ICS 67.220.20
CCS X 69

中华人民共和国国家标准

GB/T 23527.1—202×
代替 GB/T 23527—2009

酶制剂质量要求　第1部分：蛋白酶制剂

Quality requirements for enzyme preparations—Part 1: Protease preparations

××××-××-××发布　　××××-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　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。

本文件是GB/T 23527《酶制剂质量要求》的第1部分。GB/T 23527已经发布了以下部分：

——第1部分：蛋白酶制剂。

本文件代替GB/T 23527—2009《蛋白酶制剂》，与GB/T 23527—2009相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

——增加了术语“蛋白酶制剂”“蛋白酶活力单位”（见3.2、3.3）；

——更改了“蛋白酶活力”的定义（见3.4，2009年版的3.2）；

——更改了理化要求中的“酶活力”要求（见表2，2009年版的表1）；

——删除了“卫生要求”（见2009年版的5.3）；

——更改了干燥失重和细度的试验方法（见6.3、6.4，2009年版的6.3、6.4）；

——更改了出厂检验项目（见7.3，2009年版的7.3.1）；

——更改了标志的内容（见8.1，2009年版的8.1）；

——删除了“保质期”（见2009年版的第9章）；

——删除了“国内常用蛋白酶制剂的类别、代号与生产菌”的清单（见2009年版的附录A）；

——增加了“蛋白酶活力的测定　福林法”中其他缓冲溶液（见A.3.8.4）；

——增加了“蛋白酶活力的测定　紫外分光光度法”中的其他底物（见B.3）；

——更改了“碱性蛋白酶活力的测定　全自动生化分析法”中的试剂（见C.3，2009年版的D.4）；

——增加了“蛋白酶活力的测定　微量比色法”的试验方法（见附录D）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国食品工业标准化技术委员会（SAC/TC 64）提出并归口。

本文件起草单位：中国食品发酵工业研究院有限公司、中国生物发酵产业协会、诺维信（中国）投资有限公司、山东隆科特酶制剂有限公司、杰能科（中国）生物工程有限公司、武汉新华扬生物股份有限公司、英联酶制剂贸易（上海）有限公司、白银赛诺生物科技有限公司、广州焙乐道食品有限公司、湖南新鸿鹰生物工程有限公司、帝斯曼（中国）有限公司、青岛蔚蓝生物集团有限公司、天野酶制剂（江苏）有限公司上海分公司、安琪酵母股份有限公司、江苏奕农生物股份有限公司、南京百斯杰生物工程有限公司、宁夏夏盛实业集团有限公司、北京昕大洋科技发展有限公司、河南新仰韶生物科技有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、山东省鲁洲食品集团有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、中山市南方新元食品生物工程有限公司。

本文件主要起草人：刘明、陈楠楠、王晋、张峻炎、郭庆文、齐延芳、周樱、裴静、俞峰、童远洋、黄石桥、杜建华、陈亮珍、王友谊、杜支红、常东民、徐红、沈涛、郭宝林、焦国宝、张宗国、赵玉斌、黄志明、刘高峰、郭新光、王洁、王金凤、钱娟娟、王健蕾、徐丽、权中华、杨忠义、高铁成、易鸣、袁琳、邵静、李英玉、喻晨、王俊峰、朱伟、程伟、余艳、何景阳、邓娟娟、周莉芬、王校冬、田天娥。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——本文件于2009年首次发布；

——本次为第一次修订。

引　言

随着酶制剂工业的迅速发展，酶制剂种类向多元化发展，产品质量提高到一个新的水平，行业从技术到品种都有了长足的进步与发展。制定 GB/T 23527《酶制剂质量要求》，是对酶制剂的产品质量和检测方法的规范化和标准化，是规范酶制剂及相关产品行业秩序、促进产业发展的基础性工作。

GB/T 23527《酶制剂质量要求》拟由四个部分构成：

——第 1 部分：蛋白酶制剂；

——第 2 部分：脂肪酶制剂；

——第 3 部分：α-淀粉酶制剂；

——第 4 部分：固定化葡萄糖异构酶制剂。

随着蛋白酶制剂行业产品创新发展，根据行业产品调研和征集产品种类，除了原标准范围涵盖的微生物发酵来源的蛋白酶制剂产品，还有木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶等植物组织提取产品和胃蛋白酶、胰蛋白酶等动物组织提取产品。另外，根据国内外检测方法行业产品发展需要，在本次修订中，对 GB/T 23527—2009 酶活力测定方法的测定条件进行了更新完善，并增加了微量比色法。

酶制剂质量要求　第1部分:蛋白酶制剂

1　范围

本文件规定了蛋白酶制剂的产品分类、要求、检验规则、标志、包装、运输和贮存,并描述了试验方法。

本文件适用于微生物发酵或植物组织来源的蛋白酶制剂的生产、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/T 191　包装储运图示标志

GB/T 601　化学试剂　标准滴定溶液的制备

GB/T 602　化学试剂　杂质测定用标准溶液的制备

GB/T 603　化学试剂　试验方法中所用制剂及制品的制备

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

3　术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

蛋白酶　protease

能催化水解蛋白质分子内部的肽键,使其转化为多肽或氨基酸的酶。

3.2

蛋白酶制剂　protease preparations

以提取、纯化的蛋白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

蛋白酶活力单位　activity unit of protease

在一定温度和pH条件下,1 min水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸所需的蛋白酶量,即为1个酶活力单位。

注:以“U”表示。

3.4

蛋白酶活力　protease activity

蛋白酶制剂的酶活力　activity of protease preparations

催化蛋白质水解为多肽和氨基酸的能力,表示为1 g固体蛋白酶制剂(或1 mL液体蛋白酶制剂)含有的酶活力单位。

注：以 U/g 或 U/mL 表示。

4 产品分类

4.1 按产品的应用领域

食品工业用和其他工业用蛋白酶制剂。

4.2 按产品的形态

固体剂型和液体剂型蛋白酶制剂。

4.3 按产品的作用 pH 范围

酸性、中性和碱性蛋白酶制剂。

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	白色至黄褐色	浅黄色至棕褐色
状态	粉末或颗粒，无结块、潮解现象	液体，允许有少量凝聚物
气味	无异味，微生物发酵产品或有特殊发酵气味	

5.2 理化要求

应符合表 2 的规定。

表 2 理化要求

项目		固体剂型	液体剂型
酶活力[a]/(U/g 或 U/mL)		符合声称	符合声称
干燥失重[b]/%	≤	8.0	—
细度(通过网孔尺寸 0.40 mm 的试验筛)[b]/%	≥	80	—
[a] 也可按供需双方约定酶活力要求执行。 [b] 不适用于颗粒产品。			

6 试验方法

6.1 感官要求

称取样品 10 g 或 10 mL 于洁净、干燥白瓷盘，观察、嗅闻，作出判断，做好记录。

6.2 酶活力

按附录 A 进行检测，也可参考附录 B、附录 C、附录 D 或采用其他方法进行检测。检测结果应标明测定的方法，必要时，还应标明缓冲溶液和底物。

6.3 干燥失重

按 QB/T 1803 中干燥失重的试验方法执行。

6.4 细度

按 QB/T 1803 中细度的试验方法执行，标准试验筛选择 ϕ200×50—0.40/0.25。

7 检验规则

7.1 批次

同原料、同配方、同工艺、同生产线连续生产的产品为一批。

7.2 抽样

抽样的样本量可按照表 3 执行，或由生产企业和(或)相关方确定。每个最小外包装单位的取样量应不小于 300 g 或 300 mL，不足时按照比例适当加取。充分混合均匀后进行检验。

表 3 抽样的样本量

批量范围(最小外包装单位)	抽样的样本量(最小外包装单位)
50 以下	2
51～500(含)	3
500 以上	4
注：批量范围是指批中所包含的最小外包装单位数量。抽样的样本量是指抽取样本的最小外包装单位数量。	

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 检验项目

固体剂型的检验项目：感官要求、酶活力、干燥失重、细度。

液体剂型的检验项目：感官要求、酶活力。

7.4 型式检验

检验项目：本文件中全部要求项目。一般情况下，同一类产品的型式检验每年至少进行一次，有下列情况之一者，亦应进行：

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） 国家监督机构按有关规定需要抽检时。

7.5 判定规则

7.5.1 抽取样品经检验，所检项目全部符合要求，判该批产品符合本文件。

7.5.2 检验结果如有两项以上指标不符合要求，判定该批产品不符合本文件。如有一项至两项不符合要求，应重新自同批产品中抽取样本量的两倍进行复检，以复检结果为准。若仍有一项不符合要求，判定该批产品不符合本文件。

7.5.3 当供需双方对检验结果有异议时，可由双方协商解决，或委托有关单位进行仲裁检验，以仲裁检验结果为准。

8 标志、包装、运输和贮存

8.1 标志

8.1.1 销售包装使用标签时，应标注产品类型和酶活力。

8.1.2 包装贮运图示标志应符合 GB/T 191 的要求。

8.2 包装

包装容器应整洁、无破损。

8.3 运输

运输工具应清洁卫生，不应与有毒、有害、有腐蚀性和含有异味的物品混装、混运，应避免受潮、受压、暴晒。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，严防日晒雨淋，严禁火种。不应与有毒、有害、有腐蚀性和含有异味的物品放在一起。

附 录 A
（规范性）
蛋白酶活力的测定 福林法

A.1 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，在碱性条件下，还原福林试剂生成钼蓝与钨蓝，用分光光度计于波长 680 nm 处测定溶液的吸光度。酶活力与吸光度成正比，由此可以计算产品的酶活力。

A.2 仪器和设备

A.2.1 电子天平：感量为 0.1 mg。

A.2.2 分光光度计。

A.2.3 恒温水浴锅。

A.2.4 pH 计：精度为 0.01。

A.3 试剂和溶液

本方法中所用的水，在未注明其他要求时，应符合 GB/T 6682 中三级水的规格，所用试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯。分析中所用标准滴定溶液，杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按 GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603 的规定制备。

A.3.1 福林试剂

于 2 L 磨口回流装置中分别加入 100.0 g 钨酸钠（$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$）、25.0 g 钼酸钠（$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$）、700 mL 水、50 mL 磷酸（85%）、100 mL 浓盐酸，小火沸腾回流 10 h，取下回流冷却器，在通风橱中加入 50 g 硫酸锂（Li_2SO_4）、50 mL 水和数滴浓溴水（99%），再微沸 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，转移至 1 000 mL 容量瓶中，蒸馏水定容，混匀并过滤。制得的试剂应呈金黄色，贮存于棕色瓶内。

A.3.2 福林使用溶液

量取 50 mL 福林试剂（A.3.1）和 100 mL 水，混合均匀。

注：也可使用市售福林溶液配制。

A.3.3 碳酸钠溶液（0.4 mol/L）

称取 42.4 g 无水碳酸钠（Na_2CO_3），用水溶解并定容至 1 L。

A.3.4 三氯乙酸（0.4 mol/L）

称取 65.4 g 三氯乙酸，用水溶解并定容至 1 L。

A.3.5 氢氧化钠溶液（20 g/L）

称取 20.0 g 氢氧化钠，加水 900 mL 并搅拌溶解。待溶液到室温后水定容至 1 L。

A.3.6 盐酸溶液(1.0 mol/L)

移取 8.3 mL 浓盐酸于盛有 80 mL 水的容量瓶中,水定容并摇匀。

A.3.7 盐酸溶液(0.1 mol/L)

移取 0.83 mL 浓盐酸于盛有 80 mL 水的容量瓶中,水定容并摇匀。

A.3.8 缓冲溶液

A.3.8.1 磷酸缓冲溶液(pH=7.5,适用于中性蛋白酶制剂)

分别称取 6.02 g 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)和 0.5 g 磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$),加水溶解并定容至 1 000 mL。盐酸溶液(A.3.6)或氢氧化钠溶液(A.3.5)调节 pH 至 7.50±0.05。

A.3.8.2 乳酸钠缓冲溶液(pH=3.0,适用于酸性蛋白酶制剂)

称取 4.71 g 乳酸(80%~90%)和 0.89 g 乳酸钠(70%)于 900 mL 水中,搅拌溶解后,用乳酸或乳酸钠调整 pH 至 3.00±0.05,定容至 1 000 mL。

A.3.8.3 硼酸缓冲溶液(pH=10.5,适用于碱性蛋白酶制剂)

称取 9.54 g 硼酸钠、1.60 g 氢氧化钠于烧杯中,加水 900 mL,搅拌至均匀。用盐酸溶液(A.3.6)或氢氧化钠溶液(A.3.5)调整 pH 至 10.5±0.05,定容至 1 000 mL。

A.3.8.4 其他缓冲溶液

生产者和使用者还可以探讨使用表 A.1 中缓冲溶液或其他适用的缓冲体系。

表 A.1 其他缓冲溶液参考配制方法

缓冲体系	参考配制方法
乙酸钠缓冲溶液(pH=4.7)	称取 4.10 g 无水乙酸钠于 900 mL 水中,充分溶解后,加入 3.00 g 冰乙酸。再用盐酸溶液(A.3.6)或氢氧化钠溶液(A.3.5)调整 pH 至 4.7±0.05,水定容至 1 000 mL
磷酸盐缓冲溶液(pH=6.0)	称取 17.9 g 十二水合磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)于 800 mL 水中,充分溶解后,盐酸溶液(A.3.6)调节 pH 至 6.0±0.05,加水定容至 1 000 mL
Tirs 缓冲溶液(pH=8.5)	称取 6.06 g 2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇(Tris 碱)于 800 mL 水中,充分溶解后,盐酸溶液(A.3.6)或氢氧化钠溶液(A.3.5)调节 pH 至 8.5±0.05,加水定容至 1 000 mL

A.3.9 底物溶液(10.0 g/L)

称取 1.00 g 蛋白酶制剂专用酪蛋白底物(精确至 0.001 g)于烧杯中,加入相应的缓冲溶液约 80 mL,置于沸水浴保持 30 min,期间不断搅拌至酪蛋白全部溶解。冷却至室温后转入 100 mL 容量瓶中,盐酸溶液(A.3.6)或氢氧化钠溶液(A.3.5)调节至相应 pH 后,用相应 pH 缓冲溶液定容。此溶液 4 ℃ 保存,有效期为 3 d。使用前重新确认并调整 pH 至规定值。

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,使用前应与以上蛋白酶制剂专用酪蛋白底物进行结果比对。

A.3.10 L-酪氨酸标准储备溶液(100 μg/mL)

称取 0.100 g 经 105 ℃干燥至恒重的 L-酪氨酸(精确至 0.000 1 g)于烧杯中,加入 60 mL 盐酸溶液(A.3.6),充分溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,盐酸溶液定容并摇匀。再吸取 10.00 mL 至 100 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(A.3.7)定容并摇匀。

A.4 分析步骤

A.4.1 标准曲线的绘制

A.4.1.1 L-酪氨酸系列标准工作溶液按表 A.2 配制。

表 A.2 L-酪氨酸系列标准工作溶液

管号	L-酪氨酸标准溶液的浓度 mg/mL	L-酪氨酸标准储备溶液(A.3.9)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

A.4.1.2 分别取 1.00 mL 表 A.2 中标准溶液于玻璃试管中,加入 5.00 mL 碳酸钠溶液(A.3.3)和 1.00 mL 福林试剂使用溶液(A.3.2),振荡混匀,置于 40 ℃±0.2 ℃水浴中反应 20 min,取出冷却至室温。以 0 管为空白,分别采用 10 mm 比色杯测定系列标准工作溶液在 680 nm 处的吸光值。以吸光值为纵坐标,L-酪氨酸的浓度为横坐标,绘制标准曲线。

A.4.1.3 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.4.2 样品的测定

A.4.2.1 待测酶液的制备

称取 1.0 g 蛋白酶制剂样品(精确至 0.000 1 g)。加入 80 mL 相应缓冲溶液,搅拌溶解 30 min,随后转移至 100 mL 容量瓶中,用相应缓冲溶液定容并混匀。移取适量酶液加入相应缓冲溶液稀释到酶活力在 10 U/mL～15 U/mL 之间。

A.4.2.2 测定

A.4.2.2.1 将酪蛋白溶液置于 40 ℃±0.2 ℃恒温水浴中,预热 5 min。

A.4.2.2.2 按表 A.3 程序操作。

A.4.2.2.3 中性蛋白酶如枯草芽孢杆菌 No.1.398 和放线菌 No.166 来源,除标准曲线和样品测定的反应温度和显色温度为 30 ℃±0.2 ℃,其他操作同上。

表 A.3　操作程序

步骤	试管 A(空白)	试管 B(蛋白酶样品,需做 3 个平行试样)
1	加酶液 1.00 mL,40 ℃±0.2 ℃,2 min	加酶液 1.00 mL,40 ℃±0.2 ℃,2 min
2	加三氯乙酸 2.00 mL(摇匀)	加酪蛋白溶液 1.00 mL(摇匀)
3	40 ℃±0.2 ℃,10 min	40 ℃±0.2 ℃,10 min
4	加酪蛋白溶液 1.00 mL(摇匀)	加三氯乙酸 2.00 mL(摇匀)
5	取出静置 10 min,过滤(慢速定性滤纸)	
6	取 1.00 mL 滤液,加入 5.0 mL 碳酸钠溶液,1.0 mL 福林使用溶液,40 ℃±0.2 ℃,显色 20 min	
7	以试管 A 为空白,680 nm 波长处,用 10 mm 比色皿测定试管 B 的吸光度	

A.4.3　计算

样品的酶活力按式(A.1)计算:

$$X_1=\frac{c_1\times V_1\times 4\times n_1}{m_1\times 10} \qquad \cdots\cdots(A.1)$$

式中:

X_1——样品的酶活力,单位为酶活力单位每克(U/g);

c_1——由标准曲线得出的蛋白酶水解产生的 L-酪氨酸的浓度,单位为微克每毫升(μg/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(min)。

计算结果表示至整数。

A.5　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 5%。

附 录 B
（资料性）
蛋白酶活力的测定 紫外分光光度法

B.1 原理

蛋白酶在一定的温度与 pH 条件下，水解酪蛋白或血红蛋白底物生成酪氨酸，加入三氯乙酸终止酶反应，并沉淀未水解的底物，滤液中的酪氨酸使用紫外分光光度计在 275 nm 下进行测定。根据吸光度与酶活力的比例关系计算其酶活力。

不同的蛋白酶制剂其紫外法结果与福林法结果的换算系数不同。如需要，相关方可根据试验结果统计，确定两个方法的换算系数。

B.2 仪器和设备

同 A.2。

B.3 试剂和溶液

同 A.3。

根据蛋白酶不同性质，除 A.3 中使用的酪蛋白底物，也可选用表 B.1 中规定的血红蛋白底物或其他适宜底物。

表 B.1 血红蛋白底物参考配制方法

底物	参考配制方法
血红蛋白	称取 4.0 g 血红蛋白，精确至 0.001 g，加入 100 mL 水后搅拌 10 min。用 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 1.70±0.05。搅拌 10 min 至全部溶解后，0.5 mol/L 乙酸钠溶液调节 pH 至 4.70±0.05，转入 200 mL 容量瓶，水定容并混匀

B.4 分析步骤

B.4.1 求 *K* 值

按福林法的表 A.1 配制不同浓度的 L-酪氨酸标准溶液，然后，直接用紫外分光光度计测定其吸光度（A），并计算 K 值。K 值应在 130～135 范围内，如不符合，需重新配制试剂，进行试验。

B.4.2 待测酶液的制备

同 A.4.2.1。样品稀释液最终的浓度应该在 10 U/mL～20 U/mL 范围之内。

B.4.3 测定

操作同 A.4.2.2 中的取液、反应、静置沉淀，直至过滤。滤液用紫外分光光度计，在 275 nm 波长处，测定其吸光度。

注：如结果不平行，可以考虑将加入三氯乙酸的试样溶液返回到水浴中保温 30 min，然后再测定吸光度。

B.5 计算

从标准曲线上读出样品最终稀释液的酶活力，单位为 U/mL。样品的酶活力按式（B.1）计算

$$X_2 = \frac{A_2 \times V_2 \times n_2 \times 4}{1 \times m_2 \times 10} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (B.1)$$

式中：

X_2——样品的酶活力，单位为酶活力单位每克(U/g)；

A_2——由标准曲线得出的样品最终稀释液的活力，单位为酶活力单位每毫升(U/mL)；

V_2——溶解样品所使用的容量瓶的体积，单位为毫升(mL)；

n_2——稀释倍数；

4——反应试剂的总体积，单位为毫升(mL)；

1——吸取酶液的体积，单位为毫升(mL)；

m_2——样品的质量，单位为克(g)；

10——反应时间，单位为分(min)。

结果保留至整数位。

B.6 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5%。

附 录 C
（资料性）
碱性蛋白酶活力的测定 全自动生化分析法

C.1 原理

蛋白水解酶可以水解 *N*-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-苯丙氨酸对硝基苯胺底物，释放出的黄色的对硝基苯胺，在 405 nm 处产生吸收，通过测定单位时间内吸光度的变化计算酶活力。

C.2 仪器和设备

C.2.1 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（精度 0.3 ℃）和检测系统（可在 405 nm 下连续检测吸光度的变化）。

C.2.2 电子天平：感量为 0.1 mg。

C.2.3 pH 计：精度为 0.01。

C.3 试剂

本方法中所用的水，在未注明其他要求时，应符合 GB/T 6682 中水的规格，所用试剂在未注明其他规格时，均指分析纯。

C.3.1 柠檬酸钠缓冲溶液（50 mmol/L，pH＝6.0）

称取 10.50 g 一水合柠檬酸和 0.74 g 二水合氯化钙于 1 L 容量瓶中，加入 450 mL 水溶解后，加入 5.33 g 氢氧化钠，继续加水至 980 mL 左右。全部溶解后，加入 0.76 g 30％聚氧乙烯月桂醚（Brij L23）。最后使用 4 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0±0.05 后，水定容至刻线。

C.3.2 CHES 缓冲溶液（100 mmol/L，pH＝9.0）

称取 2.07 g CHES（*N*-环己基-2-氨基乙磺酸）于 100 mL 容量瓶中，加入 70 mL 水溶解。再加入 73.5 mg 二水合氯化钙和 76.2 mg 30％ Brij L23（聚氧乙烯月桂醚）。最后使用 4 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.0±0.05 后，水定容至刻线。

C.3.3 底物储备液（50 g/L）

称取 50 mg *N*-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-苯丙氨酸对硝基苯胺底物（精确至 0.1 mg）于 10 mL 烧杯中，加入 1 mL 的二甲基亚砜，搅拌至全部溶解。转移至离心管中避光保存。

C.3.4 底物使用液（0.3 g/L）

移取 120 μL 底物储备液（C.3.3）于 20 mL 容量瓶中，以 CHES 缓冲溶液（C.3.2）定容至刻线并混匀。

C.4 分析步骤

C.4.1 标准曲线的制备

标准储备液：称取一定量的已知活力蛋白酶标准品（精确至 0.1 mg）于 500 mL 的容量瓶中，柠檬酸钠缓冲溶液（C.3.1）溶解并定容得到标准储备液。标准品称取的量要使标准储备液中蛋白酶的活力为

4.7 U/L。

标准曲线的范围宜为 0.12 U/L～0.47 U/L。在此范围之内方法的使用者可以选择 6 个不同的浓度配制标准曲线工作溶液。根据产品特性的不同，方法的使用者可以选择其他的标准曲线范围，标准曲线的相关系数 R^2 应大于 0.994 5。

注：标准储备液和标准工作液应现用现配。

C.4.2 样品溶液的制备

称取一定量的蛋白酶样品，用柠檬酸钠缓冲溶液(C.3.1)溶解及稀释。稀释的倍数应使最终稀释液的酶活力在 0.29 U/L 左右。

样品的最小稀释倍数为 25。

C.4.3 步骤和参数

C.4.3.1 步骤

C.4.3.1.1 将 160 μL 的底物加入到比色杯中。

C.4.3.1.2 底物保温 480 s，温度为 37 ℃。

C.4.3.1.3 分别加入 20 μL 的空白、标准、标准对照品和样品到比色杯中。

C.4.3.1.4 反应 63 s 后开始第一次测量，然后每隔 18 s 测量一次。每个样品共测量 9 个吸光度。

C.4.3.2 参数

C.4.3.2.1 平衡底物

温度：37 ℃；

保温时间：480 s；

底物加量：160 μL。

C.4.3.2.2 酶反应周期

温度：37 ℃；

时间：63 s；

样品：20 μL。

C.4.3.2.3 测定周期

测定模式：动力学法；

波长：405 nm；

曲线类型：非线性；

时间：150 s；

读数：9 次；

间隔：18 s。

C.5 计算

C.5.1 标准曲线的计算

以吸光度的变化速率(OD/min)为纵坐标，蛋白酶标准工作溶液酶活力(U/L)为横坐标绘制标准曲线，标准曲线应为平滑下凹的曲线。

C.5.2 样品酶活力的计算

样品的酶活力按照式(C.1)计算：

$$X_3=\frac{A_3\times V_3\times n_3}{m_3\times 1\ 000} \qquad \cdots\cdots(C.1)$$

式中：

X_3 ——样品的酶活力，单位为酶活力单位每克(U/g)；

A_3 ——由标准曲线得出的样品最终稀释液的活力，单位为酶活力单位每升(U/L)；

V_3 ——溶解样品用的容量瓶体积，单位为毫升(mL)；

n_3 ——稀释倍数；

m_3 ——样品的质量，单位为克(g)；

1 000 ——酶活力单位每毫升和酶活力单位每升的转化系数。

C.5.3 结果的表示

样品的测定结果用算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

C.6 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 5%。

附 录 D
（资料性）
蛋白酶活力的测定 微量比色法

D.1 原理

高温蛋白酶在一定的温度（如 70 ℃）与 pH 条件下，水解底物 *N*-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-苯丙氨酸对硝基苯胺，产生黄色的对硝基苯胺，用分光光度计于波长 414 nm 处测定溶液的吸光度。酶活力与吸光度成比例，由此可以计算产品的酶活力。

D.2 仪器和设备

D.2.1 电子天平：感量为 0.1 mg。

D.2.2 紫外-可见分光光度计，配有 200 μL 微量比色杯。

D.2.3 恒温水浴锅。

D.2.4 pH 计：精度为 0.01。

D.3 试剂和溶液

D.3.1 氢氧化钠溶液（10 mol/L）

称取 40.0 g 氢氧化钠，加水 90 mL 搅拌溶解。冷却至室温后，以水定容至 100 mL。

D.3.2 HEPES 缓冲溶液（0.1 mol/L，pH＝7.5）

称取 5.98 g（精确至 0.1 mg）4-羟乙基哌嗪乙硫磺酸于 200 mL 水中，搅拌溶解后，10 mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 7.5±0.05，再用水定容至 250 mL。

注：生产者和使用者还可以探讨使用其他适用的缓冲体系。

D.3.3 底物储备液（2.0 mmol/L）

称取 10.0 mg *N*-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-苯丙氨酸对硝基苯胺于离心管中，加入 8 mL HEPES 缓冲溶液（D.3.2），密封并避光处理后，在 60 ℃水浴中加热 30 min～90 min。待底物全部溶解后，转移至冰水浴 5 min。此时底物溶液应为半透明均匀液体，如出现溶液变黄，则表明底物已分解，需重新配制。此溶液使用时应保存在冰水浴中。分装后－20 ℃可保存 30 天，不可反复冻融。

D.3.4 蛋白酶标准储备溶液（40 U/mL）

称取适量已知酶活力的蛋白酶标准品，精确至 0.1 mg，用 HEPES 缓冲溶液（D.3.2）溶解后定容至 10 mL。

D.4 分析步骤

D.4.1 底物使用溶液

向底物储备液（D.3.3）中分次加入一定量 HEPES 缓冲溶液（D.3.2），再吸取 20 μL 每次稀释后的底物溶液加入 980 μL HEPES 缓冲溶液，直至混匀后在 313 nm 波长处测定吸光值在 0.38～0.40 之间。

D.4.2 标准曲线的绘制

D.4.2.1 蛋白酶系列标准溶液：按表 D.1 配制。

表 D.1 蛋白酶系列标准溶液

管号	蛋白酶标准溶液的浓度 U/ mL	标准储备溶液(D.3.4)的体积 μL	缓冲溶液(D.3.2)的体积 μL
0	0	0	1 000
1	1.4	35	965
2	1.8	45	955
3	2.4	60	940
4	3.6	90	910
5	4.4	110	890
6	5.8	145	855

D.4.2.2 预热：先将蛋白酶系列标准溶液放入 70 ℃±0.2 ℃恒温水浴中，预热 90 min，使溶液中的其他蛋白酶失活。

D.4.2.3 按表 D.2 程序操作。

表 D.2 操作程序

步骤	试管 A(空白)	试管 B(标准溶液，需做 3 个平行试样)
1	45 μL 蛋白酶系列标准溶液	45 μL 蛋白酶系列标准溶液
2	120 μL 底物溶液	120 μL 底物溶液
3	—	70 ℃±0.2 ℃，准确反应 20 min
4	迅速转移至冰水浴中，保持 2 min	
5	分别吸取 100 μL 至 10 mm 微量比色皿中，以试管 A 为空白，414 nm 处测定试管 B 的吸光度； 以吸光度纵坐标，酶活浓度为横坐标，绘制标准曲线	

D.4.3 样品的测定

D.4.3.1 待测酶液的制备

称取 1.0 g 蛋白酶样品，精确至 0.000 1 g。加入 80 mL 相应缓冲溶液，搅拌溶解不少于 30 min，随后转移至 100 mL 容量瓶中，用相应缓冲溶液定容并混匀。移取适量酶液加入相应缓冲溶液稀释到一定浓度，推荐浓度范围为酶活力 1.5 U/mL～5 U/mL。

D.4.3.2 测定

对于高温蛋白酶样品，测定步骤前先将样品溶液放入 70 ℃±0.2 ℃恒温水浴中，预热 90 min，使溶液中的其他蛋白酶失活。按表 D.3 程序操作。

表 D.3　操作程序

步骤	试管 A(空白)	试管 B(样品溶液,需做 3 个平行试样)
1	45 μL 样品溶液	45 μL 样品溶液
2	120 μL 底物溶液	120 μL 底物溶液
3	—	70 ℃±0.2 ℃,准确反应 20 min
4	迅速转移至冰水浴中,保持 2 min	
5	分别吸取 100 μL 至 10 mm 微量比色皿中,以试管 A 为空白,414 nm 处测定试管 B 的吸光度	

D.4.4　计算

样品的酶活力按式(D.1)计算:

$$X_4 = \frac{A_3 \times V_3 \times n_4}{m_4} \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (D.1)$$

式中:

X_4——样品的酶活力,单位为酶活力单位每克(U/g);

A_3——由标准曲线得出的样品最终稀释液的活力,单位为酶活力单位每毫升(U/mL);

V_3——溶解样品所使用的容量瓶的体积,单位为毫升(mL);

n_4——样品的稀释倍数;

m_4——样品的质量,单位为克(g)。

所得结果表示至整数。

D.5　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 5%。