

《褐藻胶裂解酶制剂》行业标准编制说明（征求意见稿）

一、工作简况

（一）任务来源

根据《工业和信息化部办公厅印发的 2023 年第一批行业标准制修订计划和外文版项目计划的通知》(工信厅科 [2023]18 号)，《褐藻胶裂解酶制剂》行业标准被列入制定计划项目，计划号是 2023-0503T-QB，由全国食品工业标准化技术委员会归口，中国生物发酵产业协会、青岛蔚蓝生物集团有限公司等单位作为主要起草单位。项目周期是 24 个月，计划完成时间是 2025 年 4 月。

（二）主要工作过程

1、起草（草案、论证）阶段

2023 年 4 月标准任务下达后，中国生物发酵产业协会酶制剂分会对该行业标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案，于 2023 年 5 月公开发文征集起草单位，组建了标准起草工作组。

2024 年 4 月 29 日，召开项目线上启动及第一次起草会议，对标准关键参数及酶活力测定方法进行了讨论，明确实施进度。

2024 年 5 月-6 月，组织褐藻胶裂解酶活力测定方法的分析研究，开展酶活力测定方法的建立与验证。

2024 年 6 月 27 日，召开第二次起草组工作会议，交流前期工作，参与起草单位形成标准讨论稿，明确组织各参与单位对酶活力测定的两种方法，紫外法和 DNS 法进行实验室间比对。

2024 年 6 月-10 月，开展酶活力测定方法的实验室间比对试验。

2024 年 11 月 1 日，召开第三次起草组工作会议，结合实验室间比对试验结果、各参与单位样品数据及起草组建议，进一步修改标准文本和编制说明，形成征求意见稿。

2、征求意见阶段

3、审查阶段

4、报批阶段

（三）主要参加单位和工作组成员及其所做的工作

本文件主要参与单位： 暂略。

本文件主要起草人： 暂略。

所做的工作： 暂略。

二、标准编制原则和主要内容

(一)编制原则

本标准的制定充分考虑国家相关法律、法规，以符合产业发展为原则，本着先进性、科学性、合理性和可操作性的原则，以及标准的规范性原则来进行本标准的制定工作。

本标准在起草过程中，主要依据 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》、GB/T 20001.10-2014《标准编写规则第 10 部分：产品标准》的规定进行编制。

(二)本标准主要内容

本标准规定了褐藻胶裂解酶制剂的范围、规范性引用文件、术语和定义、产品分类、要求、试验方法、检验规则，标志、包装、运输及贮存八个部分。各部分说明如下：

1. 范围

该部分描述了本标准的主要适用范围情况。

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、标签、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

凡本标准文本、附录所引用和涉及到的文件，均在此处列出。

3. 术语和定义

对褐藻胶、褐藻胶裂解酶、褐藻胶裂解酶制剂、褐藻胶裂解酶活力定义、褐藻胶裂解酶活力及褐藻胶裂解酶制剂酶活力进行了定义。

根据结构和来源给出了褐藻胶的定义。

根据酶的反应特性及主要作用机理给出褐藻胶裂解酶的定义。

酶活力单位定义为“在 40 °C、pH 值 7.0 条件下，每分钟裂解褐藻酸钠产生

1 μmol 还原糖的酶量，以“U”表示。”

根据制剂产品的特点，以褐藻胶裂解酶活力为定量指标，以添加载体或稳定剂进行产品制剂化给出褐藻胶裂解酶制剂的定义。

4. 产品分类

从产品形态方面对产品进行了分类。

根据产品形态不同，可分为固体剂型褐藻胶裂解酶制剂和液体剂型褐藻胶裂解酶制剂。目前国内褐藻胶裂解酶制剂产品均以这两种形态为主，其中最为主要得为固体剂型。

5. 要求

本文件根据起草会议讨论意见，搜集市场现有企业产品标准，结合各企标中指标要求和生物酶产品的一般要求，对褐藻胶裂解酶产品确定指标要求。

5.1 感官要求

根据本产品的实际感官性状，从色泽及外观、气味三方面给出本产品的感官要求描述，包括色泽、状态、气味三项指标。

因为本产品感官性状会受到发酵液和载体的颜色和气味，以及不同提取方法、干燥温度的影响，使得最终得到的产品的色泽范围较广，从淡黄色至深褐色，但应该做到色泽均一。

固体产品为粉末或颗粒状，不能有肉眼可见的杂质，无结块、无霉变、无潮解。杂质、结块、霉变、潮解会对下游用户产生不便或安全隐患。液体产品为均匀液体，因有酶保护剂等添加剂，允许因聚集等原因产生的少量絮状物。

本产品干燥之前为液体状或泥状，运输或存放过程容易被杂菌污染，产生腐败变质，反应在产品的的气味上就会产生酸腐味，因此对产品的的气味作了要求。产品应有本品特有的发酵气味，无异味。

5.2 理化指标

固体剂型规定了鉴别、酶活力、干燥失重和细度的要求，液体剂型规定了鉴别、酶活力和 pH 的要求。

褐藻胶裂解酶定义为能够通过 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, C5 不饱和双键糖醛酸产物的酶。C4, 5 不饱和双键在 235 nm 下有特殊的吸收峰，因此使用特定的褐藻胶（褐藻酸钠）底物，酶解后

测定 235 nm 下吸光度值增长量，作为该酶的鉴别。

酶活力是褐藻胶裂解酶制剂产品的特征性及定量指标，设定最低下限 1000 U/g 或 1000 U/mL，以确保下游应用企业的利益。同时，存在酶活力需要根据应用特点进行定制的情况，因此，也可按供需双方合同规定的酶活力规格执行。

干燥失重指标，一方面，由于含水量过高容易导致产品结块、发霉，以及酶活力下降；另一方面，考虑到由于产品的生产、存储，干燥失重会随环境季节等条件发生变化。搜集市场现有企业产品标准，结合各企标中指标要求和生物酶产品的一般要求后，最终规定干燥失重为 $\leq 10\%$ 。

细度指标、pH 指标，综合对比目前已有企业标准指标，根据标准会议讨论意见，结合产品实际应用情况和其它酶制剂标准固体、液体剂型产品的规定，确定细度和 pH 的指标要求。

5.3 安全要求

各领域均需符合相关的安全规定。

6. 试验方法

6.1 感官

根据实验室感官评价实际操作过程，规范细化操作“取适量试样置于洁净的白色盘（瓷盘或同类容器）中，在自然光状态下，观察其色泽、状态，闻其气味。”

6.2 鉴别

褐藻胶裂解酶能够生成在非还原端含有 C4, 5 不饱和双键的糖醛酸产物，C4, 5 不饱和双键在 235 nm 下有特殊的吸收峰，因此使用特定的褐藻胶底物，酶解后测定 235 nm 下吸光度值增长量，作为该酶的鉴别。

6.4 干燥失重、pH、细度

直接引用轻工领域方法标准 QB/T 1803。

7. 检验规则

规定了批次的确定、取样规则和样本量、出厂检验、型式检验、判定规则相关要求。

7.1 批次的确定

鉴于酶制剂类产品生产批次的确定方式基本一致，直接引用轻工领域标准 QBT 4481-2023《 β -葡聚糖酶制剂》中所述批次确定规则。

7.2 取样规则和样本量

同样直接引用轻工领域标准 QBT 4481-2023 《β-葡聚糖酶制剂》中所述规则。

7.3 出厂检验

根据要求中感官要求和理化指标，确定出厂检测项目固体剂型为感官、酶活力、干燥失重、细度；液体剂型为感官、酶活力、pH。

7.4 型式检验

型式检验是对产品质量监督监控的重要手段，本标准规定了型式检验项目为要求中规定的全部项目。

规定了对褐藻胶裂解酶制剂产品周期性开展型式检验。同一类产品的型式检验，在正常生产情况下，每年至少进行一次，有下列情况之一时必须进行型式检验：

- 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) 国家质量监督检验机构按有关规定需要抽检时。

7.5 判定规则

规定了褐藻胶裂解酶制剂合格判定标准及复检条件。

- a) 检验项目全部符合本文件规定时，判定该批产品合格。
- b) 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检，以复检结果为准。超过两项指标不符合本标准规定时，判为不合格，不得复检。
- c) 安全要求有 1 项不合格时，该批产品为不合格，不得复检。

8. 标志、包装、运输、贮存

8.1 标志

8.1.1 销售包装使用标签时，应注明产品名称、生产厂名、厂址、规格、出厂日期、净含量(净体积)及单位包装数量、执行标准编号、分类和酶活力。

8.1.2 包装储运图示标志应符合 GB/T 191 的要求。

8.2 包装

包装容器(瓶、桶、袋等)应整洁、无破损。

8.3 运输

不应与有毒、有害、有腐蚀性和含有异味的物品混装、混运，避免受潮、受压、曝晒。装卸时，应轻拿轻放，不应直接钩扎包装。

8.4 贮存

应贮存在通风、干燥、清洁的仓库内，不应曝晒、雨淋，不应有火种。宜采用阴凉、低温库贮存。

9、解决的主要问题

本标准建立了褐藻胶裂解酶的鉴别和酶活力测定方法，规范了褐藻胶裂解酶制剂产品的要求。本标准的实施能够提升生物发酵产业中褐藻胶裂解酶制剂产品的规范化水平，指导该产品的生产和销售，规范行业健康有序发展。

三、标准主要试验（验证）情况

（一）鉴别试验验证

五家实验室比对结果如表 1 所示，褐藻胶裂解酶 1#的 AU 平均值为 1.49，实验室间 RSD 为 6.98；褐藻胶裂解酶 2#的平均值为 1.60，实验时间 RSD 为 4.33。一家实验室测定自有酶 1#、自有酶 2#的 AU 值，分别为 1.18 和 1.02。分光光度法一般取吸光度值为 0.01 时为检出限，检出限的 3~5 倍为定量限，取 0.05 为定量限。本方法 AU 值测定为 10 分钟，因此，确定 0.5 为鉴别通过值。方法验证所取两个样品及验证实验室两个自有酶均符合。

表 1 鉴别试验 AU 值实验时间比对结果

样品编号	实验室编号	AU 值		实验室内 CV%	平均值	实验室间 RSD%
褐藻胶裂解酶 1#	1	1.413	1.468	3.82	1.441	6.87
	2	1.506	1.394	7.72	1.450	
	3	1.431	1.434	0.21	1.433	
	4	1.628	1.715	5.20	1.672	
	5	1.506	1.394	7.72	1.450	
褐藻胶裂解酶 2#	1	1.633	1.653	1.22	1.643	4.33
	2	1.663	1.535	8.01	1.599	
	3	1.47	1.5	2.02	1.485	
	4	1.667	1.661	0.36	1.664	
	5	1.663	1.535	8.01	1.599	

表 2 鉴别试验 AU 值自由酶结果

样品编号	实验室 编号	AU 值		实验室内 CV%	平均值
自有酶 1#	1	1.11	1.18	4.26	1.1.15
自有酶 2#	1	1.02	1.02	0.29	1.643

(二) 酶活力测定方法验证

褐藻胶酶活力的测定方法，已报道的方法有苔黑酚法、硫代巴比土酸法、紫外吸收法、黏度法和还原糖法。褐藻胶酶活力的测定方法，已报道的方法有苔黑酚法、硫代巴比土酸法、紫外吸收法、黏度法和还原糖法。相对常用的是紫外吸收法、硫代巴比土酸法和还原糖法。其中硫代巴比妥酸法使用到重金属砷，毒性较大；在文献报道中应用最多的是紫外吸收法，该方法操作简便、且具有专一性测定裂解不饱和双键产物的特性；3, 5-二硝基水杨酸(DNS) 法也是应用较多的方法，并非专一性测定裂解酶，水解酶也可以测到酶活力。通过“企业标准信息公共服务平台”及中英文文献检索，目前测定褐藻胶裂解酶的方法主要为 DNS 法和紫外法，见表 3。

表 3 褐藻胶裂解酶活力测定条件列表

方法	来源	酶活力定义	测定条件	底物
DNS 法	夏海峰. 褐藻胶裂解酶 <i>TamLana</i> sp.S12 藻类多糖利用酶类及其对海带降解特征的分析. 山东, 山东大学, 2023.	每分钟降解底物生成 1 μ mol 还原糖的酶量	40 $^{\circ}$ C	3.33g/L 海藻酸钠
DNS 法	孟青. 褐藻胶裂解酶产酶菌株挖掘及其催化特性研究. 无锡, 江南大学, 2021.	每分钟降解底物生成 1 μ mol 还原糖的酶量	35 $^{\circ}$ C, pH7.5 磷酸缓冲液 (含氯化钠 300mmol/L), 底物 5g/L, 每分钟降解底物生成 1 μ mol 还原糖的酶量。	5g/L 海藻酸钠
DNS 法	周燕霞. 褐藻胶裂解酶分泌菌株的分离鉴定及 <i>TamLana holothuriorum</i> s12 ^T 中褐藻胶裂解酶的研究, 山东大学, 2016.	每分钟降解底物生成 1 μ mol 还原糖的酶量	45 $^{\circ}$ C	3g/L 海藻酸钠
DNS 法	王林娜. 海洋细菌 <i>Shewanella</i> sp. Kz7 的寡褐藻胶裂解酶研究, 中国海洋大学, 2014.	每分钟降解底物生成 1 μ mol 还原糖的酶量	20 mM 磷酸盐缓冲液, pH7.0	3g/L 海藻酸钠

DNS 法	付晓婷. 海洋细菌 (<i>Agarivorans albus</i> YKW-34) 产生的褐藻胶裂解酶及琼胶酶的研究, 中国海洋大学, 2008.	每分钟降解底物生成 0.1 μ mol 还原糖的酶量	30 $^{\circ}$ C , 20mM Tris-HCl 缓冲液, pH8.0	5g/L 海藻酸钠
DNS 法	Q_NNHH15-2020 褐藻胶裂解酶最新 (南宁汉和生物)	每分钟生成 1 μ g 还原糖的酶量	40 $^{\circ}$ C, pH7.5, 缓冲体系含有氯化钠和硫酸镁	海藻酸钠 9.5g/L
DNS 法	Q_371082DPS007-2021 褐藻胶裂解酶最新 (威海迪普森)	每分钟生成 1 μ g 还原糖的酶量	40 $^{\circ}$ C, pH7.5, 缓冲体系含有氯化钠和硫酸镁	海藻酸钠 9.5g/L
DNS 法	Q/371082WSH 010-2021 复合海藻酶 威海市世代海洋生物	每分钟生成 1 μ g 还原糖	30 $^{\circ}$ C, 其它条件未提及。	/
DNS 法 紫外法	汤海青. 用海洋细菌 <i>Pseudoal teromonas tetrodonis</i> QZ-4 发酵生产褐藻胶裂解酶的研究, 2010, 浙江大学.	1、每分钟降解底物生成 1 μ g 还原糖的酶量。 2、235nm 条件下每分钟吸光度值增加 0.1 (参考文献 Preiss Ashwell 法)	1、pH7.4 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 40 $^{\circ}$ C 2、pH7.4 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液, 40 $^{\circ}$ C	1、2.5g/L 海藻酸钠 2、2g/L 海藻酸钠
紫外法	韩峰, 海洋弧菌 QY103 褐藻胶裂解酶的研究, 中国海洋大学, 2008	235nm 条件下每分钟吸光度值增加 0.1 (参考文献 Preiss Ashwell 法)	pH6.0, 0.1M 磷酸缓冲液, 40 $^{\circ}$ C。	2.7g/L 海藻酸钠
紫外法	青岛蔚蓝生物实验室标准	235nm 条件下每分钟吸光度值增加 1	pH7.0 , 0.05mol/L 磷酸缓冲液	2.7g/L 海藻酸钠
紫外法	Preiss Ashwell 方法 Jack Preiss and Gilbert Ashwell. Alginate Acid Metabolism in Bacteria. The Journal of Biological Chemistry.1962, 237(2). Keke Zhang , et al. Substrate-Binding Mode and Intermediate-Product Distribution Coguided Protein Design of Alginate Lyase AlyF for Altered End Product Distribution. Journal	230nm 条件下 4 分钟内吸光度值增加 1	30 $^{\circ}$ C , pH7.5 , Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5) with 200 mM NaCl	2g/L 海藻酸钠

of Agricultural and Food Chemistry. 2021, 69: 7190–7198

Benwei Zhu, et al.
Elucidation of degrading pattern and substrate recognition of a novel bifunctional alginate lyase from *Flammeovirga* sp. NJ-04 and its use for preparation alginate oligosaccharides. Biotechnol Biofuels. 2019, 12:13

Shengsheng Cao, et al.
A novel alginate lyase and its domain functions for the preparation of unsaturated monosaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology. 2023, 107:1737–1749

紫外法 235nm 条件下测定吸光度值增长量, 利用消光系数 6150 M-1cm-1 来计算。

紫外法 235nm 条件下测定吸光度值增长量, 利用消光系数 6150 M-1cm-1 来计算。 45°C, pH9.0 4.5g/L 海藻酸钠

文献报道以紫外法和 DNS 法为主, 但是由于紫外法无法获得稳定的基准物和可靠出处的消光系数, 选择经典 DNS 法作为酶活力测定方法。另一方面, DNS 法作为还原糖测定的经典方法, 并不能体现褐藻胶裂解酶制剂裂解的特性, 因此, 增加紫外法作为鉴别试验。

1. 基准物的确定

褐藻胶裂解酶能够降解褐藻酸钠为含有古罗糖醛酸或甘露糖醛酸还原末端的单糖或寡糖, 但因这两种试剂规格均为毫克级别, 价格昂贵不适用于常规理化分析的标准品。因此分别选择葡萄糖和葡萄糖醛酸作为基准物绘制标准曲线。

结果如表 4、图 1、图 2 所示, 以葡萄糖或葡萄糖糖醛酸作为基准物绘制标准曲线, 结果没有显著差异。虽然理论上将葡萄糖醛酸替代古罗糖醛酸和甘露糖醛酸更好, 但实际操作中葡萄糖醛酸不适合高温干燥, 因此标准选择更实用的葡萄糖作为基准物。

表 4 分别以葡萄糖和葡萄糖醛酸为基准物做标准曲线原始数据

糖浓度 (mg/mL)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5
540 nm 葡萄糖	0.014	0.104	0.201	0.305	0.393	0.488	0.582

吸光度值	葡萄糖醛酸	0.001	0.096	0.196	0.29	0.385	0.482	0.581
------	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	-------

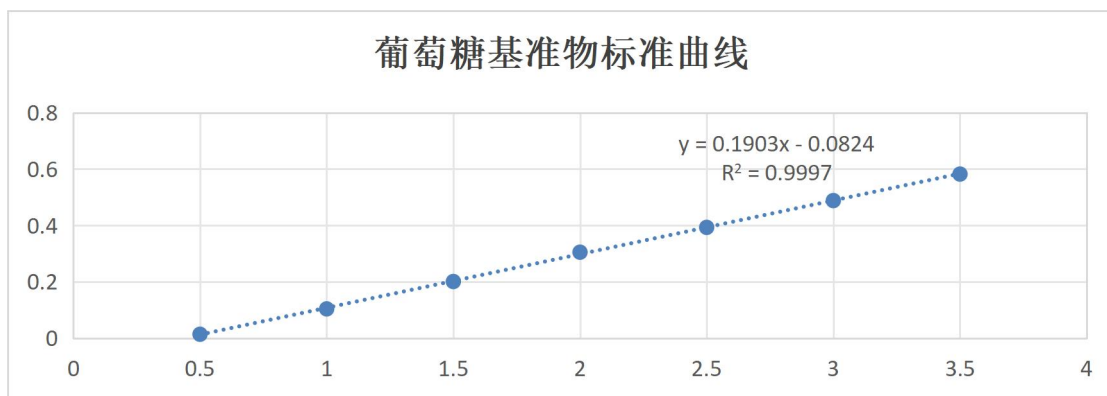


图 1 以葡萄糖为基准物标准曲线

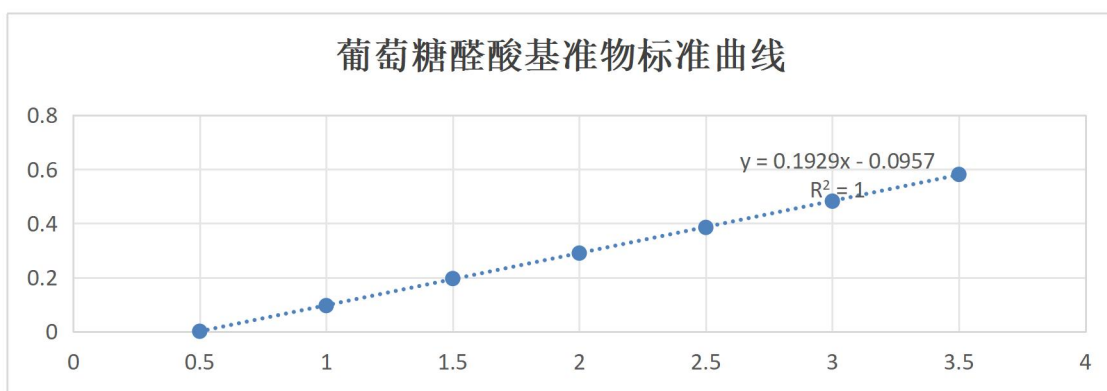


图 2 以葡萄糖醛酸为基准物标准曲线

2. 底物的选择

选择 7 种国产试剂级褐藻酸钠, 外观和溶解状态见图 3~图 5。分别测定黏度、还原糖浓度, 并且在底物浓度 3 g/L、pH7.0、40℃条件下测定酶活力, 结果如表 5、表 6 所示, 7 种酶活力结果偏差不大, 变异系数为 5.16%。低粘度海藻酸钠本底还原糖浓度偏高, 高粘度海藻酸钠不便于操作。因此, 本标准确定选择底物为中等粘度的海藻酸钠。

表 5 不同底物信息

序号	生产厂家	货号	黏度	纯度/级别
1	阿拉丁	A434495	低黏度	/
2	阿拉丁	A434499	中等黏度	/
3	阿拉丁	S100126	黏度 200±20mpa·s	/
4	阿拉丁	S100128	/	AR 级别
5	麦克林	S817374	/	AR 级别, 90%
6	明月海藻	/	中等黏度	食品级
7	国药	30164428	10g/L, ≥20mpa·s	CP



图 3 褐藻酸钠试剂外包装的图

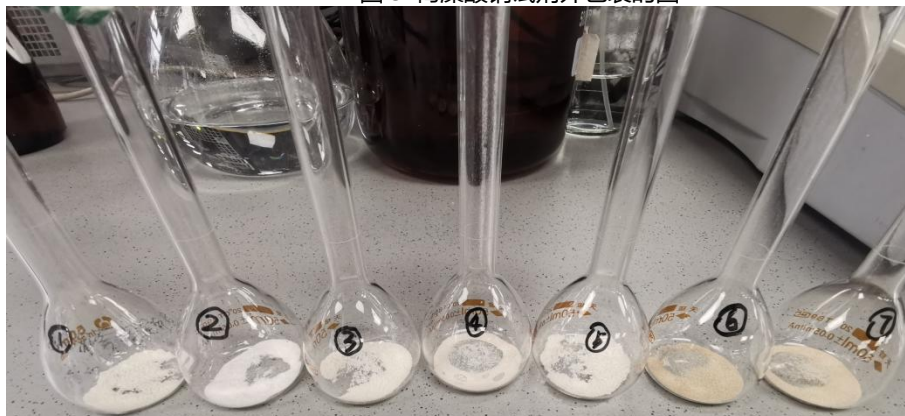


图 4 褐藻酸钠试剂外观的图



图 5 褐藻酸钠溶液外观的图

表 6 不同底物黏度、还原糖浓度、酶活力结果

序号	厂家	10 g/L 褐藻酸钠溶液 黏度, 毫帕秒 (mPa·s)	10 g/L 褐藻酸钠溶液 还原糖浓度, mg/mL	酶活力 U/g
1	阿拉丁 A434495	4.94	1.552	19631
2	阿拉丁 A434499	186	0.454	21521
3	阿拉丁 S100126	144	0.517	21591
4	阿拉丁 S100128	248	0.465	19876
5	麦克林	244	0.507	20891
6	明月海藻	671	0.543	20786
7	国药	72.33	0.396	22801
平均值, U/g				21014
变异系数, RSD%				5.16

3. 底物浓度的确定

使用国药化学纯试剂海藻酸钠，配制不同浓度的底物，测定酶活力，结果如表 7 所示，在底物终浓度 0.5~5 g/L 范围内，酶活力随底物浓度增加而升高，但升高至 2 g/L 以上后酶活力变化不显著，但随之底物浓度增大，粘度增大，不利于吸取，因此，最终确定底物配制浓度为 3 g/L，即 0.3%，酶促反应终浓度为 2.7 g/L。

表 7 不同底物浓度酶活力测定结果

底物浓度, g/L	酶活力, U/g	溶液粘度
1	15282	1.26
2	19130	3.59
3	23759	6.44
4	24261	9.83
5	24428	15.81
8	22253	46.56
10	22811	85.16

4. 底物有效期确定

配制 3 批次底物溶液储存于 4℃ 冰箱放置 5 天，每天观察溶液状态并测定酶活力，结果如表 8 所示，5 天中溶液外观变化不大，测得的酶活力 RSD 2.96%，底物可 4℃ 冷藏保存 5 天。标准文本中规定，底物溶液的保存条件为，4℃ 冷藏保存 5 天。

表 8 底物有效期

底物编号	配置天数	稀释倍数	标准空白	空白(减标空)	平行 1	平行 2	平行 3	酶活力	平均值	变异系数 RSD%
	1	30000	0.058	0.009	0.266	0.274	0.283	18853		
	2	30000	0.056	0.014	0.283	0.294	0.3	19777		
1	3	30000	0.055	0.023	0.273	0.281	0.289	18332	18943	
	4	30000	0.055	0.009	0.271	0.272	0.283	18924		
	5	30000	0.054	0.015	0.265	0.287	0.288	18830		
	1	30000	0.058	0.008	0.274	0.276	0.28	19090		2.96
	2	30000	0.056	0.010	0.291	0.291	0.302	20227		
2	3	30000	0.055	0.013	0.27	0.27	0.286	18640	19242	
	4	30000	0.058	0.008	0.272	0.276	0.277	18972		
	5	30000	0.054	0.013	0.274	0.292	0.287	19280		
3	1	30000	0.058	0.010	0.271	0.279	0.286	19090	19592	

2	30000	0.056	0.015	0.294	0.295	0.300	19990
3	30000	0.055	0.019	0.29	0.283	0.287	19019
4	30000	0.056	0.015	0.297	0.296	0.293	19919
5	30000	0.054	0.035	0.322	0.308	0.317	19943

5. 待测酶液酶浓度范围确定

使用磷酸缓冲液将酶液稀释不同倍数，使得待测酶液浓度范围为 0.258~1.919 U/mL，结果如表 9 所示，随稀释倍数的增加，酶活力数值呈现出先升高再降低的趋势，结合样品吸光度值在标准曲线中位数（约 0.3）左右为适宜的原则，最终确定标准中规定的范围为 0.5 U/mL~1.1 U/mL。

表 9 不同酶浓度时酶活力测定结果

稀释梯度	稀释倍数	空白吸光度值	样品平均吸光度值	空白糖浓度	样品糖浓度	酶活力, U/g	待测酶液浓度, U/mL
1	10000	0.017	0.675	0.522	3.980	19188	1.919
2	11000	0.014	0.628	0.507	3.730	19679	1.789
3	12000	0.016	0.583	0.517	3.494	19824	1.652
4	13000	0.014	0.549	0.507	3.315	20263	1.559
5	14000	0.021	0.523	0.543	3.181	20495	1.464
6	15000	0.015	0.479	0.512	2.947	20274	1.352
7	18000	0.012	0.416	0.496	2.619	21206	1.178
8	21000	0.014	0.363	0.507	2.338	21342	1.016
9	25000	0.012	0.315	0.496	2.086	22053	0.882
10	32000	0.011	0.252	0.491	1.757	22489	0.703
11	36000	0.012	0.224	0.496	1.610	22256	0.618
12	42000	0.007	0.194	0.470	1.452	22903	0.545
13	50000	0.007	0.156	0.470	1.250	21652	0.433
14	63000	0.006	0.123	0.465	1.079	21495	0.341
15	80000	0.008	0.097	0.475	0.940	20646	0.258
					平均值	21051	
					标准差	1108	
					变异系数	5.26	
					平均值	21925	
					标准差	600	
					变异系数	2.74	

6. 加标回收

取样品酶提取后并进行一定程度的稀释，使酶浓度在 0.5 U/mL~1.1 U/mL 之间，按照标准文本测定方法进行测定，此为未加标试样，测定出的吸光度对应出的葡萄糖浓度值记为 X_0 ；同时取样品酶稀释液，加入一定量标准溶液，添加浓

度为 1 mg/mL，按照标准文本测定，此为加标样，测定出的吸光度对应出的葡萄糖浓度记为 X_I ，以葡萄糖浓度回收率表示加标回收率，按下式计算：

$$P = \frac{X_I - X_0}{m} \times 100\%$$

式中：

P——加入标准物质的回收率；

X_I ——加标试样测定值对应出的葡萄糖浓度，mg/mL；

X_0 ——未加标试样测定值对应出的葡萄糖浓度，mg/mL；

m——加入的标准物质的量，mg/mL。

不同类型的样品分别做加标回收率，实验测定 3 次平行，试验数据见表 10。

表 10 加标试验数据

平行试管	样品 1			样品 2			
	样品 X_0	加标样 X_I	回收率	样品 X_0	加标样 X_I	回收率	
结果 (mg/mL)	1	0.255	1.266	101.1%	0.265	1.267	100.2%
	2	0.254	1.275	102.1%	0.265	1.264	99.9%
	3	0.254	1.277	102.3%	0.262	1.265	100.3%
加标量 m (mg/mL)	1			1			
平均回收率 P	101.83%			100.13%			

7. 精密度

取同一样品，相同条件平行测定 6 次，试验结果见下表 11，RSD 为 2.18%，说明重复性较好。

表 11 精密度

编号	酶活力, U/g	RSD, %
1	20878	2.18
2	21003	
3	20735	
4	20556	
5	20498	
6	21871	

8. 检出限与定量限

按照样品分析的全部步骤，重复 7 次样品空白试验，将各测定结果换算为样品中的浓度或含量，计算 7 次平行测定的标准偏差，按公式 1 计算方法检出限，结果为 0.0259 U/mL，具体数据见表 13。

$$MDL = t(n-1, 0.99) \times S \dots\dots\dots \text{(公式 1)}$$

式中：

MDL——方法检出限；

n——样品的平行测定次数；

t——自由度为 n-1，置信度为 99%时的 t 分布（单侧）；

S —— n 次平行测定的标准偏差。

其中，当自由度为 n-1，置信度为 99%时的 t 值可参考表 12 取值。

表 12 t 值表

平行测定次数 (n)	自由度 (n-1)	t (n-1,0.99)
7	6	3.143
8	7	2.998
9	8	2.896
10	9	2.821
11	10	2.764
16	15	2.602

表 13 检出限

序号	标准空白吸光度值	样品空白吸光度值	酶活力 (U/mL)	检出限 (U/mL)
1	0.058	0.067	0.0213	
2	0.056	0.071	0.0355	
3	0.055	0.066	0.0261	
4	0.055	0.066	0.0261	0.0259
5	0.054	0.072	0.0426	
6	0.058	0.066	0.0189	
7	0.056	0.069	0.0308	

一般使用分光光度法测定还原糖含量，定量限为 3~5 倍检出限，但是对于酶活力测定来讲，规定了吸光值控制范围。本标准以 5 倍检出限计算定量限为 0.130 U/mL，以吸光值控制范围下限计算定量限为 0.5 U/mL。因此，本方法的定量限为 0.5 U/mL。基于褐藻胶裂解酶制剂产品酶活力一般远高于定量限，因此在本标准文本中并未体现定量限。

9. 实验室间比对

2024 年 7 月，组织行业内 7 家实验室开展褐藻胶裂解酶活力测定方法的实验室验证工作。各实验室采用本标准讨论稿方法，使用组织方提供的底物褐藻酸钠，对组织方统一提供的酶制剂样品褐藻胶裂解酶 1#、褐藻胶裂解酶 2#进行酶活力测定。比较分析方法及酶活力的差异。

9.1 标准曲线

参与实验室间比对的七家实验室，分别使用自有分光光度计或酶标仪设备，测定标准曲线见表 14，以 K 值计算，去除高低极值后，变异系数为 7.5%，符合测定需求。

表 14 酶活力测定标准曲线实验室间比对结果

浓度, mg/ml	OD540						
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6	实验室 7
0.5	0.009	0.025	0.07	0.02	0.018	0.014	0.004
1	0.144	0.165	0.16	0.163	0.158	0.146	0.124
1.5	0.28	0.322	0.27	0.339	0.283	0.274	0.226
2	0.408	0.477	0.39	0.625	0.397	0.414	0.346
2.5	0.526	0.622	0.5	0.87	0.534	0.518	0.456
3	0.65	0.742	0.59	1.121	0.658	0.625	0.563
3.5	0.764	0.856	0.66	1.453	0.766	0.763	0.706
K	0.252	0.282	0.204	0.482	0.250	0.246	0.230
b	-0.106	-0.105	-0.031	-0.308	-0.097	-0.099	-0.113

9.2 方法比对结果

使用组织方提供的底物褐藻酸钠，对组织方统一提供的酶制剂样品褐藻胶裂解酶 1#、褐藻胶裂解酶 2#进行酶活力测定，结果如表 15 所示，两个样品酶活力测定结果实验室间重复性分别为 11.03%和 12.53%，满足方法需求。

表 15 褐藻胶裂解酶活力实验间方法比对结果

样品编号	实验室 编号	酶活力, U/g		实验室内 CV, %	平均值, U/g	实验室间 RSD, %
褐藻胶裂解酶 1#	1	11000	11346	3.10	11173	11.03
	2	9071	9051	0.22	9061	
	3	10380	9831	5.43	10106	
	4	12922	12645	2.17	12784	
	5	11472	11972	4.27	11722	
	6	11778	11822	0.37	11800	
	7	10403	11203	7.41	10803	
褐藻胶裂解酶 2#	1	23121	23811	2.94	23466	12.53
	2	17890	17890	0.00	17890	
	3	27148	26249	3.37	26699	
	4	20246	20592	1.69	20419	
	5	24145	24745	2.45	24445	
	6	23166	24197	4.35	23682	
	7	23298	22709	2.56	23004	

(三) 市场样品验证

起草组共征集了 22 个褐藻胶裂解酶制剂样品进行检测，其中 90%以上检测结果符合本标准要求，检测结果见附件。在考虑提升技术水平的基础上，本标准

检测指标设置合理。

四、标准中涉及专利的情况

标准中无涉及专利。

五、预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

近年来，对海洋资源利用掀起了新的高潮。褐藻胶是广泛存在于马尾藻、巨藻和海带等褐细胞壁中的一类多糖物质，其中褐藻胶含量能达到褐藻干重的 40% 左右。在国外如欧美等国家，褐藻胶的生产主要来源于巨藻；在我国，褐藻胶的生产主要来源于人工养殖的褐藻，北方以养殖海带为主，南方以养殖马尾藻为主，商业化的褐藻胶从这些大型型褐藻中提取后常以钠盐等形式存在。使用褐藻胶裂解酶降解褐藻胶获得的褐藻低聚糖和褐藻寡糖具有很强的生物活性，如抗肿瘤、抗氧化、促进植物生长、免疫调节和抗糖尿病等。褐藻寡糖的生产主要有三类方法：化学法（酸解法、碱解法和氧化法），物理降解（辐射法）和生物降解（微生物发酵和酶法）。其中，酶法在非酸性条件下有效的降解褐藻胶且不产生毒副产物，目前已经被很多褐藻加工企业应用。2011 年，农业部第 1697 号公告，批准大连中科格莱克生物科技有限公司申请的褐藻酸寡糖（海藻酸钠经褐藻酸裂解酶水解生产）为新饲料添加剂。

褐藻胶裂解酶可以用于海藻肥生产中，海藻肥富含褐藻寡糖，研究发现褐藻寡糖具有类似于植物内源性信号分子的作用与结构，对促进植物生长有着一定的作用；对种子的发芽与生根有促进作用，加快农作物的生长进程；能够抑制植物病原菌，降低植物病害。通过本标准的制定和实施，促进褐藻胶裂解酶行业及下游应用领域的健康可持续发展，具有显著的社会效益。

六、与国际、国外对比情况

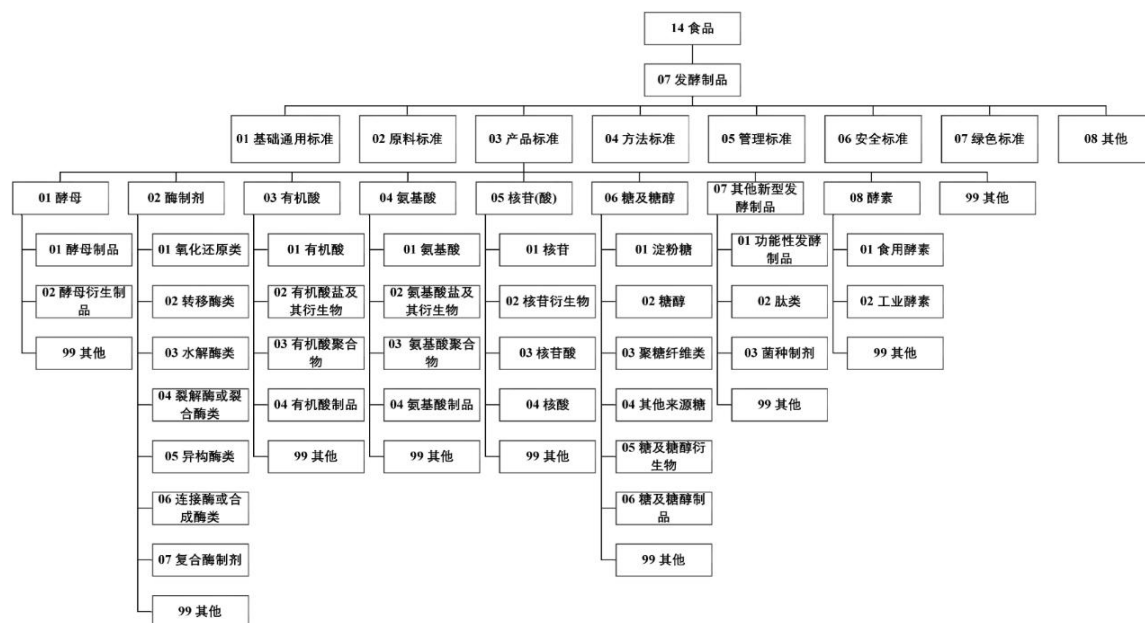
本标准没有采用国际标准。

本标准制定过程中未查到同类国际、国外标准。

本标准制定过程中未测试国外的样品。

本标准水平为国际领先水平。

七、在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性



本专业领域标准体系框图下图。

本标准属于食品行业发酵制品领域标准体系“酶制剂”中类，“裂解酶或裂合酶类”小类。

本标准与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致，无不符、冲突之处。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中未出现重大分歧意见。

九、标准性质的建议说明

建议本标准的性质为推荐性行业标准。

十、贯彻标准的要求和措施建议

建议本标准批准发布 6 个月后实施。

十一、废止现行相关标准的建议

无。

十二、其他应予说明的事项

无。

《褐藻胶裂解酶制剂》行业标准编制工作组

2024 年 12 月

附件：褐藻胶裂解酶制剂产品检测结果

样品	色泽	状态	气味	酶活/(U/g 或 U/mL)	干燥失 重/%	细度/%
样品 1	浅黄色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	5244	5.2	99.7
样品 2	浅黄色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	5507	4.86	99.5
样品 3	浅黄色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	5032	3.49	100
样品 4	浅黄色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	2949	11.49	98.5
样品 5	浅黄色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	5024	2.01	100
样品 6	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	12007	2.49	100
样品 7	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	11800	3.48	100
样品 8	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	12107	2.38	100
样品 9	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	11788	3.04	99.7
样品 10	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	13072	2.88	99.9
样品 11	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	21100	3.44	100
样品 12	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	21233	3.79	100
样品 13	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	21070	3.47	100
样品 14	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	22002	2.48	100
样品 15	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	21885	2.98	100
样品 16	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	22134	4.42	100
样品 17	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味,无异味	21084	3.08	100

样品 18	浅褐色	固体粉末	有特殊发酵气味, 无异味	20056	4.22	100
样品 19	褐色	固体粉末	有特殊发酵气味, 无异味	31127	4.66	100
样品 20	褐色	固体粉末	有特殊发酵气味, 无异味	30924	4.21	100
样品 21	褐色	固体粉末	有特殊发酵气味, 无异味	31202	4.56	100
样品 22	褐色	固体粉末	有特殊发酵气味, 无异味	31970	3.79	100
