###

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

酶制剂生理活性评价技术规范

**Technical specifications of physiological activity measure for Enzyme**

（征求意见稿）



发布

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

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

# 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

酶制剂生理活性评价技术规范

1 范围

本标准规定了酶制剂生理活性评价原理、仪器和设备、试剂和材料、析步骤及结果计算。

本标准适用于饲料、食品等酶制剂的生理活性评价。

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，仅所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。

GB 5009.124 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定

GB/T 5009.7 食品安全国家标准 食中还原糖的测定；

GB 5009.168 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定；

中华人民共和国兽药典（2015年版）

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 酶制剂 Enzyme

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，用于食品加工或提高饲料转化率等，具有特殊催化功能的生物制品。

3.2 体外消化模型 In vitro digestion model

通过模拟人或者动物消化生理特点，采用与人或动物体内相近的消化环境和消化酶系，在体外评定外加酶作用或饲料消化吸收的一种方法。

3.3 生理活性 physiological activity

酶制剂在人或动物体内消化环境中，受温度，pH等因素影响所表现出的对底物的消化能力。

3.4 模拟胃消化液 stimulated gastric fluid

模拟人或动物体胃液中的pH、盐离子浓度及蛋白酶浓度设置的消化液。

3.5 模拟肠消化液 stimulated intestinal fluid

模拟人或动物体肠液中的pH、盐离子浓度及胰酶浓度设置的消化液。

4 原理

首先用胃蛋白酶在酸性条件下处理含有酶制剂样品的底物，完成在模拟胃内的消化过程，然后再用含有蛋白酶和脂肪酶的胰酶在中性条件下继续消化，完成养分在小肠内的消化过程，最后分离已消化与未消化养分，通过分析酶制剂对主要底物的转化效率，以达到预测食品或饲料中的酶制剂在体内的生理活性的目的。

5 试剂和材料

5.1 胃蛋白酶

活性大于1:3800 生化级胃蛋白酶（临用前可按《中华人民共和国兽药典》中规定的方法测定胃蛋白酶活性）。

5.2 胰酶

为胰蛋白酶与胰脂肪酶的复合制品，每种酶的酶活性应大于1:3800。

5.3 1M 盐酸溶液

用量筒准确量取 8.18 mL浓盐酸，倒入已经装有60mL蒸馏水的烧杯中，不断搅拌，待冷却后转移到容量瓶中并定容至100 mL。

5.4 1M 氢氧化钠溶液

准确称取4g氢氧化钠试剂溶解于装有60 mL蒸馏水的烧杯中，冷却后，再转移到100 mL的容量瓶中并定容至100 mL。

5.5 胃电解质溶液

3.1 g氯化钠、1.1 g氯化钾、0.15 g氯化钙，0.6 g碳酸氢钠溶解于1 L的去离子水中。

5.6 体外模拟胃液

800 mg 胃蛋白酶加入到 10 mL胃电解质溶液中，混合均匀，用 1 mol/L盐酸溶液调pH值至2.8。

5.7 肠电解质溶液

5.4 g氯化钠，0.65 g氯化钾，0.33 g氯化钙溶解于1 L去离子水中。

5.8 体外模拟肠液

2.0 g 胰酶加入到 10 mL 肠电解质溶液中，混合均匀，用1 mol/L氢氧化钠溶液调pH值至6.5。

6.仪器和设备

6.1 电子分析天平：精度0.001g。

6.2 pH计：精确至0.01。

6.3 恒温生化培养箱：震荡120次/min，温度精度0.1℃。

6.4 秒表。

6.5 移液枪：精度为0.1μL。

7 分析步骤

7.1 称样

固体酶制剂：称取0.05 g，精确到0.0001 g，溶于1 mL模拟胃液中备用；

液体酶制剂：准确量取50 μL，精度0.1 μL，用模拟胃液定容至1 mL，备用。

7.2 体外消化试验：

7.2.1实验组：

胃模拟消化阶段：准确称取1.0 g 食品模拟物（1:1:1，淀粉+大豆油+鸡蛋白）或饲料模拟物（1:1:1，玉米+小麦+豆粕），精确到0.0001 g，放入 50 mL 具塞三角瓶中，将待测酶制剂样品溶液（7.1）置于三角烧瓶中，再加入8 mL胃电解质溶液（5.5），用1 M 盐酸溶液将 pH 值调至2.8，混合均匀后静止10 min，加入1 mL体外模拟胃液（5.6）。混合均匀后放入生化培养箱内，37 ℃振荡消化（120 次/min），消化时间4 h。

小肠模拟消化阶段：在胃模拟消化的样品中再加入9 mL中肠电解质溶液（5.7），用 1 M 氢氧化钠溶液调整转移后液的 pH 值至 6.5。然后加入1 mL体外模拟肠液（5.8）。混合均匀后放放入生化培养箱内，37 ℃振荡消化（120 次/min），消化时间16 h。

7.2.2对照组：

以不加酶制剂，而其它处理与实验组相同的锥形瓶作为对照组。

7.2.3实验空白组：

以不加食品模拟物，而其它处理与实验组相同的锥形瓶作为实验空白组。

7.2.4对照空白组：

以不加食品模拟物，而其它处理与对照组相同的锥形瓶作为对照空白组。

7.3滤液及残渣处理：

消化结束后，将三角烧瓶中的残留物用去离子水完全冲洗到漏斗中过滤。将滤液收集到50 mL 容量瓶中，摇匀，用去离子水定容至50 mL，待用。将过滤后的滤纸及残渣转移培养皿中，待用。

7.4 分析步骤

7.4.1 干物质测定

将残渣及滤纸在65 ℃烘干1 h，称重，再置入烘箱30 min，如此反复烘干至恒重（以2次之差小于0.0005 g为准），最后一次称重即为干物质质量。

7.4.2 游离氨基酸测定

从50 mL容量瓶中取10 mL液滤，过0.22 μm滤膜，按 《GB 5009.124 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》方法进行测试，计算滤液中游离氨基酸含量。

7.4.3 脂肪酸测定

从50 mL容量瓶中取10 mL 滤液，过0.22 μm滤膜，按 《GB 5009.168 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》方法进行测试，计算滤液中脂肪酸的含量。

7.4.4 还原糖测定

从50 mL容量瓶中取10 mL 滤液，过0.22 μm滤膜，按 《GB/T 5009.7 食品安全国家标准 食品中还原糖的测定》方法进行测试，计算滤液中还原糖的含量。

注：7.4.2，7.4.3，7.4.4 所检测的项目根据酶的种类，选择性检测。

8. 结果计算

8.1 干物质消化率的计算

干物质体外消化率按照公式（1）进行计算：

$干物质体外消化率A=100\%-\frac{M\_{1}-M\_{0}}{M}×100\%$ (1)

M——食品模拟物干物质质量（g）；

M1——滤渣干物质质量（g）；

M0——空白组滤渣干物质质量（g）。

8.2 游离氨基酸体外生成率的计算

游离氨基酸体外生成率按照公式（2）进行计算：

$游离氨基酸体外生成率B（\%）=(\frac{P\_{1}-P\_{0}}{M\_{T}}-\frac{P\_{1}^{'}-P\_{0}^{'}}{M\_{T}^{'}})×100\%$ (2)

式中：

MT——实验组食品模拟物干物质质量（g）；

MT′——对照组食品模拟物干物质质量（g）；

P1——实验组滤液中游离氨基酸的含量（g）；

P1′——空白组滤液中游离氨基酸的含量（g）；

P0——实验空白组滤液中游离氨基酸的含量（g）；

P0′——对照空白组滤液中游离氨基酸的含量（g）。

8.3 脂肪酸体外生成率的计算

脂肪酸体外生成率按照公式（3）进行计算：

$脂肪酸体外生成率C=(\frac{F\_{1}-F\_{0}}{M\_{T}}-\frac{F\_{1}^{'}-F\_{0}^{'}}{M\_{T}^{'}})×100\%$ (3)

式中：

MT——实验组食品模拟物干物质质量（g）；

MT′——对照组食品模拟物干物质质量（g）；

F1——实验组滤液中脂肪酸的含量（g）；

F1′——空白组滤液中脂肪酸的含量（g）；

F0——实验空白组滤液中脂肪酸的含量（g）；

F0′——对照空白组滤液中脂肪酸的含量（g）。

8.4 还原糖体外生成率的计算

还原糖体外生成率按照公式（4）进行计算：

$还原糖体外生成率D==(\frac{S\_{1}-S\_{0}}{M\_{T}}-\frac{S\_{1}^{'}-S\_{0}^{'}}{M\_{T}^{'}})×100\%$ (4)

式中：

MT——实验组食品模拟物干物质质量（g）；

MT′——对照组食品模拟物干物质质量（g）；

S1——实验组滤液中还原糖的含量（g）；

S1′——空白组滤液中还原糖的含量（g）；

S0——实验空白组滤液中还原糖的含量（g）；

S0′——对照空白组滤液中还原糖的含量（g）。

8 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。