅： $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

B.3.6 秒表：每小时误差不超过5s。

B.3.7 紫外-可见光分光光度计：使用10 mm石英比色皿。

B.3.8 移液器：200 μL 、1000 μL 和5000 μL 。

B.3.9 低速离心机

B.4 待验证酶液的制备

固体样品：称取1.0 g 样品（精确至0.0001 g），使用磷酸缓冲液（B.2.1）定容至50 mL，磁力搅拌溶解30 min，取溶解后酶液4000 rpm离心10 min，取上清液，再用磷酸缓冲液（B.2.1）进行二次稀释至酶活力1 U/mL。

液体样品：量取1.0 mL样品，用磷酸缓冲液（B.2.1）定容至50 mL，再用磷酸缓冲液（B.2.1）进行二次稀释至酶活力1 U/mL。

B.5 测定步骤

按表B.1程序操作：

表 B.1 操作程序

空白	试样
取3支150 mm×18 mm玻璃试管，分别标记0、1、2号，0号试管为空白管，1号、2号为试样管	
加入1.8 mL褐藻酸钠溶液（B.2.2），40℃水浴预热5 min	
/	加入200 μL 待验证酶液（B.4），混匀
40℃准确反应10 min	
加入200 μL 待验证酶液（B.4），混匀	/

空气调零，将反应液倒入比色皿中，10 min30 s时，准时读取235 nm处吸光值。

B.6 结果计算

试样溶液在235 nm处，吸光值增长量（AU）按公式（B.1）计算。

$$AU = A_s - A_0 \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

AU——235nm 处，吸光度值增长量；

A_s——1 号试管和 2 号试管反应结束后，10min30s 时吸光值的平均数；

A₀——0 号试管反应结束后，10min30s 时吸光值的平均数；

B.7 鉴别

试样溶液的AU值大于0.5为通过鉴别。

B.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值，不应超过平均值的10%。