

ICS 65.120

CCS B46

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—XXXX

饲料添加剂角蛋白酶活力的测定 分光光度法

Determination of keratinase activity in feed additives

—Spectrophotometry

(公开征求意见稿)

20XX—XX—XX 发布

20XX—XX—XX 实施

中华人民共和国农业农村部 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。

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这些专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC76）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院饲料研究所、山东隆科特酶制剂有限公司、福建傲农生物科技集团股份有限公司、广州立达尔生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：丁宏标、钱娟娟、侯玉煌、周盛昌、陶正国、李习龙、乔宇、刘胜利。

饲料添加剂角蛋白酶活力的测定 分光光度法

1 范围

本文件描述了饲料添加剂角蛋白酶活力的分光光度测定方法。

本文件适用于饲料添加剂角蛋白酶产品中酶活力的测定。

本文件定量限为 500 U/g (U/mL)。

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。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

角蛋白酶 keratinase

在规定的时间内、规定的条件下，可以降解羽毛等动植物角蛋白生成氨基酸的蛋白酶。

注：角蛋白酶的鉴别试验见附录A。

3.2

角蛋白酶活力单位 keratinase activity unit

1 g固体酶粉（或1 mL液体酶）在40 ℃、pH 8.0的条件下，以过量的酪蛋白为底物，水解1 min产生1 μg的酪氨酸，即为一个酶活力单位，以U/g或U/mL表示。

4 原理

角蛋白酶在一定的温度和 pH 条件下，水解酪蛋白底物产生含有酚基和吲哚基的氨基酸（如：酪氨酸、色氨酸），用三氯乙酸沉淀后，在碱性条件下，将福林试剂（Folin）还原，生成磷钨钼酸，在680 nm有最大吸收，其颜色的深浅与酚基氨基酸含量成正比。通过分光光度法测定。

5 试剂或材料

除非另有说明，在分析中使用的试剂均为分析纯。

5.1 水：GB/T 6682，三级。

- 5.2 碳酸钠溶液 (0.4 mol/L)：称取无水碳酸钠 (Na_2CO_3) 42.4 g，用水溶解并定容至 1 000 mL。
- 5.3 三氯乙酸溶液 (0.4 mol/L)：称取三氯乙酸 65.4 g，用水溶解并定容至 1 000 mL。
- 5.4 盐酸溶液 (1 mol/L)：取浓盐酸 85 mL，加水稀释并定容至 1 000 mL，混匀。
- 5.5 盐酸溶液 (0.1 mol/L)：取 10 mL 1 mol/L 盐酸溶液 (5.4)，定容至 1 00 mL，混匀。
- 5.6 氢氧化钠溶液 (0.5 mol/L)：取氢氧化钠 20.0 g，用水溶解，冷却至室温后定容至 1 000 mL。
- 5.7 福林 (Folin) 试剂：于 2 000 mL 磨口回流装置中加入钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100.0 g、钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25.0 g、水 700 mL、85%磷酸 50 mL、浓盐酸 100 mL。小火沸腾回流 10 h，取下回流冷却器，在通风厨中加入硫酸锂 50 g，水 50 mL 和数滴浓溴水 (99%)，再煮沸 15 min，以除去多余的溴 (冷却后仍有绿色需再加溴水，再煮沸除去过量的溴)，冷却后加水定容至 1 000 mL。混匀、过滤。试剂应呈金黄色，贮存于棕色瓶内。或购买商品化的福林试剂。
- 5.8 福林工作溶液：以 1 份福林试剂与 2 份水混匀，制成福林工作溶液。
- 5.9 硼酸钠溶液：称取 3.80 g 硼酸钠 (硼砂)，加水溶解并定容至 1 000 mL。
- 5.10 硼酸溶液：称取 12.37 g 硼酸，加水溶解并定容至 1 000 mL。
- 5.11 硼酸缓冲溶液 (pH 8.0)：取 50 mL 硼酸钠溶液 (5.9)，用硼酸溶液 (5.10) 将 pH 调至 8.0 ± 0.05 ，备用。
- 5.12 1.0% 酪蛋白溶液 (pH 8.0)：准确称取酪蛋白 1.000 g，精确至 0.001 g，先用少量 0.5 mL 氢氧化钠溶液 (5.6) 湿润后，再加入 pH 8.0 硼酸缓冲溶液 (5.11) 约 80 mL，在沸水浴中或磁力搅拌器上边加热边搅拌直至完全溶解。冷却后，用 0.1 mol/L 盐酸溶液 (5.5) 或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 (5.6)，将 pH 调至 8.0 ± 0.05 ，并转入 100 mL 容量瓶中，用 pH 8.0 硼酸缓冲溶液 (5.11) 定容至刻度。此溶液在 4 °C 冰箱贮存，有效期为 3 天。
- 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，使用前应与国家药品标准物质酪蛋白 (标物编号 140601) 进行结果比对。
- 5.13 L-酪氨酸标准储备溶液 (1 mg/mL)：精确称取预先于 105 °C 干燥 4h 烘至恒重的 L-酪氨酸标准物质 (纯度 $\geq 95\%$) 0.1 g，精确至 0.000 1 g，用 20 mL 1 mol/L 盐酸溶液 (5.4) 溶解后，再用水定容至 100 mL，混匀。
- 5.14 L-酪氨酸标准工作溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：临用前，准确吸取 10 mL 1 mg/mL L-酪氨酸标准储备溶液 (5.13)，用 0.1 mol/L 盐酸溶液 (5.5) 定容至 100 mL，混匀。
- 5.15 L-酪氨酸标准系列溶液：按表 1 配制。

表 1 L-酪氨酸标准系列溶液

管号	L-酪氨酸标准系列溶液的浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	L-酪氨酸标准工作溶液 (5.14) 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
6	60	6	4

6 仪器设备

- 6.1 分光光度计:波长范围 350 nm~800 nm, 精确度 ± 2 nm。
- 6.2 pH 计: 精度为 0.01 pH 单位。
- 6.3 天平: 感量 0.0001 g 和 0.01 g。
- 6.4 恒温振荡水浴锅(或普通水浴锅): 精度为 ± 0.2 °C。

7 试验步骤

7.1 试样溶液的制备

7.1.1 固体酶试样的制备

称取酶样品 1 g, 精确至 0.000 1 g。加入硼酸缓冲溶液 (5.11) 100 mL, 磁力搅拌提取 30 min, 摇匀, 静置 5 min 后, 取适量上清液, 用硼酸缓冲液 (5.11) 进行二次稀释, 使稀释后的待测酶液中角蛋白酶活力控制在 10 U/mL~15 U/mL 之间。

7.1.2 液体酶试样的制备

根据样品酶活力大小, 吸取适量的液体酶液, 用 pH 8.0 硼酸缓冲溶液 (5.11) 稀释, 稀释后的待测酶液中角蛋白酶活力控制在 10 U/mL~15 U/mL 之间。

7.2 L-酪氨酸标准曲线的绘制

7.2.1 显色反应: 分别准确吸取表 1 中 L-酪氨酸标准系列溶液各 1.0 mL, 于具塞试管中 (每个浓度做 2 个平行), 分别加入 5.0 mL 碳酸钠溶液 (5.2) 和 1.0 mL 福林工作溶液 (5.8), 摇匀。置于 40 °C ± 0.2 °C 水浴中显色 20 min, 取出, 置于冷水中, 迅速冷却至室温, 用 10 mm 比色皿, 以不含酪氨酸的 0 管为空白, 在分光光度计波长 680 nm 处分别测定其吸光度。

7.2.2 标准曲线绘制: 以吸光度 A 为横坐标, 以 L-酪氨酸浓度 c 为纵坐标, 绘制标准曲线, 标准曲线计算公式为 $c=K \times A+b$ 。其 K 值应在 95~105 范围内, 回归系数 R^2 在 0.998 以上时方可使用。如不符合, 需重新配制试剂, 进行试验。

注: L-酪氨酸标准工作溶液应在配制后立即进行测定。

7.3 试样溶液测定

7.3.1 将酪蛋白溶液 (5.12) 置于 40°C ± 0.2 °C 恒温水浴中, 预热 5 min。

7.3.2 吸取 1.00 mL 稀释好的酶液置于 10 mL 试管中, 40°C ± 0.2 °C 水浴 2 min。加入 2.00 mL 三氯乙酸溶液 (5.3), 振荡 3 S, 40°C ± 0.2 °C 保温 10 min。加入 1.00 mL 预热的酪蛋白溶液 (5.12), 混匀。置于室温下静置 10 min, 滤纸过滤。取 1.00 mL 滤液, 加 5.00 mL 碳酸钠溶液 (5.2), 加福林工作溶液 (5.8) 1.00 mL, 40°C ± 0.2 °C 保温 20 min 显色。在 680 nm 波长下, 用 10 mm 比色皿测定吸光度 (A_0)。

7.3.3 吸取 1.00 mL 稀释好的酶液置于 10 mL 试管中, 40°C ± 0.2 °C 水浴 2 min。加入 1.00 mL 预热的酪蛋白溶液 (5.12), 振荡 3 S, 40°C ± 0.2 °C 保温 10 min。加入 2.00 mL 三氯乙酸溶液 (5.3), 混匀。置于室温下静置 10 min, 滤纸过滤。取 1.00 mL 滤液, 加 5.00 mL 碳酸钠溶液 (5.2), 加福林工作溶液 (5.8) 1.00 mL, 40°C ± 0.2 °C 保温 20 min 显色。于 680 nm 波长下, 用 10 mm 比色皿测定吸光度 (A), 通过线性回归方程计算角蛋白酶的活力。

8 试验数据处理

角蛋白酶活力以 X_i 表示，单位为酶活单位每克（U/g）或酶活单位每毫升（U/mL），按式(1)计算

$$X_i = \frac{(c - c_0) \times 4 \times N}{1.0 \times 10} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

c ——样品管 L-酪氨酸的浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$)；

c_0 ——空白管 L-酪氨酸的浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$)；

N ——样品的稀释倍数；

4——酶反应体系总体积, 单位为毫升 (mL)；

1.0——参与反应的酶量, 单位为克或毫升 (g 或 mL)；

10——反应时间, 单位为分钟 (min)。

计算结果保留至整数。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。

9 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大于算术平均值的5%。

附录 A
(资料性)
角蛋白酶的鉴别试验

A.1 羽毛的制备

收集家禽羽毛，蒸馏水清洗干净后，使用 70%的乙醇浸泡 1 小时后，烘干，选取长度约为 5cm 的完整羽毛，待用。

A.2 角蛋白酶对羽毛的体外降解鉴别试验

A.2.1 试剂和材料

A.2.1.1 硼酸钠溶液：称取3.80 g 硼酸钠（硼砂），加水溶解并定容至1 000 mL。

A.2.1.2 硼酸溶液：称取12.37 g硼酸，加水溶解并定容至1 000 mL。

A.2.1.3 硼酸缓冲溶液（pH 8.0）：取50 mL硼酸钠溶液（A.2.1.1），用硼酸溶液（A.2.1.2）将 pH 调至 8.0 ± 0.05 ，备用。

A.2.2 仪器和设备

A.2.2.1 恒温水浴：精度 ± 0.1 °C。

A.2.2.2 试管：25 mm×200 mm。

A.2.3 试验步骤

将长度约为 5 cm 的完整羽毛置于试管中，加入 2 mL 已稀释至 10000 U/mL 的角蛋白酶酶液（依据角蛋白酶标识活力不同进行稀释），加入 8 mL pH 8.0 的硼酸钠-硼酸缓冲液（A.2.1.3），摇匀后于 40°C 的水浴中反应 24h。

对照：以稀释至 10000 U/mL 的中性蛋白酶作为对照。

A.3 结果分析

从水浴锅中取出试管，振荡后，对比观察试管中羽毛的降解情况。当试管中的羽毛发生断裂、破损等视觉可见的变化时，证明该酶可降解羽毛，含有角蛋白酶。反之则证明角蛋白酶含量很低或不含角蛋白酶。

《饲料添加剂角蛋白酶活力的测定 分光光度法》

编制说明（公开征求意见稿）

一、标准制定背景及任务来源

角蛋白酶属于偏碱性的蛋白酶，是一种最新研制的可以降解饲料抗性蛋白的饲用酶制剂。角蛋白酶的生产菌种有细菌、放线菌和真菌。在我国《饲料添加剂品种目录》中，允许用于生产角蛋白酶的菌种只有地衣芽孢杆菌。动物角蛋白及植物抗性蛋白在结构上含有二硫键等类似角蛋白的化学结构，是饲料中主要的抗营养因子。角蛋白酶可以消除抗原蛋白的抗营养作用，改善饲料利用效率。在饲料中添加的效果和意义显著。制定饲料添加剂角蛋白酶活力的测定方法标准，对保护饲料生产使用者的合法权益，保障饲料和养殖产品质量安全具有重要意义。鉴于上述情况提出了该标准的制定工作。

动物对蛋白饲料原料中角蛋白及植物抗原蛋白的消化率偏低，外源添加角蛋白酶，可以提高角蛋白及植物抗原蛋白的生物利用率。Gradisar 等(2000)研究发现大豆粉可代替角蛋白诱导微孢长囊头孢霉菌(*Doratomyces microsporus*)角蛋白酶的合成,可见其角蛋白酶基因的表达对诱导物的特异性要求很低。植物角蛋白在豆粕中含量较高。豆粕是最常用的饲料原料，是畜禽重要的蛋白质营养来源，多年来一直占我国蛋白质饲料原料的 70%以上。豆粕不仅蛋白含量高（约 44%），还具有氨基酸平衡（赖氨酸含量高达 2%以上）、适口性好、消化率高（85%）等特点。但豆粕中含有多种抗营养因子如胰蛋白酶抑制因子、植物凝集素、尿素酶等，这些抗营养因子在大豆的加工过程中通过加热可以失活去除。但加热法无法去除豆粕中热稳定性的抗原蛋白（致敏原）。大豆抗原蛋白会引起仔猪和妊娠母猪、犊牛、雏鸡、养殖鱼类等动物过敏反应，导致小肠绒毛萎缩、隐窝增生，肠内组胺释放量增加等过敏性损伤，进而导致消化吸收障碍和过敏性腹泻等。

角蛋白酶可以降解如角蛋白、酪蛋白、明胶、牛血清白蛋白等可溶的蛋白质。也可以降解包括羽毛、羊毛、角质、人发、指甲等不可溶的蛋白质。在饲料产业中，羽毛等的主要成分是角蛋白，其粗蛋白成分约 80%，氨基酸种类较齐全，是一种可部分替代鱼粉的饲料蛋白来源。我国每年产羽毛几十万吨，部分未得到合理利用。利用角蛋白酶对废弃羽毛的开发、利用具有一定的应用前景，它一方面可解决饲料工业中蛋白资源不足的问题，另

一方面又可解决环境污染问题。

国内外的大量研究发现，饲用角蛋白酶可以有效消除胰蛋白酶抑制因子的作用，提高蛋白原料的利用效率，显著降低粪尿中氮排出量，促进生长；同时也具有降解植物抗原蛋白，消减致敏性，预防食源性腹泻的功能。饲用角蛋白酶被公认为目前唯一能同时有效解决养殖领域中饲料安全、饲料原料缺乏和养殖污染等三大问题的新型饲料添加剂。国际上饲用蛋白酶用量伴随着饲料中豆粕使用量的提高快速增长，是近年来增速最快的饲用酶种。开发利用高活性饲用蛋白酶提高蛋白利用率是饲料产业重大需求。广东希普生物科技股份有限公司开发固体发酵酶解羽毛粉，实现羽毛蛋白原料预消化处理。选用新鲜无污染的动物羽毛经过除杂、灭菌、调节、地衣芽孢杆菌发酵酶解、油水分离、膜分离技术过滤、浓缩、喷雾干燥等工艺处理后，制备而成的具有诱食性好、消化率高的羽毛蛋白肽，用来代替鱼粉、血浆蛋白粉、肠溶膜蛋白原料。通过芽孢杆菌发酵产角蛋白酶可实现羽毛蛋白的预处理。

目前，国内没有统一的角蛋白酶国家或行业标准，在产品质量、检验标准方面均不能统一，给生产企业和客户应用带来不便，同时也带来安全隐患，导致市场上角蛋白酶的质量难以得到保证。因此建立角蛋白酶活性测定标准势在必行。

二、主要工作过程

（一）成立标准编制小组

2016年6月，中国农业科学院饲料研究所等接到《饲料添加剂角蛋白酶活力的测定》标准制定任务后，对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案，并组建了标准编制组。该项目计划编号2016-28-37，该标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

（二）国内外饲料用角蛋白酶活性检测技术相关标准的收集与分析

2016年7月~9月，本标准编制组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定的指导思想，形成了开题报告和标准草案，并制定了初步的实验方案。

通过检索收集国内外相关检测方法和文献资料，包括fcc标准、诺伟司国际标准、国内生产企业检测标准、相关国标、样品提取、净化等前处理方法和仪器检测条件等，综合分析后拟定初步实验方案。作用底物包括酪蛋白、角蛋白，各个条件下分别检测角蛋白酶活性，检查分析测定方法的精确度、可重复性、方便快捷特征。研究的检测方法适用饲料添加剂角蛋白酶。

（三）确定标准制定技术路线，制定原则

2016年10月~2016年12月，中国农业科学院饲料研究所召开了标准开题论证会，会上标准编制组介绍了对国内外相关分析方法的研究，标准修订的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容。

（四）进行论证实验，确定了测定方法的技术指标和相应的试验方法

2017年1月~2019年11月，在查询、收集国内外相关标准、文献和技术资料的基础上，在参照国际和国外先进标准的基础上，结合目前的实际情况，初步确定了标准的制定和相应的试验方法，形成了标准草案。之后，工作组对标准草案反复测定对比后，进行了多次讨论研究，同时请验证单位对标准中采用的试验方法进行了对比验证工作，积累了检验数据。经认真研究分析，完成了标准文本及编制说明的征求意见稿。

2017年1月-11月，完成工作调研；调研单位包括：诺伟司饲料添加剂(上海)有限公司、上海纽崔特饲料科技有限公司、北京挑战生物技术有限公司、华南农业大学、广东省农业科学院动物研究所。

2017年6月~2017年12月，完成收集采购饲料添加剂角蛋白酶样品；完成文献查阅工作，投稿发表综述。

侯玉煌，丁宏标*. 角蛋白酶研究进展及其在饲料工业中的应用. 中国畜牧杂志, 2018, 54(1): 13 ~ 18.

2017年9月~2019年11月，完成了标准文本及编制说明的征求意见稿。完成蛋白酶仔猪养殖试验，确定角蛋白酶可以有效提高仔猪饲料转化效率和生产性能，减少粪便排放，促进生长。发表论文：

侯玉煌，丁宏标. 三种蛋白酶对苏淮断奶仔猪生长性能、营养物质表观消化率和血清生化指标的影响. 动物营养学报, 2018, 5: 51-53.

（五）编写标准征求意见稿

根据有关专家意见，对标准内容进行了补充完善，在此基础上，编写完成了《饲料添加剂角蛋白酶活力的测定 分光光度法》标准及编制说明征求意见稿。

（六）组织方法验证

2018年3月至今，组织3家有资质的检测单位，对标准中的指标检测方法等方面进行验证。汇总相关验证数据后，对数据的合理性进行检验，通过检验的验证数据进行汇总，编

写数据汇总报告和统计汇总报告。

（七）组织专家进行预审

2018年9月，中国农业科学院饲料研究所组织有关专家对其起草的行业标准《饲料添加剂角蛋白酶、碱性蛋白酶活力的测定 分光光度法》（征求意见稿）进行预审，专家组建议将标准文件名称修改为《饲料添加剂角蛋白酶活力的测定 分光光度法》，对标准和编制说明进行补充完善。编制组对专家意见逐项检测分析落实后，修订全部文件，完成3个验证报告。

2021年5月由微生物及酶制剂标准化工作组组织专家对起草修订的行业标准《饲料添加剂角蛋白酶活力的测定 分光光度法》（预审稿）再次进行预审。按照专家组的意见增加了角蛋白酶鉴别试验，增加国内外生产企业酶活力标识值与检测值的相关数据，并对标准和编制说明进行了规范完善。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

（一）标准编制主要原则

标准依据 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写》、GB/T 20000.2-2009《标准化工作指南 第2部分:采用国际标准》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分:化学分析方法》的原则进行修订编制。

起草工作组通过对相关的国内外技术资料的分析，结合我国产品的生产工艺、质量水平及检验水平的实际情况，对本标准中有关内容的确定，主要借鉴参考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》与GB/T 23527-2009《蛋白酶制剂》，结合动物饲料中角蛋白酶应用的实际情况，调查了生产企业标准及国内外相关标准，研究确定了《饲料添加剂角蛋白酶活力的测定 分光光度法》的技术方案、测定原理、测定方法。

（二）目前角蛋白酶国内标准的现状

在企业标准信息公共服务平台上查询一些公司角蛋白酶的企业标准，相关信息见下表1。

表 1 企业标准相关信息

编号	公司	底物	企标编号	主要反应参数
1	诺伟司饲料添加剂 (上海)有限公司	酪蛋白	Q31/0114000100C013	37℃、pH 8.0、 10 min、410 nm
2	青岛根源生物技术集 团有限公司	自制羽毛水解角蛋白	Q/370283GYS 157-2016	50℃、pH 8.0、 10 min、660 nm
3	武汉新华扬生物股份 有限公司	天青角蛋白酶 (sigma:K8500)	Q/XHY 31-2018	37℃、pH 5.5、 10 min、680 nm
4	山东泰山生力源集团 股份有限公司	5%水解角蛋白溶液	Q/370911SLY 036-2020	40℃、pH 8.0、 10 min、680 nm
5	昆明爱科特生物科技 有限公司	酪蛋白	Q/KAK 13-2018	70℃、pH 7.0、 15 min、410 nm
6	潍坊康地恩生物科技 有限公司	5%水解角蛋白溶液	Q/370785KDN 158-2019	40℃、pH 7.5、 10 min、680 nm
7	济南百斯杰生物工程 有限公司	酪蛋白	Q/370126BSJ 019-2020	40℃、pH 10.5、 10 min、680 nm
8	湖南利尔康生物股份 有限公司	酪蛋白	Q/LEKM 012-2019	40℃、pH 10.5、 10 min、680 nm
9	山西大禹生物工程股 份有限公司	酪蛋白	Q/DYSW 034-2019	40℃、pH 10.5、 10 min、680 nm
10	烟台富康生物科技有 限公司	酪蛋白	Q/370611YFK 002-2019	40℃、pH 10.5、 10 min、680 nm

以上企业制定的饲料添加剂角蛋白酶标准中，均明确其发酵菌种来自于地衣芽孢杆菌。

(二) 方法的建立

1 试剂和材料

1.1 底物来源

底物来源见表 2。

表 2 底物来源

底物	来源	货号
天青角蛋白	SIGMA	K8500
酪蛋白	NICBPB 国家药品标准物质	140601

1.2 试验用样品来源

试验样品来源见下表 3。

表 3 试验样品来源

试验样品	标识酶活 (U/g)	来源	试样代号
角蛋白酶	150000	昆明爱科特生物科技有限公司	A
角蛋白酶	100000	济南百斯杰生物工程有限公司	B
角蛋白酶	200000	山东隆科特酶制剂有限公司	C
角蛋白酶	20000	武汉新华扬生物股份有限公司	D
角蛋白酶	200000	宁夏夏盛实业集团有限公司	E
角蛋白酶	100000	河南仰韶生化科技有限公司	F
角蛋白酶	50000	湖南利尔康生物股份有限公司	G

注：为方便检测，前期将各样品进行了统一编号。

3 样品前处理条件的优化

角蛋白酶的存在形式，有的存在于胞内，有的分泌至胞外，采用磁力搅拌与缓冲液研磨提取法对样品进行酶提取。通过实验选择合适的提取方式，通过梯度稀释确立酶液反应最适浓度。通过上述方式来最终确定最佳提取条件和检测方法。

3.1 提取条件的确定

选取三种样品 C/D/E，分别在室温用磁力搅拌的方式与研磨的方式进行提取检测。磁力搅拌方式：称取 1 g 角蛋白酶加入 100 mL pH 8.0 硼酸-硼酸钠缓冲液，在室温下进行磁力搅拌提取 30 min；研磨提取方式：称取 1 g 角蛋白酶，用 pH 8.0 硼酸-硼酸钠缓冲液进行研磨转移定容至 100 mL 容量瓶中，静置 5 min 后取上清液。分别测定酶活，对比数据见表 4。

表4 磁力搅拌与研磨提取的酶活测定值

样品	不同提取方式酶活 (U/g)		相对偏差 (%)
	磁力搅拌 30 min	缓冲液研磨	
C	109574	119970	6.40
D	10768	10329	2.94
E	153900	160582	4.16

从检测结果看，磁力搅拌 30 min 与研磨提取 RSD 值在 2.94%~6.40%，相差不大。综合考虑研磨与磁力搅拌的利弊后，采用磁力搅拌的方式更有利于多个样品的同时处理。故对固体产品采用磁力搅拌提取的时间进行进一步确认。

分别称取 1 g 角蛋白酶 C 样品，加入 100 mL 缓冲液于室温下，用磁力搅拌的方式进行提取 10min、20min、30 min、40min、50min、60min，然后分别测定酶活，数据见下表 5。

表5 磁力搅拌提取时间的酶活测定值

磁力搅拌时间	不同提取时间酶活 (U/g)
10 min	95246
20 min	107451
30 min	107984
40 min	107689
50 min	107629
60 min	105764

从检测结果看磁力搅拌 20 min 基本可确保将产品中的酶提取出来，考虑到饲料添加剂产品包埋的情况，为确保提取的充分性及提取的时效性，最终确定采用磁力搅拌 30 min 进行酶的提取。

3.2 角蛋白酶测定底物的确定

文献中关于角蛋白酶的测定底物有 2 种。一种是以酪蛋白为底物来测定角蛋白酶的活性。这种方法在国内外饲料、食品、工业用酶制剂产品测定方法中广泛使用，是最通用的方法。另外一种以天青角蛋白(α -角蛋白)为底物，中国医学科学院皮肤病研究所据此申请

了“红色毛癣菌角蛋白酶活性的测定方法”发明专利；济南诺能生物工程有限公司申请了“角蛋白酶的酶活检测方法”发明专利。江南大学研究发现，对角蛋白酶(ker)基因进行定点突变并重组表达的角蛋白酶对天青角蛋白的比酶活较野生型增加了 50%。同时突变体较野生型角蛋白酶具有更好的羊毛织物防毡缩效果。文献对比表明，以天青角蛋白(α -角蛋白)为底物的研究主要用于人类和动物的皮肤病致病菌致病力研究，是一个古老的医学研究方向内容。纺织工业中用此类 α -角蛋白酶于羊毛织物防毡缩效果和皮革软化生产。

从市场上购置了两个厂家最有代表性的标准品底物，确定不同底物对测定的影响。具体信息见表 6。

表 6 底物来源

底物	来源	货号
天青角蛋白	SIGMA	K8500
酪蛋白	NICBPB 国家药品标准物质	140601

Sigma 公司的天青角蛋白为蓝色丝状物，将其按照武汉新华扬企业标准中要求的条件用 GB23527 的方法进行溶解。发现天青角蛋白不溶于水及缓冲液，即使煮沸且 pH 达到 12 的碱性缓冲溶液仍不能溶解。经查相关的文献，角蛋白酶在不溶解的角蛋白无法做到检测的稳定性。故放弃使用角蛋白酶作为测定方法。中国农业科学院北京畜牧兽医研究所张铁鹰实验室采用的角蛋白测定方法，参照 H. Gradislar á S. Kern á J. Friedrich. Keratinase of *Doratomyces microspores*. *Appl Microbiol Biotechnol* (2000) 53: 196-200. 测定方法。产酶微生物为微孢长囊头孢霉菌 (*Doratomyces microspores*) 是一种致病性皮肤真菌类的微生物。这类微生物还有红色毛癣菌、鸡禽毛癣菌等，均是致病菌，禁止在饲料、食品中应用，也不能应用于饲料添加剂的生产过程。

天津工业大学纺织学院王江波、刘建勇发表的《羊毛角蛋白的溶解与再利用》文章中指出“还原法是目前溶解羊毛的主要方法，切断羊毛中二硫键完整地保留角蛋白的一级结构，是目前角蛋白还原水解的主要方法，但也使得制得的角蛋白溶液不稳定。”，不稳定的角蛋白溶液无法进行标准化。虽然市售有水解角蛋白溶液，但其不是水溶性角蛋白，而是角蛋白分解后的短肽溶液。且来源不同的角蛋白，其含有的短肽成分不尽相同，导致不同厂家生产的水解角蛋白溶液检测存在差异，故本标准排除水解角蛋白溶液作为底物。

本标准选取酪蛋白为底物，符合目前底物溶解的需求，且从表 3 可以看出，目前国内

饲料酶制剂生产企业大部分采用以酪蛋白为底物进行检测，更有利于本标准在酶制剂行业中的推广。为确保酪蛋白检测结果的稳定性及可重复性，分别对 B/C/D/E 五个样品进行三次检测，测定结果见表 7。

表 7 酪蛋白底物测定酶活结果

底物	NICPBP 国家药品标准物质酪蛋白			平均值	RSD/%
样品	三次测定酶活 (U/g)				
B	79248	81265	80594	80369	1.28
C	106250	112684	105987	107107	0.88
D	10329	9983	10457	10256	2.39
E	157520	154658	149524	153900	2.63

从表 7 中可以发现，选用酪蛋白为底物，延用了其他蛋白酶测定的方法，方法经长期使用，已验证了其稳定性与可靠性。

3.3 pH 确定依据

角蛋白酶的最适反应 pH 以中性到碱性居多，一般为 7 到 10 之间。而地衣芽孢杆菌生产的角蛋白酶为碱性角蛋白酶。根据文献报道，致病性微生物分泌的角蛋白酶，在 pH6.5-7.5 均有较强活性，可以破坏食道和胃肠道的完整性，降解保护性粘膜，导致食道和胃肠的炎症和溃疡。在仔猪小肠中十二指肠、空肠、回肠部位内容物 pH 值分别为 5.5-6.5、6.0-7.8、7.6-8.2，内容物糜蛋白酶活性分别为 20-35、41-97、22-58U/g 蛋白质，内容物胰蛋白酶活性分别为 3.4-4.8、3.1-17.6、2.6-9.3U/g 蛋白质（佟莉蓉等，2009），食糜中蛋白质的消化吸收主要在小肠发生。实验发现，pH8.0 角蛋白酶主要在小肠中十二指肠、空肠、回肠部位发挥生物活性，降解未能够消化的抗性蛋白和肽类，作用效果与仔猪生长性能成正相关。表 8 为检测样品 B 在 40℃不同 pH 下角蛋白酶酶活力变化表。

表 6 40℃不同 pH 下角蛋白酶酶活力变化表

pH	酶活力百分比%
6.0	25.39
6.5	46.32
7.0	64.20

7.5	71.31
8.0	78.03
8.5	83.23
9.0	83.23
9.5	90.87

续表 6 40℃不同 pH 下角蛋白酶活力变化表

pH	酶活力百分比%
10.0	94.37
10.5	100.00
11.0	106.16
11.5	102.87
12.0	101.49
12.5	88.96

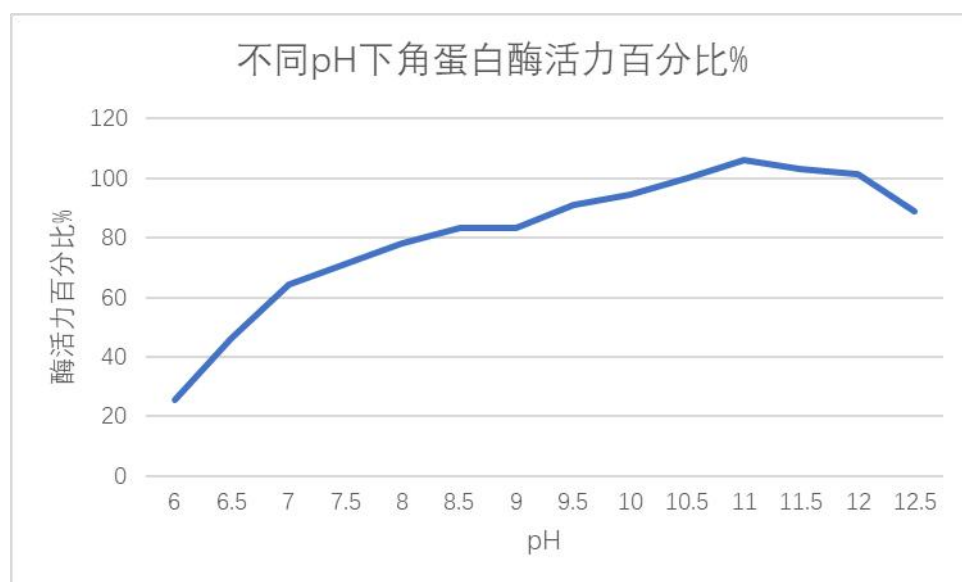


图 1 不同 pH 下角蛋白酶活力百分比

从检测结果看 pH 值在 8.5-12.5 检测的角蛋白酶活性较高。同时依据检测方法测定原理要求，角蛋白酶水解底物产生含有酚基的氨基酸，在碱性条件下，能将福林试剂 (Folin)

还原，生成钼蓝与钨蓝，其颜色的深浅与酚基氨基酸含量成正比。故 pH 需确保碱性。

根据角蛋白酶在动物饲料中应用的特点及动物肠道 pH，综合地衣芽孢杆菌产角蛋白酶偏碱性的特性，研究后确定角蛋白酶的测定 pH 设定为 8.0，而非活性测定最高的 pH 11.0。

3.4 温度确定依据

结合动物肠道温度、常规蛋白酶检测温度，分别选取 37℃、40℃两个反应温度，两温度不同 pH 条件下样品 C 酶活性的检测数值见表 8。

表 8 37℃和 40℃条件下不同 pH 值时酶活性的测定值

pH 值	40℃不同 pH 下检测结果				
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	平均值	RSD/%
7.0	106619	107685	105563	106622.3333	0.995105
7.5	132901	130295	134203	132466.3333	1.502215
8.0	155325	151110	151995	152810	1.454453
8.5	171427	170318	173895	171880	1.06529
9.0	192233	188996	190309	190512.6667	0.85458
9.5	207766	201715	205547	205009.3333	1.493162
10.0	232362	226473	228275	229036.6667	1.317466
10.5	242330	237447	244753	241510	1.540883
pH 值	37℃不同 pH 下检测结果				
	实验室 1	实验室 2	实验室 3	平均值	RSD/%
7.0	86472	85339	87510	86440.33333	1.25618
7.5	106619	104274	106370	105754.3333	1.217952
8.0	117367	114984	116248	116199.6667	1.026023
8.5	146201	143596	141473	143756.6667	1.647291
9.0	163103	160615	161491	161736.3333	0.78029
9.5	170873	157812	171812	166832.3333	4.690898
10.0	185889	183805	188031	185908.3333	1.136617
10.5	201235	194174	198834	198081	1.812501

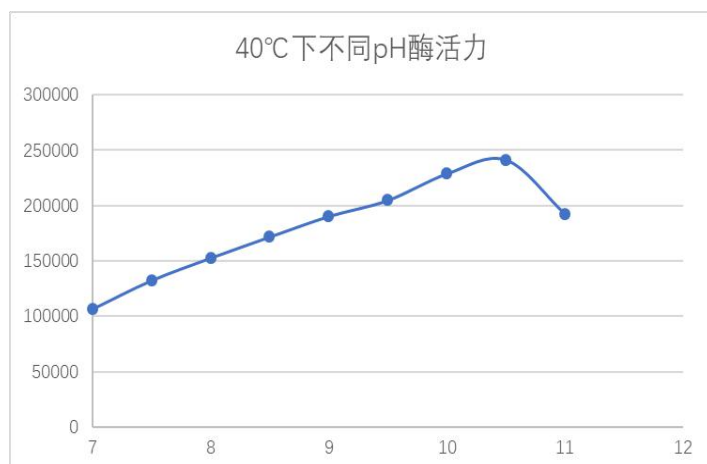


图2 40°C下不同pH值酶活力曲线

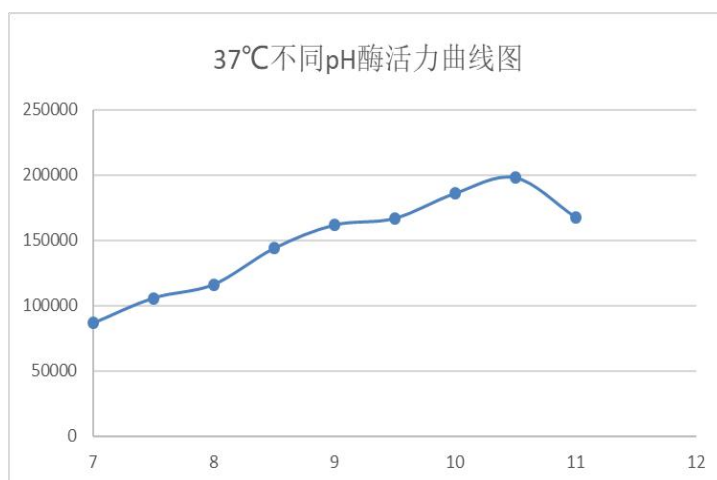


图3 37°C下不同pH值酶活力曲线

根据畜禽肠道温度特征，及37°C、40°C条件下角蛋白酶的活性测定结果，考虑到角蛋白酶在家禽中的应用效果显著，应用量大，家禽的肠道温度主要为40°C，最终确定检测温度为40°C。

3.5 不同厂家产品检测结果

依据确定好的检测条件（酪蛋白为底物，40°C，pH 8.0，反应10min，680nm波长下检测），对不同厂家的样品进行检测，检测结果见下表9。

表9 试验样品来源

试样来源	标识酶活 (U/g)	企业标准反应参数	本标准检测结果 (U/g)
昆明爱科特生物科技有限公司	150000	酪蛋白、70℃、pH 7.0、15 min、 410 nm	153450
济南百斯杰生物工程有限公司	100000	酪蛋白、40℃、pH 10.5、10 min、 680 nm	80776
山东隆科特酶制剂有限公司	200000	酪蛋白、70℃、pH 10.5、10 min、 410 nm	109970
武汉新华扬生物股份有限公司	20000	天青角蛋白、37℃、pH 5.5、10 min、680 nm	9642
宁夏夏盛实业集团有限公司	200000	酪蛋白、40℃、pH 10.5、10 min、 680 nm	152882
湖南利尔康生物股份有限公司	50000	酪蛋白、40℃、pH 10.5、10 min、 680 nm	32572

因不同厂家检测条件不尽相同，各厂家生产的角蛋白酶酶学特性存在差异，故标识与本标准检测结果存在差异。

（三）主要内容

1. 术语和定义

本标准在充分调查了解饲料添加剂角蛋白酶产品特点的基础上，制订适合其特性的质量标准。充分考虑了各种影响角蛋白酶活性的因素，各项技术指标切合实际，可发挥该标准的最大作用。

术语和定义按照 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，参考相关生产企业的角蛋白酶产品标准和规则确定。技术指标根据产品的检测数据确定。

1.1 角蛋白酶

在规定的时间内、规定的条件下，可以降解羽毛等动植物角蛋白生成氨基酸的蛋白酶。

1.2 角蛋白酶活力单位 keratinase activity unit

1 g 固体酶粉（或 1 mL 液体酶）在 40 ℃、pH 8.0 的条件下，以过量的酪蛋白为底物，

水解 1 min 产生 1 μg 的酪氨酸，即为一个酶活力单位，以 U/g 或 U/mL 表示。

2 原理

常用测定角蛋白酶的原理是以底物水解后释放的氨基酸的量来确定角蛋白酶的活性。测定角蛋白酶的方法采用国内外比较一致意见的经典福林酚法测定酶活力，此为目前国内生产及预生产企业一致采用的方法。

经过查阅资料，调研专家，调查生产企业标准及国内外相关标准，研究确定《饲料添加剂角蛋白酶活力的测定》的技术方案、测定原理、测定方法套用国家标准 GB 1886.174-2016 食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂的方法方案。

角蛋白酶在一定的温度和 pH 条件下，水解酪蛋白底物产生含有酚基和吡啶基的氨基酸（如：酪氨酸、色氨酸），用三氯乙酸沉淀后，在碱性条件下，将福林试剂（Folin）还原，生成磷钨钼酸，在 680 nm 有最大吸收，其颜色的深浅与酚基氨基酸含量成正比。通过分光光度法测定。

3 试剂或材料

除非另有说明，在分析中使用的试剂均为分析纯。

3.1 水：GB/T 6682，三级。

3.2 碳酸钠溶液（0.4 mol/L）：称取无水碳酸钠（ Na_2CO_3 ）42.4g，用水溶解并定容至 1 000 mL。

3.3 三氯乙酸溶液（0.4 mol/L）：称取三氯乙酸 65.4 g，用水溶解并定容至 1 000 mL。

3.4 盐酸溶液（1 mol/L）：取浓盐酸 85 mL，加水稀释并定容至 1 000 mL，混匀。

3.5 盐酸溶液（0.1 mol/L）：取 100 mL 1 mol/L 盐酸溶液（5.4），定容至 1 000 mL，混匀。

3.6 氢氧化钠溶液（0.5mol/L）：取氢氧化钠 20 g，用水溶解并定容至 1 000 mL，即为 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液。

3.7 福林（Folin）试剂：于 2 000 mL 磨口回流装置中加入钨酸钠（ $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）100.0 g、钼酸钠（ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）25.0 g、水 700 mL、85%磷酸 50 mL、浓盐酸 100 mL。小火沸腾回流 10 h，取下回流冷却器，在通风厨中加入硫酸锂 50 g，水 50 mL 和数滴浓溴水（99%），再煮沸 15 min，以除去多余的溴（冷却后仍有绿色需再加溴水，再煮沸除去过量的溴），

冷却后加水定容至 1 000 mL。混匀、过滤。试剂应呈金黄色，贮存于棕色瓶内，保质期室温一年。或购买商品化的福林试剂。

3.8 福林 (Folin) 工作溶液：以 1 份福林试剂与 2 份水混匀，制成福林工作溶液。

3.9 硼酸钠溶液：称取 3.80 g 硼酸钠（硼砂），加水溶解并定容至 1 000 mL。

3.10 硼酸溶液：称取 12.37 g 硼酸，加水溶解并定容至 1 000 mL。

3.11 硼酸缓冲溶液 (pH8.0)：取 50 mL 硼酸钠溶液 (3.9)，用硼酸溶液 (3.10) 调整 pH 至 8.0 ± 0.05 ，备用。

3.12 1.0% 酪蛋白溶液 (pH 8.0)：准确称取酪蛋白 1.000 g，精确至 0.001 g，先用少量 0.5 mL 氢氧化钠溶液 (3.6) 湿润后，再加入 pH 8.0 硼酸缓冲溶液 (3.11) 约 80 mL，在沸水浴中或磁力搅拌器上边加热边搅拌直至完全溶解。冷却后，用 0.1 mol/L 盐酸溶液 (3.5) 或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 (3.6)，将 pH 调至 8.0 ± 0.05 ，并转入 100 mL 容量瓶中，用 pH 8.0 硼酸缓冲溶液 (3.11) 定容至刻度。此溶液在 4 °C 冰箱贮存，有效期为 3 天。

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，使用前应与国家药品标准物质酪蛋白（标物编号140601）进行结果比对。

3.13 L-酪氨酸标准储备溶液 (1 mg/mL)：精确称取预先于 105 °C 干燥至恒重的 L-酪氨酸标准物质 (纯度 $\geq 95\%$) 0.1 g，精确至 0.0001 g，用 20 mL 1 mol/L 盐酸溶液 (3.4) 溶解后，再用水定容至 100 mL，混匀。储于 4 °C 冰箱中，保质期 3 天。

3.14 L-酪氨酸标准工作溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：临用前，准确吸取 10 mL 1mg/mL L-酪氨酸标准储备溶液 (3.15)，0.1 mol/L 盐酸溶液 (3.5) 定容至 100 mL，混匀。

3.15 L-酪氨酸标准系列溶液：按表10 配制。

表 10 L-酪氨酸标准系列溶液

管号	酪氨酸标准系列溶液的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	L-酪氨酸标准工作溶液 (3.14) 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
6	60	6	4

4 仪器设备

4.1 分光光度计：波长范围 350 nm~800 nm，精确度±2nm。

4.2 pH 计：精度为 0.01 pH 单位。

4.3 天平：感量 0.0001 g 和 0.01 g。

4.4 恒温振荡水浴锅(或普通水浴锅)：精度为±0.2 °C。

5 试验步骤

5.1 试样溶液的制备

5.1.1 固体酶试样

称取酶样品 1 g，精确至 0.000 1 g。加入硼酸缓冲溶液（5.11）100 mL，磁力搅拌提取 30 min，摇匀，静置 5 min 后，取适量上清液，用硼酸缓冲液（3.11）进行二次稀释，使稀释后的待测酶液中角蛋白酶活力控制在 10 U/mL~15 U/mL 之间。

5.1.2 液体酶试样

根据样品酶活力大小，吸取适量的液体酶液，用 pH 8.0 硼酸缓冲溶液（3.11）稀释，稀释后的待测酶液中角蛋白酶活力控制在 10 U/mL~15 U/mL 之间。

5.2 L-酪氨酸标准曲线的绘制

5.2.1 显色反应：分别准确吸取上述 L-酪氨酸标准系列溶液各 1 mL，于具塞试管中（每个浓度做 2 个平行），分别加入 5.0 mL 碳酸钠溶液（3.2）和 1.0 mL 福林使用溶液（3.8），摇匀。置于 40 °C±0.2 °C 水浴中显色 20 min，取出，置于冷水中，迅速冷却至室温，用 10 mm 比色皿，以不含酪氨酸的 0 管为空白，在分光光度计波长 680 nm 处分别测定其吸光度。

5.2.2 标准曲线绘制：以吸光度 A 为横坐标，以 L-酪氨酸浓度 c 为纵坐标，绘制标准曲线（此线应通过零点），标准曲线计算公式为 $c=K \times A+b$ 。其 K 值应在 95~105 范围内，回归系数 R^2 在 0.998 以上时方可使用。如不符合，需重新配制试剂，进行试验。

注：L-酪氨酸标准工作溶液应在配制后立即进行测定。

5.3 试样溶液测定

5.3.1 将酪蛋白溶液（3.12）置于 40°C±0.2°C 恒温水浴中，预热 5 min。

5.3.2 吸取 1.00 mL 稀释好的酶液置于 10 mL 试管中，40°C±0.2°C 水浴 2 min。加入 2.00

mL 三氯乙酸溶液 (3.3)，振荡 3 S，40℃±0.2℃保温 10 min。加入 1.00 mL 预热的酪蛋白溶液 (3.12)，混匀。置于室温下静置 10 min，滤纸过滤。取 1.00 mL 滤液，加 5.00 mL 碳酸钠溶液 (3.2)，加福林工作溶液 (3.8) 1.00 mL，40℃±0.2℃保温 20 min 显色。在 680 nm 波长下，用 10 mm 比色皿测定吸光度 (A_0)。

5.3.3 吸取 1.00 mL 稀释好的酶液置于 10 mL 试管中，40℃±0.2℃水浴 2 min。加入 1.00 mL 预热的酪蛋白溶液 (3.12)，振荡 3 S，40℃±0.2℃保温 10 min。加入 2.00 mL 三氯乙酸溶液 (3.3)，混匀。置于室温下静置 10 min，滤纸过滤。取 1.00 mL 滤液，加 5.00 mL 碳酸钠溶液 (3.2)，加福林工作溶液 (3.8) 1.00 mL，40℃±0.2℃保温 20 min 显色。于 680 nm 波长下，用 10 mm 比色皿测定吸光度 (A)，通过线性回归方程计算角蛋白酶的活力。

6 试验数据处理

角蛋白酶活力以 X_i 表示，单位为酶活单位每克 (U/g) 或酶活单位每毫升 (U/mL)，按式(1)计算

$$X_i = \frac{(c - c_0) \times 4 \times N}{1.0 \times 10} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

c ——样品管L-酪氨酸的浓度，单位为($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

c_0 ——空白管L-酪氨酸的浓度，单位为($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

N ——样品的稀释倍数；

4——酶反应体系总体积，单位为毫升 (mL)；

1.0——参与反应的酶量，单位为毫升 (mL)；

10——反应时间，单位为分钟 (min)。

计算结果保留至整数。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。

7 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大于算术平均值的 5%。

(四) 标准曲线的线性范围确定

参考蛋白酶测定国标初步设定后，试验确定。以 0 ~ 60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内的标准

曲线吸光度数值, 配制方法见表 11, L-酪氨酸标准溶液的浓度与吸光度的检测数据见表 12。

表 11 L-酪氨酸标准溶液配制方法

管号	L-酪氨酸标准溶液的浓度 $c/(\mu\text{g/mL})$	取 L-酪氨酸标准溶液的体积 V/mL	加水的体积 V/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
6	60	6	4

表 12 吸光度测定值

浓度 $/(\mu\text{g/mL})$	吸光度 $/A$	回归方程	相关系数平方 $/R^2$
0	0 (以此为空白调 0)	$y = 99.912x + 0.2261$	0.9998
10	0.096		
20	0.194		
30	0.299		
40	0.402		
50	0.499		
60	0.596		

以吸光值为横坐标, 以 L-酪氨酸浓度为纵坐标绘制标准曲线, 见图 4。

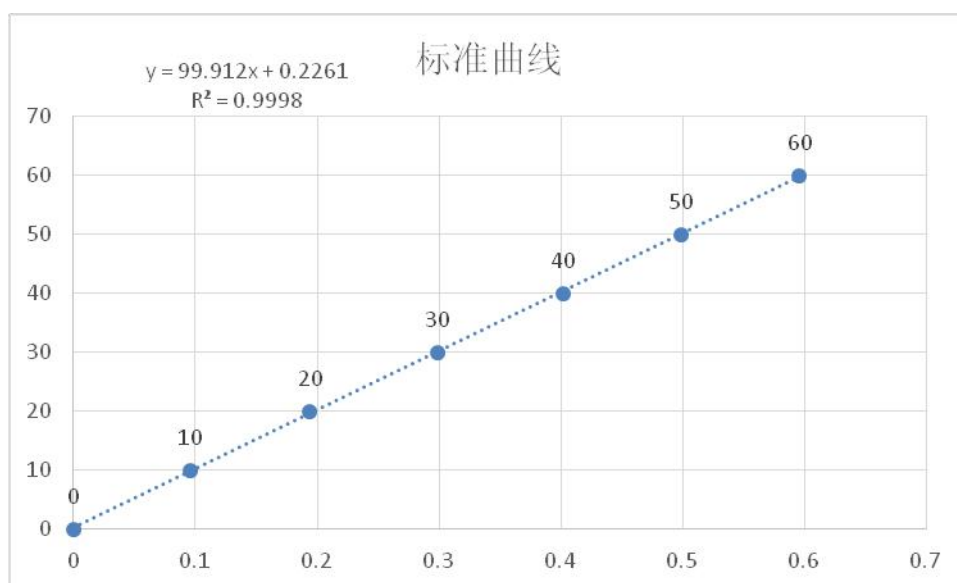


图 4. 标准曲线图

根据上表，当吸光值在 0~ 0.6 之间时，L-酪氨酸浓度的量在 0~60.0 $\mu\text{g/mL}$ ，符合检测线性要求。当吸光度低于 0.2 或高于 0.4 时，其检测结果会存在较大误差。

同一样品 C 在不同酶浓度条件下，其吸光度值不用，测定结果的对比见表 13。

表 13 不同酶浓度测定酶活力数据

稀释倍数	吸光度	酶活 (U/g)
3333	0.608	80250
4166	0.541	89265
5882	0.425	99116
7142	0.367	104091

续表 13 不同酶浓度测定酶活力数据

稀释倍数	吸光度	酶活 (U/g)
8333	0.325	107250
14285	0.274	108504
30769	0.103	125501
66666	0.052	137280

从检测结果看，随 OD 值的升高，测定酶活力降低。在 0.27-0.36 之间测定的酶活力准确度较高。酶制剂一般以 OD 值在 0.2-0.4 范围较准确，故选在 10-15u/mL 的加标量。

2 标准曲线准确性测定结果

以 pH8.0 的缓冲液来稀释 L-酪氨酸标准溶液，分别测定 5 次，测定后数据见表 14。

表 14 pH 8.0 时的参数测定

标准曲线序号	浓度 / ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度 / A	回归方程	相关系数平方 / R^2
1	0	0	$y=102.25 \times x - 0.4109$	0.9998
	10	0.100		
	20	0.206		
	30	0.305		
	40	0.403		
	50	0.507		
	60	0.598		
2	0	0	$y=101.84 \times x - 0.2466$	0.9999
	10	0.105		
	20	0.199		
	30	0.296		
	40	0.392		
	50	0.495		
	60	0.592		
3	0	0	$y=101.44 \times x - 0.185$	0.9999
	10	0.103		
	20	0.200		
	30	0.296		
	40	0.394		
	50	0.498		
	60	0.592		
4	0	0	$y=101.87 \times x - 0.2565$	0.9998
	10	0.103		
	20	0.200		
	30	0.296		

	40	0.394		
	50	0.498		
	60	0.588		
5	0	0	$y=101.55 \times x - 0.1894$	0.9999
	10	0.101		
	20	0.200		
	30	0.296		
	40	0.399		
	50	0.495		
	60	0.590		

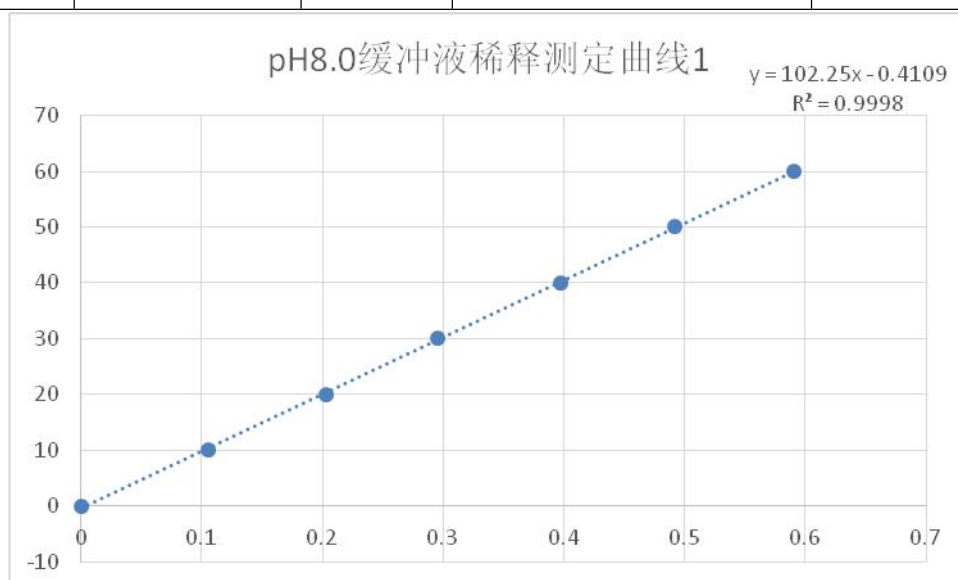


图 5. pH8.0 缓冲液稀释标准曲线 1

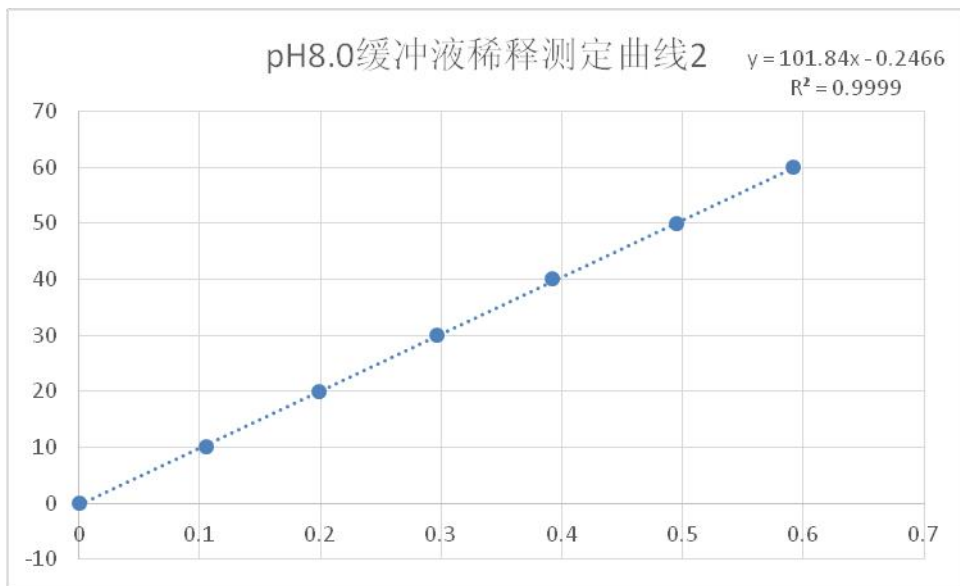


图 6. pH8.0 缓冲液稀释标准曲线 2

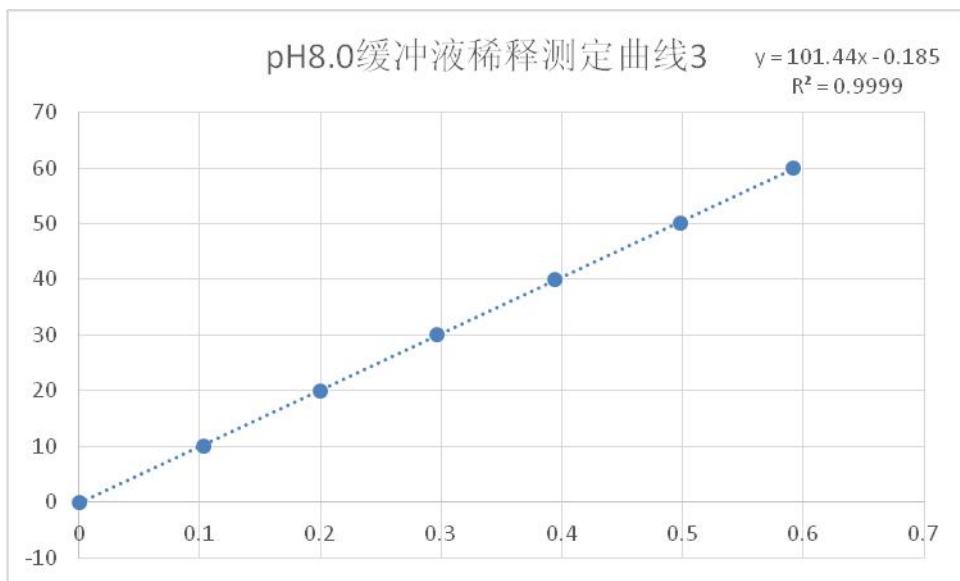


图 7. pH8.0 缓冲液稀释标准曲线 3

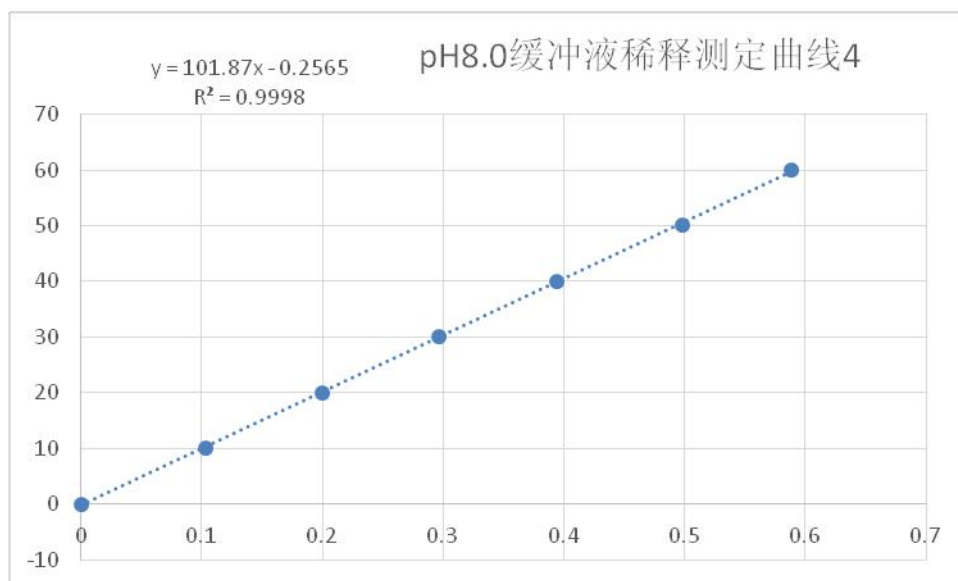


图 8. pH8.0 缓冲液稀释标准曲线 4

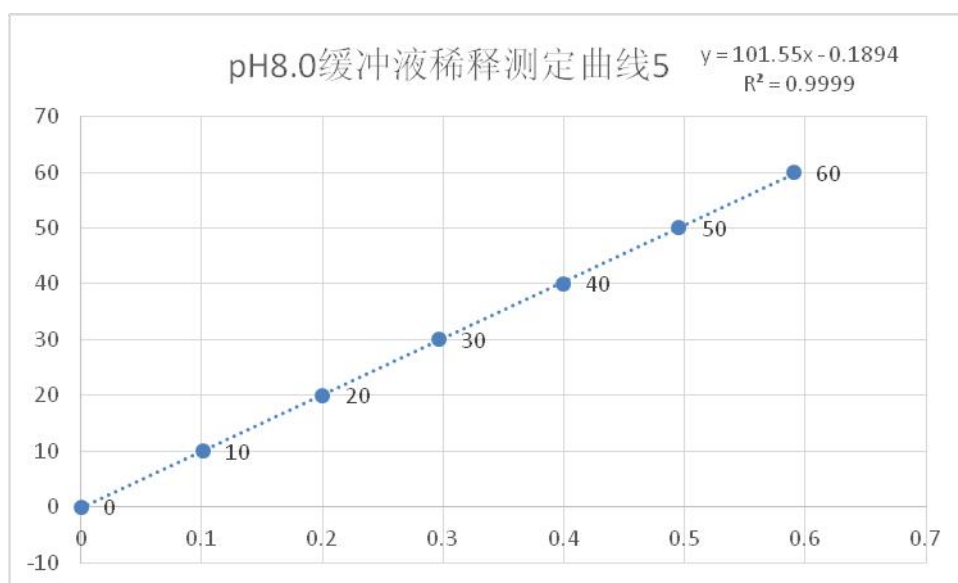


图 9. pH8.0 缓冲液稀释标准曲线 5

pH8.0 条件下标准曲线的相关系数平方/ r^2 均 ≥ 0.9998 ，标准曲线准确性很好，符合检测需求。

3 底物的储存条件及储存时间

考虑到酪蛋白的营养较丰富，不适宜常温储存，故采用较常用的 4℃冰箱冷藏。将 1.0% 的酪蛋白标准溶液配制好以后，将其放置在 4℃冰箱冷藏储存不同时间，分别测定不同储存时长下检测样品酶活测定值的变化，试验结果见表 15。

表 15 底物溶液不同储存时间下测定的酶活

储存方式及储存时间	现配现测 (U/g)	4℃冷藏			变异系数 (%)
		酶活 (U/g)			
		3 天	4 天	5 天	
空白吸光度	0.083	0.089	0.095	0.112	13.19
B	82056	80056	75126	70512	6.73
C	106859	102512	92658	79358	12.79
D	10359	10089	8658	6599	19.29
E	153572	145382	132598	118965	11.00

可以看出,当储存时间增长时,空白吸光值随着储存时间的增长而逐渐变大,同时酶活测定值也受空白影响逐步降低。依据检测结果,4℃冰箱冷藏可3天内可确保产品检测的准确性,当超过3天后,会造成检测结果不准确。

4 检出限 (LOD) 和定量限确定 (LOQ)

以扣除空白值后的吸光度为0.01相对应的浓度值为检出限,以3.3倍检出限浓度作为定量限,其测定值的相对标准偏差(RSD)约为4%。分别按公式(2)和公式(3)计算:

$$LOD = \frac{0.01 - a}{b \times V} \dots\dots\dots (2)$$

$$LOQ = 3.3 \times LOD \dots\dots\dots (3)$$

式中:

LOD — 检出限, $\mu\text{g/mL}$;

LOQ — 定量限, $\mu\text{g/mL}$;

a — 标准曲线的截距;

b — 标准曲线的斜率;

V — 试样的体积, mL 。

分别按不同时间段测的标准曲线分别计算检出限和定量限,结果见表16。

表 16 pH=8.0 处的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 计算结果

标准曲线序号	浓度 / (μg/mL)	吸光度 / A	回归方程	LOD		LOQ	
				μg/mL	mg/L	μg/mL	mg/L
1	0	0	$y = 102.25 \times x - 0.4109$ $r^2 = 0.9998$ $a = -0.4109$ $b = 102.25$	0.004116	4.116	0.013582	13.582
	10	0.100					
	20	0.206					
	30	0.305					
	40	0.403					
	50	0.507					
	60	0.598					
2	0	0	$y = 101.84 \times x - 0.2466$ $r^2 = 0.9999$ $a = -0.2466$ $b = 101.84$	0.002520	2.520	0.008316	8.316
	10	0.105					
	20	0.199					
	30	0.296					
	40	0.392					
	50	0.495					
	60	0.592					
3	0	0	$y = 101.44 \times x - 0.185$ $r^2 = 0.9999$ $a = -0.185$ $b = 101.44$	0.001922	1.922	0.006342	6.3426
	10	0.103					
	20	0.200					
	30	0.296					
	40	0.394					
	50	0.498					
	60	0.592					
4	0	0	$y = 101.87 \times x - 0.2565$ $r^2 = 0.9998$ $a = -0.2565$	0.002616	2.616	0.008632	8.6328
	10	0.103					
	20	0.200					
	30	0.296					

	40	0.394	b = 101.87				
	50	0.498					
	60	0.588					
5	0	0					
	10	0.101	y=101.55 × x -				
	20	0.200	0.1894				
	30	0.296	r ² = 0.9999	0.001964	1.964	0.006481	6.4812
	40	0.399	a=-0.1894				
	50	0.495	b = 101.55				
	60	0.590					

按重复检测的标准曲线分别计算检出限和定量限，结果见表 13。检出限以最低稀释倍数下（一般最小 25 倍，如倍数太小则研磨溶解不完全），OD 吸光度值控制在 0.25 左右，低于 0.25 存在活力不准确的情况，计算所得的值。即添加量在 10 U / g 或 U / mL 所对应的 OD 值，计算活力为 250 U / g 或 U / mL。

根据标准在实际使用中的考虑，将角蛋白酶检出限定为 250 U / g 或 U / mL，定量限定为 500U / g 或 U / mL。

5 精密度试验结果

取不同含量的角蛋白酶样品和蛋白酶样品按“试样的前处理”项下处理，分别测定 5 次，测定结果见表 17。试验结果表明，诺伟司样品标示酶活为 25000 U/g，测定的相对标准偏差（RSD）为 1.47%，角蛋白酶样品杰富宝样品标示酶活为 175 U/g，隆科特固体样品标示酶活为 120000 U/g，液体（隆科特样品），标示酶活为 105000 U/L，测定的相对标准偏差（RSD）在 0.54% ~3.35%，方法的精密度高，符合饲料添加剂检验对精密度的要求。

表 17 方法的精密度试验结果(每个酶样品 5 个平行样)

试样	测定结果（酶活性）		RSD
	/U/g		
	平均值		%

	1	2	3	4	5		
A	152571	154540	154359	153386	153159	153603	0.54
B	81254	78935	83156	80569	79965	80776	1.96
C	107868	110403	111147	110403	110031	109970	1.13
D	10125	9534	8965	9365	10256	9649	5.57
E	155820	149568	152684	156984	149356	152882	2.28
F	105257	106680	103212	104575	105257	104996	1.20
G	186	202	171	196	176	186	7.01

6 回收率试验结果

为了考察方法准确度，分别按“6.2.试样的前处理”和“6.2.试样的测定”项下处理，对 B/C/D/E/F 角蛋白酶样品进行了加标回收率试验，采用 4 个不同水平的添加量，每个水平平行测定 3 次，并对验证的试样进行了测定。试验结果见表 18。测定结果表明，确定 10-20 u/mL 的加标量都符合检测要求。但酶制剂一般以 OD 值在 0.2-0.4 范围较准确，故选在 10-15u/mL 的加标量。

表 18 方法的加标回收率试验结果 (n=3)

试样	实际加标量	计划加标量/ (U/mL)	测得平均值 (U/mL)	稀释倍数	测定 OD 值	计算酶活力	RSD /%
B	5.39	5.00	91333	22222	0.102	91636 89818 92545	1.52
					0.100		
					0.103		
	10.79	10.00	83683	11111	0.226	82168 84895 83986	1.34
					0.232		
					0.230		
	16.79	15.00	91270	7142	0.419	92049 91465 90296	0.74
					0.417		
					0.413		
	21.59	20.00	89315	5555	0.523	88558 89239 90148	0.67
					0.526		

					0.530		
C	5.25	5.00	73536	20000	0.090 0.091 0.091	72657 73475 73475	0.65
	10.49	10.00	95224	10000	0.233 0.232 0.237	94816 94406 96452	1.14
	15.75	15.00	111563	6666	0.409 0.412 0.410	111199 112017 111473	0.37
	20.99	20.00	109644	5000	0.535 0.537 0.540	109167 109576 110189	0.47
D	5.16	5.00	8783	2000	0.108 0.105 0.111	8738 8492 8983	2.81
	10.33	10.00	10586	1000	0.268 0.258 0.254	10913 10504 10340	2.79
	15.72	15.00	10537	657	0.395 0.387 0.398	10582 10367 10663	1.45
	20.66	20.00	10242	500	0.502 0.508 0.496	10242 10364 10119	1.20

续表 18 方法的加标回收率试验结果 (n=3)

试样	实际加标量	计划加标量/ (U/mL)	测得平均值 (U/mL)	稀释倍数	测定 OD 值	计算酶活力	RSD /%
E	5.04	5.00	132348	31250	0.107	135255	1.44

					0.109	137812	
					0.106	133977	
	10.23	10.00	161385	15384	0.259	162223	1.62
					0.253	158448	
					0.261	163482	
	15.75	15.00	159301	10000	0.389	158619	0.53
					0.390	159028	
					0.393	160255	
	20.48	20.00	161440	7692	0.510	160077	0.74
					0.517	162279	
					0.516	161964	
F	5	5.00	111460	23529	0.119	113385	1.50
					0.116	110499	
					0.116	110498	
	10.6	10.00	122770	11111	0.269	121709	0.93
					0.271	122618	
					0.274	123981	
	15.32	15.00	122324	7692	0.392	122954	0.68
					0.387	121381	
					0.391	122639	
	20.03	20.00	119763	5882	0.498	119522	0.72
					0.503	120725	
					0.496	119041	

检测结果表明本方法具有较好的灵敏度、准确度和精密度。

7 试样测定

为了考察方法适用性，按修订后的标准方法对角蛋白酶进行了测定，每个平行测定 3 份。相对标准偏差小于 3%。测定结果见表 19。

表 19 试样测定结果 (n=3)

试样代号	酶活力测定结果 / (u/g)			平均结果 / (u/g)	RSD / %
	1	2	3		
B	89723	90335	89634	89897	0.43
C	212870	210636	211334	211613	0.54
D	10913	10504	10340	10586	2.79
E	160077	162279	161964	161440	0.74
F	121709	122618	123981	122770	0.93

注：采用的样品标识酶活力及试样代号代表厂家见表 3。

对建立的角蛋白酶活性检测方法的提取效率、底物有效性、检测能力进行评价，获得方法的准确度达到 95%-105%之间，相对标准偏差<4%。完成了将方法在科研院所、检测中心 3 家实验室进行验证，进行统计分析以评价方法的性能和适用性，形成了最终方法研究及验证报告。

（五）验证实验

根据标准复审要求，本标准科研院所、检测中心等三家单位进行了方法验证。三家单位的验证结果满意，验证报告见附件。

（六）标准定向征求意见

完成起草方法标准的征求意见稿并撰写标准编制说明，将标准文本发送到各类检测实验室包括饲用角蛋白酶生产厂家诺伟司饲料添加剂(上海)有限公司、上海纽崔特饲料科技有限公司、北京挑战生物技术有限公司等，广泛征求意见。请 40 位专家对征求意见稿进行审查，在根据征求意见稿修改和实验验证的基础上，完善方法标准，形成标准送审稿。

（七）标准预审

待进行。

（八）标准终审

待进行。

四、采用国际标准

因角蛋白酶目前无国际标准，本标准中角蛋白酶的测定方法参考了 FCC 细菌蛋白酶测定方法，参考了诺伟司饲料添加剂(上海)有限公司国际标准。

五、与现行法律法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。

本标准是在广泛调研参考国内外相关标准及征求生产企业、用户和业内专家意见的基础上制定而成，制定的测定方法科学、合理，具有良好的操作性，与现行饲料工业相关基础标准、法律法规相一致，能很好地服务于饲料工业的发展。本标准制定的饲料添加剂角蛋白酶活力的测定方法科学可靠。参考标准为：

GBT 28715-2012 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定 分光光度法。

GB/T 23527-2009 蛋白酶制剂

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

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧。

七、标准作为强制性或推荐性标准的意见

作为推荐性标准发布。

八、贯彻标准的要求和措施建议

该标准为新标准，正常颁布实施。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。