МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 11815— 2015

МОЛОКО

Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента

(ISO 11815:2007, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» на основе собственного перевода на русский языка англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 29 мая 2015 г. № 77-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 июня 2015 г. № 625-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 11815—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 11815:2007 «Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента» («Milk — Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets», IDT).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© ISO, 2007 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2015, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения ... 1
2 Нормативные ссылки ... 1
3 Термины и определения ... 1
4 Сущность метода ... 2
5 Реактивы ... 2
6 Химическая посуда, приборы и оборудование ... 3
7 Отбор проб ... 4
8 Приготовление анализируемой пробы ... 4
8.1 Жидкий сычужный фермент ... 4
8.2 Порошкообразный сычужный фермент ... 4
9 Проведение анализа ... 4
9.1 Приготовление субстрата ... 4
9.2 Приготовление растворов контрольных образцов сычужных ферментов ... 5
9.3 Приготовление рабочих растворов контрольных образцов сычужных ферментов теленка и взрослой особи ... 5
9.4 Приготовление анализируемого раствора сычужного фермента ... 5
9.5 Свертывание ... 5
10 Расчет и выражение результатов ... 6
10.1 Расчет ... 6
10.2 Выражение результатов ... 7
11 Прецизионность ... 7
11.1 Межлабораторные испытания ... 7
11.2 Повторяемость ... 7
11.3 Воспроизводимость ... 8
12 Протокол анализа ... 8
Приложение А (справочное) Межлабораторные испытания ... 9
Библиография ... 9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам ... 10

Введение

Говяжьи сычужные ферменты (телят и взрослых особей) содержат в различных количествах основные молокосвертывающие ферменты: химозин и говяжий пепсин. Каждый из этих ферментов имеет свои собственные характеристики, такие как молокосвертывающая активность и свойства, необходимые для сыроделия. Наиболее явным различием между данными ферментами является более четко выраженная зависимость молокосвертывающей активности говяжьего пепсина от величины pH. Важным является знание общей молокосвертывающей активности конкретного вида фермента, которая установлена относительно контрольного образца известного состава и известной молокосвертывающей активности, признанных на международном уровне.

Настоящий метод известен как испытание на относительную молокосвертывающую активность (акроним: REMCAT).

Количественное определение шести наиболее распространенных молокосвертывающих ферментов проводилось в соответствии с IDF 110B. Для смесей молокосвертывающих ферментов, содержащих ферменты, отличные от химозина и говяжьего пепсина, не представляется возможным проведение достоверного определения общей молокосвертывающей активности проб.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО

Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента

Milk. Determination of total milk-clotting activity of bovine rennet

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента, который содержит только химозин и говяжий пепсин в качестве активных коагулирующих ферментов, применительно к контрольному молочному субстрату при pH = 6,5.

С целью получения результатов, удовлетворяющих критериям прецизионности, при применении данного метода анализируемые пробы из неизвестного источника должны быть подвергнуты проверке на отсутствие основных молокосвертывающих ферментов неговяжьего происхождения. Для этого используется соответствующий метод (например, описанный в [1]).

Настоящий стандарт может быть применим для определения общей молокосвертывающей активности химозина, произведенного путем ферментации.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения).

ISO 648 Laboratory glassware — One-mark pipettes (Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной меткой)

ISO 1042 Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks (Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой)

IDF 110B:1997 Calf rennet and adult bovine rennet — Determination of chymosin and bovine pepsin contents (Chromatographic method) [Сычужный фермент теленка и сычужный фермент взрослой особи. Определение содержания химозина и говяжьего пепсина (хроматографический метод)]

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **общая молокосвертывающая активность** (total milk-clotting activity): Величина активности, установленная относительно первой партии порошкообразного международного контрольного образца сычужного фермента теленка и первой партии порошкообразного контрольного образца сычужного фермента взрослой особи (коровы или быка), соответственно.

Примечания

1 Для первой партии контрольного образца порошкообразного сычужного фермента как теленка, так и взрослой особи, активность определена на уровне 1000 Международных молокосвертывающих единиц на грамм (IMCU/r). Для последующего приготовления контрольных образцов активность будет устанавливаться относительно предыдущих контрольных образцов.

Издание официальное

2 Общая молокосвертывающая активность порошкообразных контрольных образцов сычужных ферментов теленка и взрослой особи составляет приблизительно 1000 IMCU/г, но их точная активность приведена в акте о проведении анализа.

3 Общую протеолитическую (молокосвертывающую) активность данных порошкообразных контрольных образцов сычужных ферментов теленка (или взрослой особи) проверяют каждые два года альтернативным методом, например, с использованием субстрата синтетического гексапептида (NIZO[1)]).

4 Сущность метода

Определяют время, необходимое для наблюдения признаков коагуляции контрольного молочного субстрата, приготовленного с применением раствора хлорида кальция массовой концентрации 0,5 г/дм^3 (pH ≈ 6,5). Период времени, необходимый для свертывания молока при внесении пробы сычужного фермента, сравнивают со временем, необходимым для свертывания молока при использовании контрольного образца, при этом химические и физические условия испытаний должны быть идентичны, и контрольный образец должен иметь известную молокосвертывающую активность и тот же ферментный состав, что и проба (его определяют при помощи метода в IDF 110B).

5 Реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической степени чистоты и дистиллированную или деминерализованную воду, либо воду эквивалентной чистоты.

5.1 Буферный раствор, pH = 5,5

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 с 10,0 г тригидрата ацетата натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) пипеткой (6.1) добавляют 10,0 см^3 уксусной кислоты (CH_3COOH) молярной концентрацией 1 моль/дм^3 и перемешивают. Раствор доводят до метки водой. При необходимости регулируют pH на уровне 5,5 ед. pH, добавляя уксусную кислоту или тригидрат ацетата натрия.

5.2 Исходный раствор хлорида кальция, *c* ($CaCl_2$) = 500 г/дм^3

Растворы хлорида кальция требуемой массовой концентрации 500 г/дм^3 и установленной плотности имеются в продаже[2)]. Растворы хранят в условиях, установленных изготовителем.

Исходный раствор хлорида кальция перед использованием должен иметь температуру от 18 °С до 22 °С. Концентрацию раствора проверяют ежегодно путем титрования ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислотой).

5.3 Рабочий раствор хлорида кальция, *c* ($CaCl_2$) = 0,5 г/дм^3

Плотность исходного раствора хлорида кальция (5.2) используют при вычислении массы, необходимой для получения нужного количества рабочего раствора хлорида кальция массовой концентрацией 0,5 г/дм^3.

Масса 2,00 см^3 исходного раствора с точной требуемой концентрацией $c(CaCl_2)$ = 500 г/дм^3 равна приблизительно 2,70 г.

В мерной колбе с одной меткой вместимостью 2000 см^3 взвешивают 2,70 г исходного раствора хлорида кальция (5.2) с точностью 0,01 г, с точно известной концентрацией при температуре 18 °С — 22 °С. Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хлорида кальция должен быть свежеприготовленным, т. е. приготовленным в день использования.

Взвешивание исходного раствора хлорида кальция (5.2) проводят с целью правильного приготовления рабочего раствора, поскольку вязкий раствор с трудом отбирается пипеткой.

В качестве альтернативы допускается приготовление промежуточного раствора хлорида кальция концентрацией 50 г/дм^3, который в дальнейшем перед использованием будет подвергаться разбавлению.

5.4 Молоко сухое низкотемпературного сгущения, с низким содержанием жира, подвергнутое распылительной сушке, имеющее высокое качество, а также способности реагировать на сычужные ферменты и высокое бактериологическое качество.

[1)] Нидерландский институт исследований в области молочной продукции (NIZO), PO Box 20, 6710 BA Ede, Нидерланды. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не накладывает обязательств со стороны разработчика применять данную продукцию.

[2)] Адрес заказа: Chr. Hansen A/S, 1-27 Jemholmen, 2650 Hvidovre, Дания (факс: +45 36 86 77 76). Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не накладывает обязательств со стороны разработчика применять данную продукцию.

Примечание — Сухое молоко низкотемпературного сгущения, с низким содержанием жира, подвергнутое распылительной сушке, удовлетворяющее указанным требованиям, доступно в продаже[1), 2)].

5.5 Порошкообразный контрольный образец сычужного фермента теленка[3)], в пакетиках, масса порошка в пакетике приблизительно 2,7 г. Порошок содержит более 98 % химозина и менее 2 % говяжьего пепсина, что соответствует ферментной активности, определенной в соответствии с IDF 110B.

Точное значение общей молокосвертывающей активности указано в акте о проведении анализа. Оно должно быть равно 1000 IMCU/г.

Порошкообразный контрольный образец сычужного фермента теленка — это первичный контрольный образец. Может быть приготовлен и использован вторичный жидкий образец, если будет установлено, что обеспечивается получение аналогичных результатов.

Порошкообразный контрольный образец сычужного фермента теленка хранят в темноте при температуре минус 18 °С в условиях защиты от влаги. В течение коротких периодов времени (например, при транспортировании) его допускается хранить при комнатной температуре.

5.6 Порошкообразный контрольный образец сычужного фермента взрослой особи[3)], в пакетиках, масса порошка в пакетике приблизительно 2,7 г. Порошок содержит менее 2 % химозина и более 98 % говяжьего пепсина, что соответствует ферментной активности, определенной в соответствии с IDF 110B.

Точное значение общей молокосвертывающей активности указано в акте о проведении анализа. Оно должно быть равно 1000 IMCU/г.

Порошкообразный контрольный образец сычужного фермента взрослой особи — это первичный контрольный образец. Может быть приготовлен и использован вторичный жидкий образец, если будет установлено, что обеспечивается получение аналогичных результатов.

Порошкообразный контрольный образец сычужного фермента взрослой особи хранят в темноте при температуре минус 18 °С в условиях защиты от влаги. В течение коротких периодов времени (например, при транспортировании) его допускается хранить при комнатной температуре.

6 Химическая посуда, приборы и оборудование

Используют обычные химическую посуду, лабораторные приборы и оборудование и, в частности, нижеприведенные.

6.1 Микропипетка или любая другая пипетка, со скоростью истекания 0,5 $см^3$ менее чем за 1 с, с повторяемостью 0,2 % или ниже.

6.2 Пипетки с одной меткой по [2] требуемой вместимости.

В качестве альтернативы для разбавления сычужных ферментов можно использовать разбавитель (например, разбавитель Hamilton), имеющий аналогичную высокую точность. Для дозирования субстрата можно также использовать шприц или дозатор, с требуемой скоростью истекания и повторяемостью 0,4 %.

6.3 Колбы мерные с одной меткой по ISO 1042 требуемой вместимости.

6.4 Термометр поверенный, градуированный, с диапазоном измерения от 20 °С до 45 °С, с погрешностью ± 0,1 °С.

6.5 pH-метр, имеющий погрешность измерения ± 0,01 ед. pH.

6.6 Весы аналитические с погрешностью взвешивания ± 1 мг.

6.7 Секундомер с погрешностью измерения времени ± 1 с.

6.8 Колбы или пробирки для проведения анализа на свертывание молока подходящей вместимости (см. 6.9.1 и 9.5.1).

6.9 Баня водяная с терморегулятором, обеспечивающая поддержание температуры (32,0 ± 0,2) °С.

Водяная баня должна быть оснащена нижеперечисленными приспособлениями:

6.9.1 Мотор электрический с вращающимся валом, к которому можно прикреплять колбы или пробирки (6.8). Вал должен вращаться под углом примерно 30° по отношению к поверхности воды в водяной бане.

[1)] Адрес заказа: Chr. Hansen A/S, 1-27 Jemholmen, 2650 Hvidovre, Дания (факс: +45 36 86 77 76). Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не накладывает обязательств со стороны разработчика применять данную продукцию.

[2)] Национальный институт сельскохозяйственных исследований, Франция, относится к Молочной экспериментальной станции, BP 94, 39800 Poligny, Франция. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не накладывает обязательств со стороны разработчика применять данную продукцию.

[3)] AMAFE. Адрес заказа: Chr. Hansen A/S, 1-27 Jemholmen, 2650 Hvidovre, Дания (факс: +45 36 86 77 76). Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не накладывает обязательств со стороны разработчика применять данную продукцию.

Примечание — В настоящем методе скорость вращения не является важным фактором. Приемлемая скорость вращения — от 2 до 4 оборотов в минуту.

6.9.2 Лампа электрическая, эффективно освещающая колбу или пробирку (6.8).

С целью облегчения определения момента коагуляции в колбе или пробирке, связанного со свертыванием молока, можно использовать экран с темным фоном, помещенный в водяную баню.

7 Отбор проб

В лабораторию необходимо доставить представительную пробу. Она не должна быть повреждена или изменена в процессе транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемые методы отбора проб приведены: для жидких сычужных ферментов (8.1) — в [1], раздел 9, для порошкообразных сычужных ферментов (8.2) — в [1], раздел 13.

Анализируемые пробы хранят в темноте при температуре от 0 °С до 5 °С.

8 Приготовление анализируемой пробы

8.1 Жидкий сычужный фермент

Анализируемую пробу перемешивают путем взбалтывания, не допуская образования пены. Перед приготовлением анализируемого раствора сычужного фермента (9.4) температуру пробы доводят до 18 °С—22 °С.

Жидкий сычужный фермент — вязкий. При отборе пробы пипеткой следует использовать правильную технику отбора. Для концентрированных сычужных ферментов точные разбавления получают посредством взвешивания проб на аналитических весах и расчета их объема (в кубических сантиметрах) путем деления массы на плотность используемого сычужного фермента.

8.2 Порошкообразный сычужный фермент

Анализируемую пробу тщательно перемешивают с целью получения однородного порошка. Перед приготовлением анализируемого раствора сычужного фермента (9.4) температуру пробы доводят до 18 °С—22 °С.

Примечания

1 Следует принять во внимание, что порошкообразные продукты могут легко расслаиваться.

2 Следует принять во внимание количество отбираемой пробы. Как правило, пробы массой от 3 до 5 г являются достаточными, однако в случаях, когда анализируют неоднородные пробы или требуется получение весьма точных результатов, для анализа используют пробы большего объема (например, 10 г).

9 Проведение анализа

Анализ проб и контрольных образцов проводят при идентичных химических и физических условиях.

Следует учесть, что различия в условиях, которые могут повлиять на процесс свертывания, такие как значение pH, буферность раствора или концентрация соли в разведенном сычужном ферменте, могут привести к получению результатов с заметными отклонениями.

9.1 Приготовление субстрата

В мерную колбу (6.3) вместимостью 1000 см^3 помещают 1000 см^3 рабочего раствора хлорида кальция (5.3). В химическом стакане вместимостью 2000 см^3 взвешивают (110,0 ± 0,1) г сухого молока низкотемпературного сгущения с низким содержанием жира, подвергнутого распылительной сушке (5.4). Затем в стакан к сухому молоку добавляют 100 см^3 рабочего раствора хлорида кальция (5.3). Перемешивают вручную для получения однородной массы. К содержимому стакана добавляют оставшийся объем рабочего раствора хлорида кальция. Полученный субстрат перемешивают при помощи магнитной мешалки в течение 30 мин, не допуская образования пены.

Субстрат выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин.

Субстрат хранят при комнатной температуре не более 4 ч или в холодильнике в течение 24 ч.

Значение pH приготовленного субстрата не регулируют, оно должно составлять 6,50 ед. pH.

9.2 Приготовление растворов контрольных образцов сычужных ферментов

9.2.1 Раствор контрольного образца сычужного фермента теленка

Во избежание попадания влаги до открытия пакетика с порошкообразным контрольным образцом сычужного фермента теленка (5.5) доводят его температуру до 18 °С—22 °С.

Пакетик открывают и взвешивают (2,500 ± 0,001) г порошкообразного контрольного образца сычужного фермента теленка, который затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 (6.3). Добавляют от 15 до 20 см^3 буферного раствора (5.1) и с целью растворения порошка перемешивают путем взбалтывания, не допуская образования пены. Доводят объем до метки буферным раствором (5.1) и вновь тщательно перемешивают.

9.2.2 Раствор контрольного образца сычужного фермента взрослой особи

Раствор готовят в соответствии с 9.2.1, используя вместо порошкообразного контрольного образца сычужного фермента теленка (5.5) порошкообразный контрольный образец сычужного фермента взрослой особи (5.6).

9.3 Приготовление рабочих растворов контрольных образцов сычужных ферментов теленка и взрослой особи

9.3.1 Рабочий раствор контрольного образца сычужного фермента теленка

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 (6.3) помещают 3 см^3 раствора контрольного образца сычужного фермента теленка (9.2.1), отобранные пипеткой (6.2). Доводят объем буферным раствором (5.1) до метки и тщательно перемешивают.

При этом коэффициент разбавления равен 333,33. Время свертывания молока под действием рабочего раствора контрольного образца сычужного фермента теленка должно быть в диапазоне от 350 с до 550 с.

Хранят рабочий раствор контрольного образца сычужного фермента теленка при комнатной температуре в течение 24 ч. Допускается хранить рабочий раствор при температуре от 0 °С до 5 °С в течение 2 сут.

9.3.2 Рабочий раствор контрольного образца сычужного фермента взрослой особи

Раствор готовят в соответствии с 9.3.1, используя вместо раствора контрольного образца сычужного фермента теленка (9.2.1) раствор контрольного образца сычужного фермента взрослой особи (9.2.2).

Коэффициент разбавления будет равен 333,33. Время свертывания молока под действием рабочего раствора контрольного образца сычужного фермента взрослой особи должно быть в диапазоне от 350 с до 550 с.

Приготовленный рабочий раствор контрольного образца сычужного фермента взрослой особи хранят при комнатной температуре в течение 24 ч. Допускается хранить рабочий раствор при температуре от 0 °С до 5 °С в течение 2 сут.

9.4 Приготовление анализируемого раствора сычужного фермента

Из приготовленной анализируемой пробы (8.1 или 8.2) отбирают требуемое количество пробы (для жидких проб — от 3 до 5 см^3, для порошкообразных проб — от 3 до 5 г). Пробу для анализа разбавляют буферным раствором (5.1) до получения анализируемого раствора со временем свертывания, близким времени свертывания рабочим раствором контрольного образца сычужного фермента теленка или взрослой особи (9.3.1 или 9.3.2), с допустимым отклонением ± 40 с. Записывают конечный коэффициент разбавления анализируемого раствора, т. к. он будет использован в расчетах (10.1).

9.5 Свертывание

9.5.1 В сухую колбу или пробирку (6.8) пипеткой (6.2) вносят (25,0 ± 0,1) см^3 субстрата (9.1). Субстрат помещают в водяную баню (6.9), температура которой составляет 32 °С, и нагревают в течение не менее 12, но не более 20 мин, при этом субстрат перемешивают путем вращения колбы или пробирки.

К субстрату микропипеткой (6.1) быстро добавляют 0,5 см^3 рабочего раствора контрольного образца сычужного фермента теленка (9.3.1), одновременно включая секундомер (6.7). Содержимое перемешивают, не допуская образования пены, и сразу же прикрепляют колбу или пробирку к вращающемуся валу.

При появлении первых признаков коагуляции (появление хлопьев) в пленке субстрата на стенках колбы или пробирки регистрируют время свертывания по секундомеру.

С целью соблюдения идентичных условий, анализируемые пробы говяжьих сычужных ферментов в бане помещают как можно ближе к контрольным пробам. Поскольку данный метод представляет собой сравнительный анализ, весьма важным является поддержание одинаковой температуры при осуществлении процесса свертывания для анализируемых и контрольных проб. С целью соблюдения данного условия температуру внутри водяной бани проверяют, измеряя температуру проб с молоком в различных точках бани. Если допустимые колебания температуры ± 0,2 °С (см. 6.9) превышены, необходимо усовершенствовать конструкцию водяной бани или систему циркуляции в ней воды.

9.5.2 Согласно 9.5.1 сразу же проводят определение продолжительности свертывания субстрата анализируемым раствором сычужного фермента (9.4), затем проводят анализ, используя рабочий раствор контрольного образца сычужного фермента взрослой особи (9.3.2).

9.5.3 Проводят два параллельных определения. Рассчитывают среднеарифметические значения времени свертывания для рабочих растворов контрольных образцов сычужного фермента теленка и взрослой особи, соответственно, а затем — для анализируемого раствора сычужного фермента.

9.5.4 Допускается использовать 10 см^3 субстрата и 0,2 см^3 рабочего (или анализируемого) раствора, либо 50 см^3 субстрата и 1,0 см^3 рабочего (или анализируемого) раствора. В любом случае соотношение количеств используемого субстрата и рабочего раствора должно быть 50:1.

10 Расчет и выражение результатов

10.1 Расчет

Рассчитывают молокосвертывающую активность анализируемой пробы по отношению к активности порошкообразного контрольного образца сычужного фермента теленка (5.5), $a_{c,\,ref}$ и активности порошкообразного контрольного образца сычужного фермента взрослой особи (5.6) $a_{a,\,ref}$ (см. 10.1.1).

Далее проводят окончательный расчет общей молокосвертывающей активности путем интерполирования (см. 10.1.2), выраженной в Международных молокосвертывающих единицах (IMCU) на грамм или на кубический сантиметр.

10.1.1 Расчет молокосвертывающей активности относительно порошкообразного контрольного образца сычужного фермента теленка

Рассчитывают молокосвертывающую активность анализируемой пробы относительно двух контрольных образцов, a_{tc} и a_{ta}, по уравнениям

$$a_{tc} = \frac{t_{c,ref} \cdot m_{c,ref} \cdot V_1 \cdot d \cdot a_{c,ref}}{t_t \cdot V_2 \cdot V_3}; \quad (1)$$

$$a_{ta} = \frac{t_{a,ref} \cdot m_{a,ref} \cdot V_1 \cdot d \cdot a_{a,ref}}{t_t \cdot V_2 \cdot V_3}, \quad (2)$$

где a_{tc} — общая молокосвертывающая активность анализируемой пробы относительно контрольного образца сычужного фермента теленка, IMCU/см^3(г);

a_{ta} — общая молокосвертывающая активность анализируемой пробы относительно контрольного образца сычужного фермента взрослой особи, IMCU/см^3(г);

$t_{c,\,ref}$ — среднеарифметическое значение времени свертывания, полученное для рабочего раствора контрольного образца сычужного фермента теленка (9.5.1 и 9.5.3), с;

$t_{a,\,ref}$ — среднеарифметическое значение времени свертывания, полученное для рабочего раствора контрольного образца сычужного фермента взрослой особи, с;

$m_{c,\,ref}$ — масса контрольного образца сычужного фермента теленка по 9.2.1, г;

$m_{a,\,ref}$ — масса контрольного образца сычужного фермента взрослой особи по 9.2.2, г;

V_1 — объем раствора контрольного образца сычужного фермента теленка (9.3.1) или взрослой особи (9.3.2), см^3 (V_1 = 3 см^3);

d — конечное значение коэффициента разбавления, полученное для анализируемого раствора (9.4);

$a_{c,\,ref}$ — молокосвертывающая активность, указанная для порошкообразного контрольного образца сычужного фермента теленка (5.5), IMCU/г;

$a_{a,\,ref}$ — молокосвертывающая активность указанная для порошкообразного контрольного образца сычужного фермента взрослой особи (5.6), IMCU/г;

t_t — среднеарифметическое значение времени свертывания, полученное для анализируемого раствора сычужного фермента (9.5.2 и 9.5.3), с;

V_2 — конечный объем раствора контрольного образца сычужного фермента теленка (9.2.1) или взрослой особи (9.2.2), см^3 (V_2 = 50 см^3);

V_3 — конечный объем рабочего раствора контрольного образца сычужного фермента теленка (9.3.1) или взрослой особи (9.3.2), см^3 (V_3 = 50 см^3).

При введении в уравнения следующих значений: $m_{c,ref} = m_{a,ref}$ = 2,500 г; V_1 = 3 см^3; V_2 = 50 см^3; V_3 = 50 см^3 получены следующие упрощенные уравнения

$$a_{tc} = \frac{t_{c,ref} \cdot 0{,}003 \cdot d \cdot a_{c,ref}}{t_t}; \quad (3)$$

$$a_{ta} = \frac{t_{a,ref} \cdot 0{,}003 \cdot d \cdot a_{a,ref}}{t_t}. \quad (4)$$

10.1.2 Окончательный расчет общей молокосвертывающей активности путем интерполирования

Рассчитывают общую молокосвертывающую активность анализируемой пробы, a_t, в IMCU/см^3 при использовании жидкого сычужного фермента (8.1) и в IMCU/г при использовании порошкообразного сычужного фермента (8.2), по отношению к интерполируемому контрольному раствору сычужного фермента, имеющему состав, идентичный составу анализируемой пробы, по уравнению

$$a_t = \left(\frac{c_C \cdot a_{tc}}{100}\right) + \left(\frac{c_P \cdot a_{ta}}{100}\right), \quad (5)^{1)}$$

где c_C — массовая доля химозина в анализируемой пробе (8.1 или 8.2), определенное при помощи метода, установленного в IDF 110B, %;

c_P — массовая доля говяжьего пепсина в анализируемой пробе (8.1 или 8.2), определенное при помощи метода, установленного в IDF 110B, %.

10.2 Выражение результатов

Результаты выражают в Международных молокосвертывающих единицах (IMCU) на грамм или на кубический сантиметр, округляя до ближайшего целого числа.

11 Прецизионность

11.1 Межлабораторные испытания

Данные межлабораторных испытаний, касающиеся прецизионности метода, опубликованы [3], [4]. Значения, полученные в ходе данных межлабораторных испытаний, могут быть не применимы к диапазонам концентраций и матрицам, отличным от приведенных.

Значения повторяемости и воспроизводимости основаны на стандартных отклонениях, которые являются оценкой истинного стандартного отклонения значений в данном методе. Если в конечном итоге получены значения, которые существенно меньше, чем в 95 % случаев соответствуют приведенным в 11.2 и 11.3, рекомендуется усовершенствовать процедуру выполнения анализа.

При анализе порошкообразных сычужных ферментов выраженные в процентах значения упомянутых выше параметров прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) могут быть немного завышены из-за некоторых различий в растворимости и определенной степени неоднородности порошкообразных сычужных ферментов.

11.2 Повторяемость

Коэффициент вариации повторяемости CV(r), который выражает вариабельность независимых результатов, полученных одним и тем же оператором, при использовании одного и того же оборудования, при одних и тех же условиях и на одной и той же анализируемой пробе, в течение короткого интервала времени, должен не более чем в 5 % случаев превышать для жидких сычужных ферментов 1,8 % относительно среднеарифметического значения результатов анализа.

Если при данных условиях были проведены два определения, то абсолютная разница, r_{rel}, %, между двумя результатами не должна превышать для жидких сычужных ферментов 4,9 % относительно среднеарифметического значения результатов анализа.

[1)] В стандарте ISO нумерация формулы отсутствует.

11.3 Воспроизводимость

Коэффициент вариации воспроизводимости CV(R), который выражает вариабельность независимых результатов, полученных операторами в разных лабораториях, при использовании разного оборудования, в разных условиях и на одной и той же анализируемой пробе, должен не более чем в 5 % случаев превышать для жидких сычужных ферментов 3,5 % относительно среднеарифметического значения результатов анализа.

Если при данных условиях были проведены два определения, то абсолютная разница R_{rel}, %, между двумя результатами не должна превышать для жидких сычужных ферментов 9,7 % относительно среднеарифметического значения результатов анализа.

Примечание — Значения параметров прецизионности являются действительными при участии большого количества лабораторий. Практика показала, что высококвалифицированные лаборатории способны проводить анализ, при котором уровень воспроизводимости между лабораториями составляет 2 %.

12 Протокол анализа

Протокол анализа должен включать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы, в том числе сведения о ее фазовом состоянии (жидкая или порошкообразная);

b) метод отбора проб, если он известен;

c) ссылку на настоящий стандарт;

d) все подробности проведения анализа, не установленные в настоящем стандарте, или рассматриваемые как необязательные, вместе со всеми деталями описания любых факторов, которые могли повлиять на результаты;

e) полученные результаты анализа и, в случае проверки повторяемости, окончательные зарегистрированные результаты.

Приложение А
(справочное)

Межлабораторные испытания

А.1 Общие положения

Международные совместные испытания, включающие 13 лабораторий из девяти стран, проводились с использованием трех различных партий жидких говяжьих сычужных ферментов, каждая из которых была разведена для получения проб с двумя различными уровнями активности. Шесть проб, полученных таким образом, были разделены на 12 необозначенных проб-дубликатов. Результаты анализа были подвергнуты статистической обработке в соответствии с [2], и полученные результаты были опубликованы [3], [4].

А.2 Пробы жидких сычужных ферментов

Результаты, приведенные ниже, получены на основе вторичных межлабораторных испытаний, проведенных в 1990 г. Из результатов, приведенных в таблице А.1, исключены результаты лаборатории 3 для проб 9/12 и лаборатории 5 для проб 2/5 по причине несоответствия условиям воспроизводимости [4].

Таблица А.1 — Результаты межлабораторных испытаний

Проба	Соотношение химозин: пепсин	Среднеарифметическое значение, IMCU/см^3	CV(r), %	r	r_{rel}, %	CV(R), %	R	R_{rel}, %	Резко отклоняющиеся значения
1/4	90:10	195,8	2,69	14,7	7,5	3,71	20,4	10,4	Grubbs
8/11	48:52	180,7	1,75	8,9	4,9	3,74	18,9	10,5	Grubbs
3/6	9:91	213,8	2,57	15,4	7,2	3,79	22,7	10,6	Grubbs
7/10	90:10	160,1	0,94	4,2	2,6	1,99	8,9	5,6	Grubbs
2/5	48:52	128,0	1,56	5,6	4,3	3,54	12,7	9,9	Grubbs
9/12	9:91	197,7	1,07	5,9	3,0	4,03	22,3	11,3	Grubbs
Среднеарифметическое значение	—	—	1,8	—	4,9	3,5	—	9,7	—

Библиография

[1] ISO 707|IDF 50:1997 Milk and milk products — Guidance on sampling

[2] ISO 5725:1986 Precision of test methods; Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests[1)]

[3] Глава 10: Сычужные ферменты, содержащие химозин и говяжий пепсин. Определение общей молокосвертывающей активности. Bull. IDF (285), 1993

[4] Глава 11: Химозин и пепсин в говяжьих сычужных ферментах. Определение общей молокосвертывающей активности при pH 6,5. Испытание на относительную молокосвертывающую активность (REMCAT). Bull. IDF (285), 1993

[1)] В настоящее время опубликован в нескольких частях.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 648	—	*
ISO 1042	—	*
IDF 110B:1997	—	*

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта.

УДК 637.1:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко, свертывание молока, молокосвертывающая активность, говяжий сычужный фермент, коагуляция, молочный субстрат, контрольный образец, химозин, говяжий пепсин

Редактор *Ю.А. Расторгуева*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 20.11.2019. Подписано в печать 04.12.2019 Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва. Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru