МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
33528—
2015**

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным бюджетным учреждением Ярославской области «Ярославский государственный институт качества сырья и пищевых продуктов» (ГБУ ЯО «ЯГИКСПП»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 12 ноября 2015 г. № 82-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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 ноября 2015 г. № 2084-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33528—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2016

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 2
4 Сущность метода 3
5 Отбор проб 3
6 Условия проведения анализа 3
7 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы 3
8 Подготовка к проведению анализа 4
9 Проведение анализа 8
10 Обработка результатов анализа 9
11 Оформление результатов анализа 9
12 Контроль качества анализа 9
13 Требования, обеспечивающие безопасность 9
Приложение А (справочное) Электрофореграммы пробы продукта, не фальсифицированного и фальсифицированного белками немолочного происхождения 10
Приложение Б (справочное) Причины отклонений от стандартного хода анализа и способы их устранения 12
Библиография 14

Поправка к ГОСТ 33528—2015 Молоко и молочные продукты. Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 7 2019 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле

Milk and milk products.
Identification of protein composition by use of electrophoresis in polyacrylamide gel

Дата введения — 2016—07—01*

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырое коровье молоко и молочные продукты, изготовляемые из коровьего молока: молоко питьевое пастеризованное, творог (за исключением сычужного), сметана — и устанавливает качественный метод идентификации белков молочного и немолочного происхождения с использованием электрофореза в полиакриламидном геле.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.010—76 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.018—93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019—79** Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть1. Метрологические и технические требования. Испытания

---

* Дату введения стандарта в действие на территории государств устанавливают их национальные органы по стандартизации.

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

Издание официальное

ГОСТ 450—77 Кальций хлористый технический. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3769—78 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6—2002* Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 5860—75 Реактивы. Кислота аминоуксусная. Технические условия

ГОСТ 5867—90 Молоко и молочные продукты. Методы определения жира

ГОСТ 5962—2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6259—75 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7730—89 Пленка целлюлозная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13928—84 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 20478—75 Реактивы. Аммоний надсернокислый. Технические условия

ГОСТ 23932—90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 25228—82 Молоко и сливки. Метод определения термоустойчивости по алкогольной пробе

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26809.1—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия.

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31449—2013 Молоко коровье сырое. Технические условия

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории государства по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины в соответствии с [1], а также следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **электрофорез:** Метод анализа сложных смесей за счет электрокинетического явления — перемещение заряженных частиц дисперсной фазы в растворе (в зависимости от знака их суммарного электрического заряда) к аноду или катоду под действием сил внешнего электрического поля.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

4 Сущность метода

Метод основан на различии времен миграции макромолекул белков молочного и немолочного происхождения в зависимости от их размеров (молекулярной массы), пространственной конфигурации, вторичной структуры и электрического заряда в полиакриламидном геле под действием сил электрического поля и последующей визуальной идентификацией в геле анализируемой пробы наличия посторонних белковых полос, отсутствующих в контрольной пробе.

5 Отбор проб

Отбор и подготовка проб к анализу — по ГОСТ 13928 и ГОСТ 26809.1.

Не допускается консервирование проб молока и молочных продуктов.

6 Условия проведения анализа

При выполнении анализа в лаборатории следует соблюдать следующие условия:

температура окружающего воздуха .....(20 ± 5) °С;

относительная влажность воздуха .....(55 ± 25) %;

атмосферное давление.....(95 ± 10) кПа.

7 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

Ячейка для вертикального электрофореза со следующими параметрами:

- общие размеры ячейки 260 х 190 х 300 мм;
- центральный термостатируемый резервуар и адаптер для трубок, изготовленные из формованного полимера;
- нижняя электродная камера и крышка, изготовленные из формованного поликарбоната;
- зажимы, подставка для заливки и эксцентрики, изготовленные из остеклованного и армированного тефлоном поликарбоната;
- электроды, изготовленные из платиновой проволоки диаметром 0,254 мм;
- пластины стеклянные: внутренний размер — 200 х 200 мм и внешний размер — 200 х 225 мм;
- предельное значение напряжения 1000 В.

Источник напряжения с диапазоном регулируемого напряжения 20—5000 В, силой тока 0,01—500 мА и мощностью 0,1—400 Вт.

Анализатор потенциометрический диапазоном измерения 0—12 ед. pH, ценой деления 0,1 ед. pH.

Весы по ГОСТ OIML R 76-1, обеспечивающие точность взвешивания с пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,0005 г.

Термометр лабораторный шкальный от 0 °С до 100 °С ценой деления 1°С по ГОСТ 28498.

Аппарат для встряхивания типа «Вортекс» (скорость вращения 250—3000 об/мин).

Термостат твердотельный типа «Гном» под пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 $см^3$ диапазоном рабочих температур от фактической до 99 °С.

Плитка электрическая бытовая с регулируемым обогревом любого типа по ГОСТ 14919.

Сепаратор бытовой, обеспечивающий получение обезжиренного молока массовой долей жира (по Герберу) не более 0,05 %.

Часы 2-го класса точности по ГОСТ 27752.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Центрифуга лабораторная частотой вращения не менее 5000 об/мин.

Микроцентрифуга настольная типа «Эппендорф» (частота вращения не менее 13000 об/мин).

Мешалка магнитная, обеспечивающая нагрев до температуры 50 °С с погрешностью поддержания температуры ± 1 °С.

Баня водяная, обеспечивающая нагрев до температуры 50 °С с погрешностью поддержания температуры ± 2 °С.

Пипетдозаторы одноканальные переменного объема:

- рабочий объем 0,002—0,02 $см^3$, шаг переменного объема 0,001 $см^3$;
- рабочий объем 0,02—0,2 $см^3$, шаг переменного объема 0,01 $см^3$;
- рабочий объем 0,2—1 $см^3$, шаг переменного объема 0,1 $см^3$.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Пленка целлюлозная по ГОСТ 7730.

Воронка В-75-80 ХС по ГОСТ 25336.

Колбы исполнения 2-50-2, 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Колбы исполнения 1-100, Кн-1-50-14/23 ХС, Кн-1-100-29/32 ХС, Кн-1-250-24/29 ХС, Кн-1-500-29/32 ХС, Кн-1-2000-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Цилиндры исполнения 1-50-2, 1-100-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Эксикатор по ГОСТ 23932.

Пипетка исполнения 1-1-2-10, 1-1-2-25 по ГОСТ 29227.

Насос водоструйный по ГОСТ 25336.

Микрошприц вместимостью 0,05 $см^3$.

Пробирки центрифужные вместимостью 50 $см^3$.

Пробирки микроцентрифужные типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 $см^3$.

Стакан исполнения В-1-50 ХС, В-1-100 ХС, В-1-250 ХС по ГОСТ 25336.

Ступка фарфоровая с пестиком по ГОСТ 9147.

Наконечники для дозаторов с переменным объемом 0,02, 0,2 и 1 $см^3$.

Акриламид массовой долей основного вещества не менее 99,9 %.

N', N'–Метиленбисакриламид, для электрофореза.

Трис-(гидроксиметил)-аминометан массовой долей основного вещества не менее 99,8 %.

Мочевина для электрофореза.

Кумасси бриллиантовый голубой R-250, для электрофореза.

Кислота аминоуксусная по ГОСТ 5860, х. ч.

Бромфеноловый синий, для электрофореза.

Аммоний надсернокислый по ГОСТ 20478, х. ч.

N, N, N', N — 'Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), для электрофореза.

Натрий додецилсульфат для электрофореза.

Ацетон по ГОСТ 2603, х. ч.

Глицерин по ГОСТ 6259, ч. д. а.

Эфир диэтиловый, ч. д. а.

Кислота соляная, х. ч., по ГОСТ 3118, х. ч.

Аммоний сернокислый по ГОСТ 3769, х. ч.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61, х. ч.

Кальций хлористый безводный по ГОСТ 450.

Допускается применение других средств измерения и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

8 Подготовка к проведению анализа

8.1 Приготовление рабочих растворов

8.1.1 Раствор соляной кислоты молярной концентрации 1 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят около 500 $см^3$ дистиллированной воды и добавляют 90 $см^3$ концентрированной соляной кислоты плотностью ρ = 1,174 г/$см^3$ (или 85 $см^3$ концентрированной соляной кислоты плотностью ρ = 1,188 г/$см^3$), аккуратно перемешивают и доводят полученный объем дистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора соляной кислоты в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой при комнатной температуре — не более 3 мес.

8.1.2 Раствор мочевины молярной концентрации 6 моль/дм^3

В химическом стакане вместимостью 50 см^3 растворяют (18,02 ± 0,01) г мочевины в 30 см^3 дистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят полученный объем раствора дистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора мочевины в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

8.1.3 Раствор лидирующего красителя

В микроцентрифужную пробирку типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 см^3 помещают 0,0040 ± ± 0,0005 г бромфенолового синего, добавляют 1 см^3 дистиллированной воды и перемешивают на аппарате для встряхивания типа «Вортекс» (до полного растворения красителя).

Срок хранения раствора лидирующего красителя в микроцентрифужной пробирке типа «Эппендорф» при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

8.1.4 Раствор трис-HC1

В химическом стакане вместимостью 100 см^3 растворяют (6,070 ± 0,001) г трис-(гидрооксиметил) аминометана в 50 см^3 дистиллированной воды, доводят раствором соляной кислоты молярной концентрации 1 моль/дм^3 до (8,8 ± 0,1) ед. pH, переливают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем раствора до метки.

Срок хранения раствора трис-HCl в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

8.1.5 Раствор натрия додецилсульфата

В химическом стакане вместимостью 50 см^3 растворяют (10,00 ± 0,01) г натрия додецилсульфата в 30 см^3 дистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят полученный объем раствора дистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора натрия додецилсульфата в стеклянной прозрачной емкости с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

Примечание — При наличии признаков кристаллизации во время хранения, следует нагреть раствор на водяной бане до температуры 40 °С — 45 °С для растворения осадка.

8.1.6 Раствор мономеров полиакриламидного геля

В коническую колбу вместимостью 50 см^3 вносят (5,6840 ± 0,0005) г акриламида, (0,1220 ± 0,0005) г N', N'-метиленбисакриламида, (3,1040 ± 0,0005) г мочевины, добавляют 8,75 см^3 раствора трис-HC1, приготовленного по 8.1.4, и 26 см^3 дистиллированной воды. Перемешивают на магнитной мешалке с электроподогревом при температуре (50 ± 5) °С в течение 30 мин и охлаждают до комнатной температуры.

Срок хранения раствора мономеров для полиакриламидного геля в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

Примечание — Количество раствора для полиакриламидного геля дано для одного анализа и получения геля размером 160 х 160 х 1 мм.

8.1.7 Раствор электродного буфера

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят (4,50 ± 0,01) г трис-(гидрооксиметил) аминометана, (21,60 ± 0,01) г аминоуксусной кислоты и растворяют в 300 см^3 дистиллированной воды, добавляют 7,5 см^3 раствора натрия додецилсульфата, приготовленного по 8.1.5, полученный объем раствора доводят дистиллированной водой до метки, переливают в коническую колбу вместимостью 2000 см^3 и добавляют 1000 см^3 дистиллированной воды.

После изготовления буферный раствор выдерживают 1—2 ч при комнатной температуре и проверяют pH. Пригодный раствор должен иметь (8,3 ± 0,1) ед. pH.

Срок хранения раствора электродного буфера в стеклянной прозрачной емкости с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

Примечание — Объем электродного буфера предусмотрен для одной электрофоретической ячейки с параметрами, указанными в разделе 7. При использовании электрофоретической ячейки другого типа объем электродного буфера должен быть соответственно скорректирован.

8.1.8 Раствор для фиксации и окраски геля

В коническую колбу вместимостью 500 см^3 вносят (0,50 ± 0,01) г кумасси бриллиантового голубого, добавляют 200 см^3 этилового спирта, 50 см^3 уксусной ледяной кислоты и 250 см^3 дистиллированной

воды. Содержимое колбы тщательно перемешивают. После полного растворения красителя раствор фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Срок хранения раствора для фиксации и окраски геля в стеклянной емкости с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

8.1.9 Раствор для отмывки геля

В коническую колбу на 1000 см^3 вносят 670 см^3 дистиллированной воды, 90 см^3 ледяной уксусной кислоты и 240 см^3 этилового спирта. Перемешивают до полного растворения.

Срок хранения раствора для отмывки геля в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой при комнатной температуре — не более 6 мес.

8.2 Подготовка контрольной пробы

Для приготовления контрольных проб белка применяют исключительно сырое коровье молоко по ГОСТ 31449 с кислотностью 16,0—20,0 °Т, выдерживающее испытание на термоустойчивость согласно ГОСТ 25228 по алкогольной пробе на группу I или II.

Примечание — Не допускается получение контрольных белков из молока с низкой термоустойчивостью или с примесью молока других биологических видов животных.

8.2.1 Предварительное обезжиривание

8.2.1.1 Метод сепарирования

Сырое коровье молоко перед сепарированием подогревают на водяной бане до температуры 40 °С — 45 °С.

Сепарирование молока осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации для выбранной модели сепаратора до получения обезжиренного молока массовой долей жира не более 0,05 %.

После сепарирования обезжиренное сырое коровье молоко используют для дальнейшего анализа.

8.2.1.2 Метод центрифугирования

0,4—0,5 дм^3 сырого коровьего молока помещают в центрифужные пробирки и центрифугируют при 5000 об/мин в течение 20—30 мин. После центрифугирования центрифужные пробирки помещают в холодильник и охлаждают при температуре (4 ± 2) °С. После полного охлаждения застывший верхний жировой слой удаляют, а оставшееся обезжиренное молоко применяют для дальнейшего анализа.

8.2.2 Выделение белков

8.2.2.1 Выделение казеина

В химический стакан вместимостью 250 см^3 вносят 50 см^3 предварительно обезжиренного молока массовой долей жира не более 0,05 % по ГОСТ 5867, нагревают на водяной бане до температуры 35 °С — 40 °С и осаждают казеин, прибавляя по каплям раствор соляной кислоты, приготовленный по 8.1.1 до 4,5—4,6 ед. pH. Осадку дают отстояться, сыворотку осторожно сливают. Осадок промывают, добавляя 50 см^3 дистиллированной воды, перемешивают, дают отстояться и сливают воду. Промывают осадок не менее пяти раз.

Затем к промытому осадку добавляют 30 см^3 ацетона и оставляют на 30 мин, затем ацетон осторожно сливают. Действие повторяют до полного удаления жира, но не менее пяти раз. Осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3, заливают 120 см^3 диэтилового эфира и закрывают притертой пробкой. Перемешивают не менее 5 мин и оставляют на 12 ч в холодильнике. Через 12 ч осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и подсушивают на воздухе в вытяжном шкафу не менее 1 ч.

(10,0 ± 0,1) г подсушенного осадка переносят в коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 60 см^3 раствора мочевины, приготовленного по 8.1.2, перемешивают на магнитной мешалке при температуре (50 ± 5) °С до полного растворения. Получившийся раствор переносят в мешочек для диализа, изготовленный из целлофановой пленки, который погружают в дистиллированную воду и помещают в холодильник. Диализ (освобождение раствора от низкомолекулярных соединений) проводят не менее 24 ч при периодической смене дистиллированной воды. После чего образовавшийся осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и высушивают в эксикаторе над безводным хлористым кальцием не менее 4 ч.

Срок хранения выделенного казеина в емкости из темного стекла с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 6 мес.

8.2.2.2 Выделение сывороточных белков

Сыворотку, оставшуюся после выделения казеина по 8.2.2.1, сливают в коническую колбу вместимостью 250 см^3 и добавляют аммоний сернокислый [на 25 см^3 сыворотки (17,5 ± 0,1) г аммония сернокислого], и тщательно перемешивают до полного растворения. Помещают в холодильник при температуре (4 ± 2) °С на 12 ч. Отделившийся белок фильтруют через сухой складчатый фильтр и переносят в мешочек для диализа, изготовленный из целлофановой пленки, который погружают в дистиллированную воду и помещают в холодильник. Диализ проводят не менее 24 ч при периодической смене дистиллированной воды. Через 24 ч образовавшийся осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и высушивают в эксикаторе над безводным хлористым кальцием не менее 4 ч.

Срок хранения выделенных сывороточных белков в емкости из темного стекла с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 6 мес.

8.3 Подготовка проб

8.3.1 Молоко

Предварительное обезжиривание и выделение белков из проб молока осуществляется по 8.2.1 и 8.2.2.

8.3.2 Молочные продукты

10—15 г сметаны или творога смешивают с 50 см^3 этилового спирта объемной долей не менее 95,0 и тщательно перемешивают в колбе или растирают в фарфоровой ступке до образования мелкодисперсной взвеси и оставляют на 15 мин. Затем осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3 мин или фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Осадок тщательно перемешивают с 50 см^3 ацетона в химическом стакане или колбе с притертой пробкой и оставляют на 20 мин, затем ацетон осторожно сливают или отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3 мин. Действие повторяют до полного удаления жира, но не менее пяти раз. Отмытый ацетоном осадок помещают в колбу вместимостью 100 см^3 с притертой пробкой, заливают 60 см^3 диэтилового эфира, закрывают пробкой и выдерживают в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение 12 ч, периодически помешивая. Через 12 ч осадок фильтруют через сухой складчатый фильтр и подсушивают на воздухе в вытяжном шкафу не менее 1 ч.

Высушенную пробу обезжиренных белков молочного продукта готовят к анализу по 8.4.1.

8.4 Приготовление растворов белков для анализа

8.4.1 Контрольная проба

В микроцентрифужную пробирку типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 см^3 помещают (0,0040 ± 0,0005) г белка, выделенного по 8.2, добавляют 0,5 см^3 раствора мочевины, приготовленного по 8.1.2, вносят 0,05 см^3 раствора натрия додецилсульфата, приготовленного по 8.1.5, и выдерживают в термостате при температуре 95 °С в течение 5 мин, тщательно перемешивают на аппарате для встряхивания «Вортекс» до полного растворения белков. К полученному раствору добавляют 0,2 см^3 глицерина и 0,025 см^3 лидирующего красителя, приготовленного по 8.1.3, тщательно перемешивают на аппарате для встряхивания «Вортекс», центрифугируют при частоте 3000 об/мин в течение 5 мин, образовавшийся осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость используют для анализа.

Срок хранения контрольных растворов белков в емкости из темного стекла с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 7 сут.

8.4.2 Анализируемая проба

В микроцентрифужную пробирку типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 см^3 помещают (0,0040 ± 0,0005) г белка, выделенного по 8.3, добавляют 0,5 см^3 раствора мочевины, приготовленного по 8.1.2, вносят 0,05 см^3 раствора натрия додецилсульфата, приготовленного по 8.1.5, и выдерживают в термостате при температуре 95 °С в течение 5 мин, тщательно перемешивают на аппарате для встряхивания «Вортекс» до полного растворения белков. К полученному раствору добавляют 0,2 см^3 глицерина и 0,025 см^3 лидирующего красителя, приготовленного по 8.1.3, тщательно перемешивают на аппарате для встряхивания «Вортекс», центрифугируют при частоте 3000 об/мин в течение 5 мин, образовавшийся осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость используют для анализа.

Срок хранения растворов белков анализируемых проб в емкости из темного стекла с плотно завинчивающейся крышкой при температуре (4 ± 2) °С — не более 7 сут.

9 Проведение анализа

При сборке камеры для полимеризации геля применяют стеклянные пластины размерами: внутренний размер — 200 х 200 мм и внешний размер — 200 х 225 мм.

На внешнюю пластину справа и слева вдоль длинных сторон помещают спейсеры (ограничительные пластинки) толщиной 1 мм. Поверх спейсеров накладывают внутреннюю стеклянную пластину. Пластины фиксируют зажимами справа и слева и устанавливают на подставку для заливки с желобом для выравнивания. Камеру проверяют на герметичность с помощью дистиллированной воды, которую затем удаляют. После проверки камеры на герметичность между пластинами камеры под небольшим углом помещают гребенку для формирования лунок.

Для обеспечения нормального процесса полимеризации геля раствор мономеров, приготовленный по 8.1.6, подвергают деаэрации в колбе с тубусом, присоединенной к водоструйному насосу. После деаэрации в раствор добавляют (0,020 ± 0,001) г надсернокислого аммония и 0,020 $см^3$ N, N, N', N'-тетраме-тилэтилендиамина, осторожно перемешивают для предотвращения образования пузырей в растворе. Стеклянной пипеткой с грушей вдоль края спейсера (с приподнятой стороны гребенки) раствор вносят в камеру для полимеризации.

Гель полимеризуется в течение 45 мин, после чего гребенку извлекают и ополаскивают образовавшиеся в геле лунки дистиллированной водой.

Камеру с гелем прикрепляют к термостатируемому резервуару и помещают в электрофоретическую ячейку.

В электродные камеры ячейки заливают электродный буфер, приготовленный по 8.1.7.

В лунки геля под электродный буфер с помощью микрошприца вносят раствор белков контрольной пробы, приготовленной по 8.4.1, и растворы белков анализируемых проб, приготовленные по 8.4.2. Крайние лунки геля используют для растворов контрольной пробы. Объем раствора белка, вносимого в одну лунку, составляет 0,020—0,025 $см^3$. После каждого внесения микрошприц тщательно промывают раствором электродного буфера.

Примечание — При наличии в пластине пустых ячеек в них вносят раствор белков контрольной пробы, приготовленный по 8.4.1.

Для получения достоверных результатов раствор белков каждой анализируемой пробы вносят не менее чем в три лунки.

После внесения растворов белков контрольной и анализируемых проб электрофоретическую ячейку закрывают крышкой.

Электрофорез проводят в течение 4—5 ч в режиме постоянного напряжения 150—170 В.

Примечание — Режим приведен для электрофоретической ячейки с параметрами, указанными в 7, и полиакриламидного геля размером 160 х 160 х 1 мм. При использовании ячейки другого типа или геля с другими размерами режим проведения электрофореза подбирается индивидуально.

Для предотвращения неравномерного распределения тепла и искажения белковых зон (полос) необходимо обеспечить принудительное охлаждение термостатируемого резервуара.

Электрофорез считают законченным, когда лидирующий краситель опустится до нижнего края геля.

После проведения электрофореза гель аккуратно извлекают из электрофоретической ячейки, фиксируют и окрашивают. Фиксация и окраска осуществляются одновременно в растворе, приготовленном в соответствии с 8.1.8, в течение 2 ч. Для ускорения процесса допускается проводить окрашивание и фиксацию геля в течение 1 ч на электроплитке при (40 ± 5) °С, при этом ванночку с раствором и гелем необходимо регулярно покачивать.

Отмывку окрашенного геля проводят кипячением в растворе для отмывки, приготовленном по 8.1.9, до полного удаления фона с постоянной сменой отмывающего раствора по мере вымывания красителя.

10 Обработка результатов анализа

Идентификацию белков молочного и немолочного происхождения осуществляют визуально.

Наличие и совпадение белковых фракций (полос) на электрофореграмме растворов белков контрольной и анализируемых проб (не менее чем в трех повторностях) указывает на отсутствие в составе молока или молочного продукта белков немолочного происхождения (см. приложение А, рисунок А.1).

При наличии в анализируемой пробе молока или молочного продукта белков немолочного происхождения на электрофореграмме присутствуют дополнительные белковые фракции (полосы), которые не наблюдаются в контрольных пробах (см. приложение А, рисунок А.2).

В случае возникновения разногласий о наличии в анализируемой пробе белков немолочного происхождения (слабое изображение отдельных фракций) анализ повторяют, увеличив концентрацию белков в растворе анализируемой пробы.

Возможные причины отклонений от стандартного хода анализа и способы их устранения приведены в приложении Б.

11 Оформление результатов анализа

Результат обнаружения белков немолочного происхождения в молоке и молочных продуктах представляют в документах, предусматривающих его использование, в виде наличия или отсутствия белков немолочного происхождения, на основании чего делают заключение о фальсификации или нефальсификации молока или молочных продуктов белками немолочного происхождения.

12 Контроль качества анализа

Контроль качества анализа обеспечивают выполнением следующих условий:

- анализ проб проводят сериями, каждую из которых анализируют не менее, чем в трех повторностях. Контрольная проба вносится не менее чем в две ячейки гелевой пластины с интервалом пять-шесть ячеек;
- оперативный контроль точности и правильности анализа обеспечивается ежемесячным анализом стандартной смеси молочных белков с добавлением соевого изолята.

13 Требования, обеспечивающие безопасность

13.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении работ следует соблюдать следующие требования:

- помещение, в котором проводят измерения, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021. Работу с реактивами необходимо проводить в вытяжном шкафу. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;
- требования электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и инструкцией по эксплуатации прибора;
- требования взрывобезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.010;
- помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожаробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004, ГОСТ 12.1.018 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.009;
- при работе с концентрированными кислотами и щелочами необходимо использовать резиновые перчатки. При выполнении анализов следует соблюдать требования безопасности при работе с химическими реактивами согласно ГОСТ 12.1.007.

13.2 Требования к квалификации оператора

К работе допускаются лица, имеющие квалификацию инженер, техник или лаборант, владеющие навыками проведения анализа и изучившие инструкцию по эксплуатации используемой аппаратуры.

Приложение А
(справочное)

Электрофореграммы пробы продукта, не фальсифицированного и фальсифицированного белками немолочного происхождения

А.1 Электрофореграмма пробы продукта, не фальсифицированного белками немолочного происхождения, приведена на рисунке А.1.

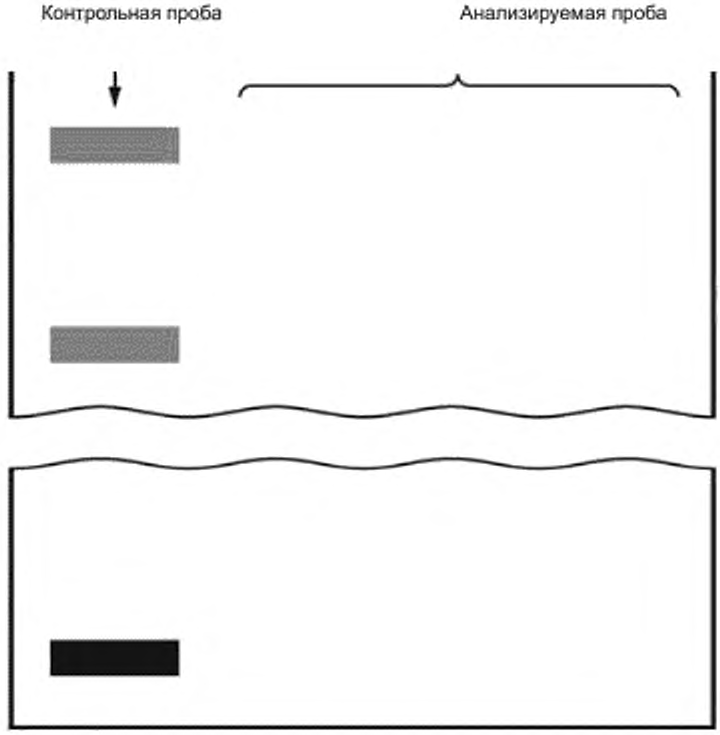


Рисунок А.1 — Электрофореграмма пробы продукта, не фальсифицированного белками немолочного происхождения

А.2 Электрофореграмма пробы продукта, фальсифицированного белками немолочного происхождения, приведена на рисунке А.2.

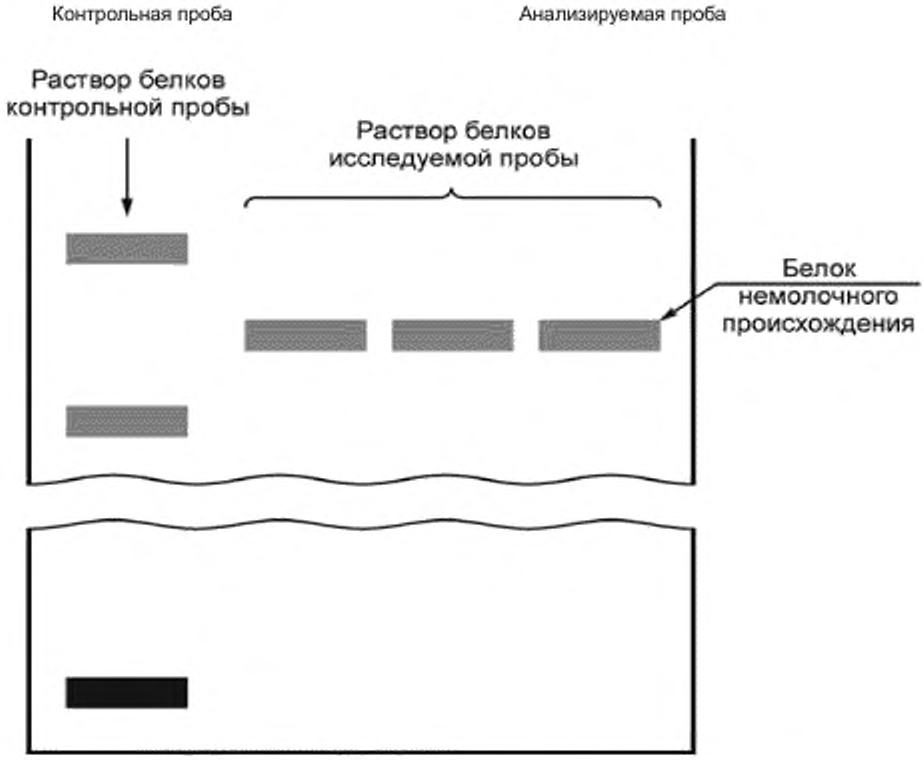


Рисунок А.2 — Электрофореграмма пробы продукта, фальсифицированного белками немолочного происхождения

Приложение Б
(справочное)

Причины отклонений от стандартного хода анализа и способы их устранения

Б.1 Причины отклонений от стандартного хода анализа и способы их устранения приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1 — Причины отклонений от стандартного хода анализа и способы их устранения

Отклонение	Возможные причины	Способы устранения
Полосы по краям геля расположены выше, чем в центре	Центральная часть геля нагревается сильнее краев. Избыточное напряжение	Центральный резервуар заполнить охлаждающим раствором. Охлаждающий раствор прокачивать при температуре 10 °С — 15 °С. Уменьшить напряжение
Диффузия лидирующего красителя	Распад раствора белков пробы и/или растворов буферов. Диффузия	Приготовить растворы из свежих реактивов. Если полосы белка имеют такой же диффузный характер, как и полоса лидирующего красителя, увеличить силу тока на 25 % — 50 %
Вертикальная исчерченность трека	Избыточная концентрация белков в пробе	Уменьшить концентрацию белков в пробе. Уменьшить напряжение на 25 %
Горизонтальная исчерченность трека	Неполное растворение белков	Полностью растворить пробу. Центрифугировать
Широкие или размытые полосы или пятна белков	Диффузия в связи с медленной миграцией. Химические модификации ионными загрязнениями. Неполное обезжиривание пробы	Увеличить силу тока на 20 %. Деионизовать раствор мочевины. Полностью удалить жир
Размывание полос в латеральном направлении	Диффузия растворов белков за пределы лунок до включения напряжения	Уменьшить время между внесением пробы и подачей напряжения в электрофоретическую ячейку
Искривление полос	Недостаточная полимеризация геля вокруг лунок. Наличие солей в пробе. Неровная поверхность геля	Дегазировать раствор мономеров геля; увеличить молярную концентрацию аммония надсернокислого и N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина на 25 %. Удалить соли диализом. Проверить стадию взятия проб для приготовления геля, при необходимости заменить реактивы
Лидирующий краситель опускается до нижнего края геля слишком медленно	Высокая концентрация электродного буфера. Низкое напряжение	Проверить стадию приготовления электродного буфера (при необходимости разбавить буфер), проверить качество дистиллированной воды, заменить реактивы. Увеличить напряжение на 25 % — 50 % от установленного

Окончание таблицы Б.1

Отклонение	Возможные причины	Способы устранения
Лидирующий краситель опускается до нижнего края геля слишком быстро	Буфер слишком разбавлен. Высокое напряжение	Проверить стадию приготовления электродного буфера, проверить качество дистиллированной воды, заменить реактивы. Уменьшить напряжение на 25 % — 50 % от установленного
Наблюдается несовпадение полос в контрольных пробах	Часть белка могла окислиться во время электрофореза или не была полностью восстановлена на стадии подготовки пробы	Приготовить свежие контрольные пробы. Проверить качество используемых реактивов

Библиография

[1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», принятый Решением Совета Евразийской Экономической комиссии № 67 от 9 октября 2013 г.

УДК 637.147.2:543:06:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко сырое, молочный продукт, белок, идентификация белкового состава, электрофорез, полиакриламидный гель, электрофореграмма, интерпретация результатов анализа

Редактор *М.Е. Никулина*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашова*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Тираж 64 экз. Зак. 57.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,
123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru ıstinfo.ru

Поправка к ГОСТ 33528—2015 Молоко и молочные продукты. Идентификация белкового состава электрофоретическим методом в полиакриламидном геле

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 7 2019 г.)

gost.e-ecolog.ru