ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 71138— 2023

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Метод определения молокосвертывающей активности

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2023

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Ассоциацией «Технологическая платформа БиоТех2030» (Ассоциация «ТП БиоТех2030»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 6 декабря 2023 г. № 1525-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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 (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023

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 2
5 Отбор проб и подготовка их к измерениям 2
6 Условия проведения измерений 2
7 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы 2
8 Подготовка к проведению измерений 3
9 Проведение измерений 4
10 Обработка результатов измерений 5
11 Проверка приемлемости результатов измерений 5
12 Оформление результатов измерения 6
13 Требования, обеспечивающие безопасность 6
14 Требования к оператору 6
Библиография 7

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Метод определения молокосвертывающей активности

Enzyme preparations for the food industry. Method for determining milk-clotting activity

Дата введения — 2024—03—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты, предназначенные для свертывания молока или молочной смеси для производства молочных продуктов, и устанавливает метод определения молокосвертывающей активности химозина.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

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

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

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

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

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

ГОСТ 61 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 199 Реактивы. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 450 Кальций хлористый технический. Технические условия

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

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

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

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

ГОСТ 29169 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

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

ГОСТ 33629 Консервы молочные. Молоко сухое. Технические условия

ГОСТ 34353 Препараты ферментные молокосвертывающие животного происхождения сухие. Технические условия

Издание официальное

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

ГОСТ Р 57248 Препараты ферментные. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 34353 и [1].

4 Сущность метода

Метод основан на сравнении периода времени, необходимого для свертывания молочного субстрата при внесении пробы анализируемого ферментного препарата, и периода времени, необходимого для свертывания молочного субстрата при внесении контрольного образца фермента, и последующем вычислении молокосвертывающей активности в Международных молокосвертывающих единицах (IMCU) на грамм (кубические сантиметры) анализируемого ферментного препарата.

5 Отбор проб и подготовка их к измерениям

Отбор проб — по ГОСТ 34353, ГОСТ Р 57248.

6 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории необходимо соблюдать следующие условия:
температура окружающего воздуха .....от 15 °С до 25 °С;
относительная влажность воздуха .....не более 80 %;
атмосферное давление ..... (96 ± 10) кПа.

7 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

Весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,003 г по ГОСТ OIML R 76-1.

Анализатор потенциометрический диапазоном измерения 1—14 ед. pH погрешностью не более ±0,05 ед. pH.

Секундомер.

Термометр жидкостный (не ртутный) диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

Часы 2-го класса точности по ГОСТ 27752.

Баня водяная лабораторная, обеспечивающая поддержание температуры (32,0 ± 1,0) °С.

Мешалка магнитная лабораторная.

Испаритель роторный лабораторный.

Колбы мерные 1—50—2, 1—1000—2 по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 1—1—2—1, 1—1—2—5 по ГОСТ 29227.

Пипетки с одной отметкой 2—2—25 по ГОСТ 29169.

Цилиндры 1—10—2, 1—25—2, 1—100—2, 1—500—2 по ГОСТ 1770.

Стаканы В-1-50, В-1-250, В-1-400, В-1-600 ТС по ГОСТ 25336.

Колба круглодонная К-1-50-29/32 ТС по ГОСТ 25336.

Кальций хлористый по ГОСТ 450, сорт 1.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, х. ч., ледяная.

Контрольный образец химозина ферментной активностью в Международных молокосвертывающих единицах (IMCU) 1000 IMCU/г ($см^3$).

Молоко сухое обезжиренное по ГОСТ 33629.

Натрий уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 199, ч. д. а.

Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144.

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

8 Подготовка к проведению измерений

8.1 Подготовка дистиллированной воды

Для удаления диоксида углерода дистиллированную воду кипятят не менее 20 мин и переносят в стеклянную бутыль с завинчивающейся крышкой.

Срок хранения кипяченой дистиллированной воды при комнатной температуре — не более 10 сут.

8.2 Приготовление раствора хлористого кальция массовой концентрации $c(CaCl_2)$ 0,5 г/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают (0,500 ± 0,003) г хлористого кальция, добавляют небольшое количество дистиллированной воды (см. 8.1) и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят дистиллированной водой (см. 8.1) до метки и переносят в стеклянную бутыль с завинчивающейся крышкой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 24 ч.

8.3 Приготовление раствора уксусной кислоты молярной концентрации 1 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают 57,5 $см^3$ уксусной кислоты, добавляют небольшое количество дистиллированной воды (см. 8.1) и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят дистиллированной водой (см. 8.1) до метки и переносят в стеклянную бутыль с завинчивающейся крышкой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

8.4 Приготовление ацетатного буферного раствора, значение pH = 5,5

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают (10,000 ± 0,003) г уксуснокислого натрия, добавляют 700 $см^3$ дистиллированной воды (см. 8.1), 10 $см^3$ уксусной кислоты молярной концентрации 1 моль/$дм^3$ (см. 8.3) и аккуратно перемешивают. Значение pH полученного раствора доводят до 5,5 ед. pH раствором уксусной кислоты молярной концентрации 1 моль/$дм^3$.

Затем объем раствора доводят дистиллированной водой (см. 8.1) до метки, аккуратно перемешивают и переносят в бутыль из темного стекла с завинчивающейся крышкой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 24 ч, или при температуре от 0 °С до 5 °С — не более 1 мес.

8.5 Приготовление исходного раствора контрольного образца фермента

При использовании контрольного образца фермента молокосвертывающей активностью 1000 IMCU/г ($см^3$) в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ помещают контрольный образец фермента [для жидких проб — 2,50 $см^3$ (V_1), для порошкообразных проб — (2,500 ± 0,003) г (m_1)]. Добавляют небольшое количество буферного раствора (см. 8.4) и тщательно перемешивают. Доводят объем буферным раствором (см. 8.4) до метки, аккуратно перемешивают и переносят в стеклянную бутыль с завинчивающейся крышкой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 24 ч. Допускается хранить контрольный раствор фермента при температуре от 0 °С до 5 °С не более 2 сут.

Примечание — Допускается применение контрольного образца химозина другой ферментной активности, скорректировав навеску химозина при проведении измерений таким образом, чтобы время свертывания молока под действием рабочего раствора контрольного образца фермента находилось в диапазоне 350—550 с.

8.6 Приготовление рабочего раствора контрольного образца фермента

В мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ помещают 3,0 $см^3$ контрольного образца фермента, приготовленного по 8.5. Добавляют небольшое количество буферного раствора (см. 8.4) и тщательно перемешивают. Доводят объем буферным раствором (см. 8.4) до метки и аккуратно перемешивают.

При этом коэффициент разбавления равен 333,33, что соответствует времени свертывания молока под действием рабочего раствора контрольного образца фермента 350—550 с.

Рабочий раствор контрольного образца фермента используют в день приготовления.

8.7 Подготовка раствора молочного субстрата

С помощью мерного цилиндра отмеряют 300 $см^3$ раствора хлористого кальция массовой концентрации $c(CaCl_2)$ 0,5 $г/дм^3$ (см. 8.2) и помещают в сухой химический стакан вместимостью 400—600 $см^3$. В другой стакан вместимостью 400 $см^3$ помещают (33,3 ± 0,003) г сухого обезжиренного молока, пипеткой добавляют 2,0—2,5 $см^3$ раствора хлористого кальция, перемешивают, вносят еще 2,0—2,5 $см^3$ раствора хлористого кальция, повторяя процедуру добавления раствора хлористого кальция до тех пор, пока не будет получена однородная масса без сгустков и комков. Оставшийся раствор хлористого кальция доливают в молочный субстрат.

Готовый раствор молочного субстрата перемешивают при помощи магнитной мешалки в течение 30 мин, не допуская образования пены, переносят в стеклянную бутыль с завинчивающейся крышкой и выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин.

Раствор молочного субстрата хранят при комнатной температуре не более 4 ч или в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение 24 ч. Активная кислотность (pH) приготовленного субстрата должна составлять не менее 6,50 ед. pH.

8.8 Приготовление раствора анализируемого ферментного препарата

8.8.1 В мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ помещают образец анализируемого ферментного препарата [для жидких проб — 2,5 $см^3$ (V_2), для сухих проб — (2,500 ± 0,003) г (m_2)]. Добавляют небольшое количество буферного раствора (см. 8.4) и тщательно перемешивают. Доводят объем буферным раствором (см. 8.4) до метки и аккуратно перемешивают.

8.8.2 Из приготовленного по 8.8.1 раствора анализируемого ферментного препарата отбирают 3 $см^3$ раствора и переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$. Добавляют небольшое количество буферного раствора (см. 8.4) и тщательно перемешивают. Доводят объем буферным раствором (см. 8.4) до метки и аккуратно перемешивают.

9 Проведение измерений

Проводят два параллельных измерения.

9.1 В сухую круглодонную колбу вместимостью 50 $см^3$ пипеткой вносят 25,0 $см^3$ раствора молочного субстрата. Колбу подсоединяют к роторному испарителю, помещают в водяную баню температурой (32,0 ± 1,0) °С и нагревают в течение 12—20 мин, вращая с частотой вращения роторного испарителя не выше 20 об/мин. По истечении времени термостатирования добавляют 0,5 $см^3$ рабочего раствора контрольного образца ферментного препарата, одновременно включая секундомер. Содержимое колбы перемешивают, не допуская образования пены. Колбу прикрепляют к вращающемуся валу роторного испарителя. При появлении первых признаков коагуляции (появление хлопьев) на стенках колбы останавливают работу секундомера и фиксируют время свертывания.

9.2 Согласно 9.1 сразу же проводят определение продолжительности свертывания образца молочного субстрата анализируемым ферментным препаратом, используя вместо контрольного раствора фермента раствор анализируемого ферментного препарата, приготовленный по 8.8.

9.3 Вычисляют среднее арифметическое времени свертывания для контрольного образца фермента и для анализируемого ферментного препарата.

10 Обработка результатов измерений

10.1 Общую молокосвертывающую активность испытуемого ферментного препарата X, IMCU/см^3, вычисляют по формуле

$$X = \frac{V_1 \cdot t_1 \cdot X_1}{V_2 \cdot t_2}, \quad (1)$$

где V_1 — объем исходного контрольного образца фермента (см. 8.5), см^3;

t_1 — продолжительность свертывания молочного субстрата раствором контрольного образца фермента, с;

X_1 — общая молокосвертывающая активность контрольного образца фермента, IMCU/см^3;

V_2 — объем пробы анализируемого ферментного препарата (8.8.1), см^3;

t_2 — продолжительность свертывания молочного субстрата раствором анализируемого ферментного препарата, с.

10.2 Общую молокосвертывающую активность испытуемого ферментного препарата X, IMCU/г, вычисляют по формуле

$$X = \frac{m \cdot t_1 \cdot X_2}{m_2 \cdot t_2}, \quad (2)$$

где m_1 — масса исходного контрольного образца фермента (см. 8.5), г;

X_2 — общая молокосвертывающая активность контрольного образца фермента, IMCU/г;

m_2 — масса пробы анализируемого ферментного препарата (8.8.1), г;

t_1 — продолжительность свертывания молочного субстрата раствором контрольного образца фермента, с;

t_2 — продолжительность свертывания молочного субстрата раствором анализируемого ферментного препарата, с.

10.3 Контроль точности результатов измерений

Метрологические характеристики метода определения молокосвертывающей активности при доверительной вероятности P = 0,95 приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Метрологические характеристики метода определения молокосвертывающей активности химозина

Размерность в процентах

Предел повторяемости $r_{отн.}$	Предел воспроизводимости $R_{отн.}$	Границы относительной погрешности ±δ
14	20	14

11 Проверка приемлемости результатов измерений

11.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (два параллельных определения, n = 2), проводят с учетом требований ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (пункт 5.2.2).

Результаты измерений считаются приемлемыми при условии

$$|X_1 - X_2| \le r_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср},$$

где X_1, X_2 — значения результатов двух параллельных измерений, полученные в условиях повторяемости;

$r_{отн.}$ — предел повторяемости, значение которого приведено в таблице 1, %;

$X_{ср}$ — среднее арифметическое двух параллельных измерений.

Если данное условие не выполняется, то проводят повторные измерения и проверку приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (пункт 5.2.2).

При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам анализа.

11.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости (в двух лабораториях, $m = 2$), проводят с учетом требований ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (пункт 5.3.2.1).

Результаты измерений, выполненные в условиях воспроизводимости, считаются приемлемыми при условии

$$|X_1' - X_2'| \le R_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср},$$

где X_1', X_2' — значения результатов двух измерений, полученные в двух лабораториях в условиях воспроизводимости;

$R_{отн}$ — предел воспроизводимости, значение которого приведено в таблице 1, %;

$X_{ср}$ — среднее арифметическое результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости.

Если данное условие не выполняется, то проводят процедуры в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (пункт 5.3.3).

12 Оформление результатов измерения

Результат измерения представляют в документах, предусматривающих его использование, в виде

$$X_{ср} \pm \Delta, \text{ при } P = 0{,}95,$$

где $X_{ср}$ — среднее арифметическое результатов двух параллельных измерений, удовлетворяющих условию приемлемости по 11.1;

Δ — границы абсолютной погрешности измерений ($\Delta = \delta \cdot 0{,}01.X_{ср}$,);

δ — границы относительной погрешности измерений, % (см. таблицу 1).

13 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами — в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками — в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

14 Требования к оператору

Выполнение измерений может проводить специалист, имеющий специальное образование и освоивший метод в соответствии с требованиями настоящего стандарта.

Библиография

[1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств

УДК 577.15:543.06:006.354 ОКС 07.100.30

Ключевые слова: ферментные препараты, молокосвертывающая активность, химозин, продолжительность свертывания, молочный субстрат

Редактор *З.А. Лиманская*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *И.Ю. Литовкиной*

Сдано в набор 14.12.2023. Подписано в печать 19.12.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч-изд. л. 1,20.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
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