ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 71140— 2023

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Метод определения маннаназной 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. № 1527-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 Условия проведения измерений 2
5 Сущность метода 2
6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы 2
7 Подготовка к анализу 3
8 Определение концентрации белка по методу Бредфорда 6
9 Анализ подготовленных проб 7
10 Контроль точности результатов измерений маннаназной активности 7

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Метод определения маннаназной активности

Enzyme preparations for the food industry.
Method for determining mannanase activity

Дата введения — 2025—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты для пищевой промышленности и устанавливает метод количественного определения ферментативной активности β-маннаназы ферментных препаратов и ферментсодержащих смесей.

Допускается применение настоящего стандарта для определения маннаназной активности ферментных препаратов для комбикормовой промышленности и товаров бытовой химии.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 61 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

ГОСТ 618 Фольга алюминиевая для технических целей. Технические условия

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

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5845 Реактивы. Калий-натрий виннокислый 4-водный. Технические условия

ГОСТ 6552 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 20298 Смолы ионообменные. Катиониты. Технические условия

ГОСТ 20301 Смолы ионообменные. Аниониты. Технические условия

ГОСТ 20903 Кюветы прямоугольные кварцевые для спектрофотометров. Основные размеры. Технические требования

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

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

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

ГОСТ 33674 Кровь и продукты ее переработки. Технические условия

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

Издание официальное

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 следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **гидролиз:** Расщепление исходного соединения на более простые в присутствии молекул воды.

3.2 **фермент:** Биокатализатор белковой природы, ускоряющий химические реакции.

3.3 **маннаназа:** Фермент, разрушающий β-1,4-гликозидную связь в полисахаридах маннаны; код фермента ЕС 3.2.1.25.

3.4 **супернатант:** Надосадочная жидкость (жидкая фаза), остающаяся после осаждения нерастворимого материала.

4 Условия проведения измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия: температура воздуха (20 ± 5) °С, относительная влажность не более 80 % (условия измерений должны соответствовать требованиям, изложенным в паспортах или иных документах на используемое оборудование и материалы).

5 Сущность метода

Метод основан на количественном определении восстанавливающих сахаров, образующихся при гидролизе субстрата β-маннаназой до восстанавливающих сахаров и маннозы.

Содержание восстанавливающих сахаров определяют колориметрически по методу Миллера с динитросалициловой кислотой (ДНСК) при длине волны 546 нм и рассчитывают по калибровочному графику, построенному для маннозы.

Диапазон измерения активности должен быть в пределах от 0,9 до 10,8 ед/см^3.

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

6.1 Весы аналитические 1-го класса точности, с пределами допускаемой абсолютной погрешности ±0,2 мг по ГОСТ OIML R 76-1.

6.2 Спектрофотометр, обеспечивающий измерения в диапазоне длин волн 190—1100 нм с погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 % (не более 0,01 единицы оптической плотности).

6.3 Центрифуга, позволяющая подвергать центрифугированию образец со скоростью не менее 7000 об/мин.

6.4 Мельница лабораторная, обеспечивающая размалывание исследуемого образца ферментного препарата до полного прохода пробы через сито.

6.5 Сито с диаметром отверстий 1,0 мм из металлической проволочной сетки.

6.6 Иономер любого типа для измерения в диапазоне от 0 до 14 pH с пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ±0,1 единиц pH.

6.7 Мешалка магнитная с подогревом любой марки, которая обеспечивает скорость вращения до 800 об/мин.

6.8 Баня водяная любого типа, которая обеспечивает поддержание температуры (100 ± 1) °С.

6.9 Таймер любого типа с погрешностью ±30 с.

6.10 Секундомер с емкостью шкалы счетчика 1 мин, ценой деления 1 с и погрешностью ±1,5 с.

6.11 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

6.12 Фольга алюминиевая по ГОСТ 618.

6.13 Холодильник электрический бытовой по ГОСТ 16317.

6.14 Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема 1—100, 20—200, 100—1000 мм^3 по ГОСТ 28311.

6.15 Ступка фарфоровая с пестиком по ГОСТ 9147.

6.16 Стакан фарфоровый № 4 номинальной вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 9147.

6.17 Колбы мерные 1(2)—100, 1000—2 по ГОСТ 1770.

6.18 Колбы конические Кн-2—100—18 ТХС по ГОСТ 25336.

6.19 Воронки ВФ-1(2)—60—ПОР 500 ТХС по ГОСТ 25336.

6.20 Пробирки П1—14—120 ХС или П1—16—150 ХС по ГОСТ 25336.

6.21 Пипетки 1-го и 2-го классов точности 2-1(5, 50) по ГОСТ 29169.

6.22 Цилиндры мерные 3—25(100)—1 по ГОСТ 1770.

6.23 Стакан В—1—150 (100) (250) ТХС по ГОСТ 25336.

6.24 Микропробирки пластиковые вместимостью 1,5; 2,0 см^3.

6.25 Палочки стеклянные оплавленные.

6.26 Пробирки П3—5(25, 50) ХС по ГОСТ 25336.

6.27 Наконечники пластиковые одноразовые нестерильные для дозаторов объемом 200 и 1000 мм^3.

6.28 Кюветы кварцевые для спектрофотометра по ГОСТ 20903.

6.29 Емкость полиэтиленовая вместимостью 1 дм^3.

6.30 Кислота 3,5-Динитросалициловая (ДНСК) с массовой долей основного вещества не ниже 98 %.

6.31 Гуаровая камедь или камедь рожкового дерева с массовой долей основного вещества не ниже 98 %.

6.32 Краситель Кумасси G-250 (Кумасси бриллиантовый синий R-250).

6.33 Метанол, ч. д. а. по ГОСТ 6995.

6.34 Кислота ортофосфорная, х. ч. по ГОСТ 6552.

6.35 Бычий сывороточный альбумин (БСА) по ГОСТ 33674.

6.36 Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144.

6.37 Вода деионизированная (дистиллированная вода по ГОСТ Р 58144, пропущенная через колонку с ионообменными смолами по ГОСТ 20298 и ГОСТ 20301 или через установку деионизированной воды).

6.38 Гидроокись натрия, ч. д. а. по ГОСТ 4328.

6.39 Ацетат натрия (натрий уксуснокислый 3-водный), ч. д. а. по ГОСТ 199.

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

6.41 Манноза с массовой долей основного вещества не ниже 98 %.

6.42 Калий-натрий виннокислый 4-водный, ч. д. а. по ГОСТ 5845.

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

7 Подготовка к анализу

7.1 Отбор проб

Отбор проб проводят по ГОСТ Р 57248.

7.2 Подготовка пробы

Для определения ферментативной активности в мерную колбу вместимостью 100 см^3 (см. 6.17) вносят навеску сухой пробы массой (0,10 ± 0,01) г, суспендируют в небольшом количестве деионизиро-

ванной воды (до 50 $см^3$) на магнитной мешалке в течение 15 мин и доводят объем деионизированной водой до метки. Полученную суспензию центрифугируют при частоте вращения 7000 $мин^{-1}$ в течение 15 мин. Для анализа используют надосадочную жидкость.

Для жидких продуктов пробоподготовка не требуется.

7.3 Приготовление раствора гидроокиси натрия молярной концентрации c (NaOH) = 2 моль/$дм^3$

В фарфоровый стакан вместимостью 250 $см^3$ (см. 6.16) помещают (80,00 ± 0,02) г гидроокиси натрия (см. 6.38) и растворяют в 250 $см^3$ дистиллированной воды (см. 6.36). После остывания количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ (см. 6.17), доводят объем до метки дистиллированной водой (см. 6.36).

Срок хранения раствора в полиэтиленовой емкости (см. 6.29) — не более 6 мес.

7.4 Приготовление раствора 3,5-Динитросалициловой кислоты (ДНСК) массовой долей 1 %

В коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ (см. 6.18) помещают (1,000 ± 0,001) г ДНСК (см. 6.30). Колбу с навеской помещают на магнитную мешалку (см. 6.7), вносят 20 $см^3$ раствора гидроокиси натрия молярной концентрации c (NaOH) = 2 моль/$дм^3$ (см. 7.3) и 50 $см^3$ деионизированной воды (см. 6.37), закрывают колбу фольгой (см. 6.12), перемешивают до полного растворения ДНСК.

Порционно вносят 30,00 г виннокислого калия-натрия (см. 6.42). Раствор должен быть прозрачным. После полного растворения виннокислого калия-натрия раствор количественно переносят в мерный цилиндр вместимостью 100 $см^3$ (см. 6.22) с помощью стеклянной воронки (см. 6.19) и доводят деионизированной водой (см. 6.37) до метки. Затем переносят в другую чистую коническую колбу (см. 6.18) вместимостью 100 $см^3$. Переносить необходимо аккуратно, не касаясь края колбы.

Раствор хранят при комнатной температуре без доступа света в течение месяца. При наличии осадка, перед использованием реактива проводят его фильтрацию через бумажный фильтр (см. 6.11) для удаления осадка.

7.5 Приготовление раствора ацетата натрия молярной концентрации c (CH_3COONa) = 1 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ (см. 6.17) помещают (82,00 ± 0,02) г безводного ацетата натрия или (136,00 ± 0,02 г) трехводного ацетата натрия (см. 6.39), добавляют в 200—300 $см^3$ деионизированной воды (см. 6.37), перемешивают до полного растворения, затем доводят объем до метки деионизированной водой (см. 6.37).

7.6 Приготовление натрий-ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,05 моль/$дм^3$ pH 5,50

В химический стакан вместимостью 100—150 $см^3$ (см. 6.23) пипеткой вместимостью 5 $см^3$ (см. 6.21) вносят 5 $см^3$ раствора ацетата натрия молярной концентрации c (CH_3COONa) = 1 моль/$дм^3$ (см. 7.5), добавляют 80 $см^3$ деионизированной воды (см. 6.37) и доводят pH (5,50 ± 0,01). Значения pH корректируются концентрированной уксусной кислотой (см. 6.40) и раствором гидроокиси натрия с массовой концентрацией 2 моль/$дм^3$ (см. 7.3). После установления необходимого pH раствор доводят до метки деионизированной водой в мерной колбе вместимостью 100 $см^3$ (см. 6.37).

Раствор хранят в холодильнике в течение месяца.

7.7 Приготовление субстрата массовой доли 1 %

В химический стакан вместимостью 100—150 $см^3$ (см. 6.23) помещают 1,00 г субстрата (гуаровая камедь, камедь рожкового дерева) (см. 6.31) с точностью 0,02 г, вносят 100 $см^3$ буферного раствора pH 5,50 (см. 7.6), нагревают при постоянном перемешивании сначала на магнитной мешалке (см. 6.7) при температуре 50 °С—70 °С, далее помещают на водяную баню (см. 6.8) с температурой (70 ± 5) °С на 16—24 ч (см. 6.10).

Раствор хранят в холодильнике в течение месяца.

7.8 Приготовление градуировочных растворов маннозы

7.8.1 Приготовление основного градуировочного раствора маннозы молярной (массовой) концентрации 0,1 моль/дм^3 (18 мг/см^3)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 (см. 6.17) помещают (1,8000 ± 0,0001) г маннозы (см. 6.41), вносят 100 см^3 буферного раствора (с оптимальным для фермента значением pH 5,5) (см. 7.6) и перемешивают.

Растворы хранят в холодильнике в течение месяца.

7.8.2 Приготовление градуировочных растворов маннозы

Из основного градуировочного раствора маннозы (см. 7.8.1) готовят серию разведений в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Объем основного стандартного раствора маннозы молярной (массовой) концентрации 0,1 моль/дм^3 (18 мг/см^3), см^3	Объем буферного раствора, см^3	Концентрация маннозы в разведении	
		массовая, мг/см^3	молярная, ммоль/дм^3
0,05	0,95	0,9	5,0
0,1	0,9	1,8	10,0
0,15	0,85	2,7	15,0
0,2	0,8	3,6	20,0
0,25	0,75	4,5	25,0
0,3	0,7	5,4	30,0
0,35	0,65	6,3	35,0
0,4	0,6	7,2	40,0
0,5	0,5	9,0	50,0
0,6	0,4	10,8	60,0

7.9 Построение градуировочного графика

Для построения градуировочной зависимости в пробирки вместимостью 5 см^3 (см. 6.26) вносят дозатором (см. 6.14) 0,2 см^3 деионнизированной воды (см. 6.37), 0,1 см^3 градуировочного раствора маннозы (см. 7.8.2), добавляют 0,2 см^3 буферного раствора (см. 7.6) и 0,3 см^3 раствора ДНСК массовой доли 1 % (см. 7.4), нагревают на водяной бане (см. 6.8) 10 мин при температуре 98 °С. Затем добавляют 0,6 см^3 дистиллированной воды (см. 6.36), перемешивают и помещают полученный раствор в кювету для измерения оптической плотности (см. 6.28). Измеряют поглощение при 546 нм против воздуха.

По среднеарифметическим значениям оптической плотности трех измерений стандартных растворов маннозы строят градуировочный график: по оси X — табличные значения молярной концентрации маннозы в ммоль/дм^3, по оси Y — значение оптической плотности. Находят уравнение зависимости X от Y (линия тренда).

7.10 Подготовка контрольного раствора

Контрольный раствор готовят параллельно с проведением измерения градуировочных растворов.

В микропробирки вместимостью 1,5 или 2,0 см^3 (см. 6.24) вносят дозатором 0,2 см^3 деионнизированной воды (см. 6.37), 0,2 см^3 буферного раствора (см. 7.6), добавляют 0,1 см^3 раствора субстрата (см. 7.7) и 0,3 см^3 раствора ДНСК массовой доли 1 % (см. 7.4), перемешивают и выдерживают на водяной бане (см. 6.8) при температуре 98 °С в течение 10 мин. Добавляют 0,6 см^3 дистиллированной воды (см. 6.36), перемешивают и помещают полученный раствор в кювету (см. 6.28) для измерения оптической плотности. Измеряют поглощение при 546 нм против воздуха. Записывают значение оптической плотности контрольной пробы $OD_{конт}$.

8 Определение концентрации белка по методу Бредфорда

8.1 Характеристика метода

Метод определения белка по Бредфорду основан на смещении максимума поглощения оптической плотности от 470 до 595 нм, наблюдаемой вследствие связывания белка с красителем Кумасси G-250. Краситель наиболее активно связывается с остатками аргинина и лизина белка.

8.2 Приготовление основного раствора Кумасси G-250

В химический стакан вместимостью 150—250 $см^3$ помещают (0,0500 ± 0,0005) г красителя Кумасси G-250 (см. 6.32), пипеткой вместимостью 50 $см^3$ (см. 6.21) вносят 50 $см^3$ метанола (см. 6.33) и растворяют. Затем к этому раствору аккуратно, при постоянном перемешивании добавляют 100 $см^3$ ортофосфорной кислоты (см. 6.34). При добавлении кислоты окраска раствора из синего должна перейти в коричневый.

8.3 Приготовление рабочего раствора Кумасси G-250

В мерный цилиндр вместимостью 100 $см^3$ (см. 6.22) вносят 20 $см^3$ основного раствора Кумасси G-250 (см. 8.2) и доводят до метки дистиллированной водой (80 $см^3$) (см. 6.36).

Полученный светло-коричневый раствор фильтруют через бумажный фильтр (см. 6.11).

8.4 Приготовление серии растворов для построения градуировочного графика

Приготовление раствора 1. Взвешивают (0,2000 ± 0,0005) г БСА (см. 6.35), переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ (см. 6.17), добавляют 50—60 $см^3$ дистиллированной воды (см. 6.36), перемешивают до полного растворения, затем доводят объем до метки дистиллированной водой (концентрация раствора 2 мг/$см^3$).

В микропробирки (см. 6.24) дозатором (см. 6.14) вносят:

- раствор 2 (1,33 мг/$см^3$): 1000 $мм^3$ раствора 1 + 500 $мм^3$ дистиллированной воды;
- раствор 3 (0,89 мг/$см^3$): 1000 $мм^3$ раствора 2 + 500 $мм^3$ дистиллированной воды;
- раствор 4 (0,59 мг/$см^3$): 1000 $мм^3$ раствора 3 + 500 $мм^3$ дистиллированной воды;
- раствор 5 (0,39 мг/$см^3$): 1000 $мм^3$ раствора 4 + 500 $мм^3$ дистиллированной воды;
- раствор 6 (0,26 мг/$см^3$): 1000 $мм^3$ раствора 5 + 500 $мм^3$ дистиллированной воды;
- раствор 7 (0,17 мг/$см^3$): 1000 $мм^3$ раствора 6 + 500 $мм^3$ дистиллированной воды.

8.5 Построение градуировочного графика

Градуировочный график строят по БСА.

От каждого раствора (см. 8.4) отбирают в чистые сухие стеклянные пробирки (см. 6.20) по 100 $мм^3$ аликвоты, для холостой пробы берут 100 $мм^3$ дистиллированной воды (см. 6.36). В каждую из пробирок пипеткой (см. 6.21) добавляют 5 $см^3$ рабочего раствора Кумасси G-250 (см. 8.3).

Переворачивают пробирки три-четыре раза для перемешивания и оставляют на 25 мин (см. 6.10) для развития окраски. Время необходимо засекать с момента добавления красителя в первую пробирку (начинают с холостой), располагают пробирки по мере увеличения концентрации БСА.

После истечения 25 мин строят градуировочный график при длине волны 595 нм на спектрофотометре (см. 6.2) с учетом холостой пробы. На оси абсцисс X откладывают значения концентрации БСА, мг/$см^3$, на оси ординат Y — соответствующее значение оптической плотности. Градуировочный график при смене партии реактивов или замене прибора строят заново.

В чистые сухие пробирки дозатором (см. 6.14) вносят 100 $мм^3$ пробы, для холостой пробы — 100 $мм^3$ дистиллированной воды (см. 6.36). Далее в каждую из пробирок пипеткой (см. 6.21) добавляют 5 $см^3$ рабочего раствора Кумасси G-250 (см. 8.3); переворачивают пробирки три-четыре раза для перемешивания и оставляют на 25 мин (см. 6.10) для развития окраски.

После истечения 25 мин измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 595 нм (см. 6.2) с учетом холостой пробы.

Результаты измерения (мг/$см^3$) автоматически будут выведены в программе. Если полученное значение превышает допустимый предел 2 мг/$см^3$, пробу необходимо разбавить [например, к 100 $мм^3$ раствора пробы (см. 7.2) добавить 300 $мм^3$ дистиллированной воды (см. 6.36), т. е. провести разбавление в четыре раза], а полученный после результат умножают в соответствии с разбавлением.

9 Анализ подготовленных проб

9.1 Проведение измерений пробы

В одну микропробирку вместимостью 1,5; 2,0 см^3 (см. 6.24) вносят дозатором (см. 6.14) 0,2 см^3 субстрата массовой доли 1 % (см. 7.7), добавляют 0,1 см^3 раствора образца (см. 7.2), перемешивают и помещают на водяную баню (см. 6.8) при температуре 60 °С на 10—30 мин (см. 6.9).

После термостатирования в пробирку добавляют 0,3 см^3 раствора ДНСК массовой доли 1 % (см. 7.4), перемешивают и выдерживают на водяной бане (см. 6.8) при температуре 98 °С в течение 10 мин (см. 6.9). Добавляют 0,6 см^3 деионизированной воды (см. 6.37), перемешивают и помещают полученный раствор в кювету для измерения оптической плотности (см. 6.28). Измеряют поглощение при 546 нм против воздуха. Записывают значение оптической плотности опытной пробы $OD_{опыт}$.

Значения оптической плотности должны попадать в диапазон калибровочной кривой от 0,15 до 0,7 оптических единиц.

9.2 Определение активности фермента

Разность оптических плотностей опытной и контрольной проб ΔOD вычисляют по формуле

$$\Delta OD = OD_{опыт} - OD_{конт}, \quad (1)$$

где $OD_{опыт}$ — оптическая плотность опытной пробы;

$OD_{конт}$ — оптическая плотность контрольной пробы.

Далее по калибровочному графику определяют соответствующее значение концентрации маннозы C, мкмоль/см^3.

Активность фермента A, мкмоль/(мин · г) [мкмоль/(мин · см^3)], вычисляют по формуле

$$A = \frac{C \cdot N}{m \cdot t}, \quad (2)$$

где N — объем общего разведения ферментного препарата, см^3;

m — масса навески ферментного препарата, г;

t — время реакции, мин.

9.3 Удельную активность фермента $A_{уд}$, мкмоль/(мин·г) [мкмоль/(мин·см^3)], вычисляют по формуле

$$A_{уд} = \frac{A}{C_б}, \quad (3)$$

где A — активность фермента, мкмоль/(мин · г) [мкмоль/(мин · см^3)];

$C_б$ — концентрация белка, добавленного в реакционную смесь, измеренная по 7.11, мг/см^3.

10 Контроль точности результатов измерений маннаназной активности

Результаты измерений, полученные в условиях воспроизводимости, признаются удовлетворительными, если выполняется условие приемлемости

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 R \bar{X}, \quad (4)$$

где X_1 и X_2 — результаты двух определений, выполненных в двух разных лабораториях, мг/см^3;

R — предел воспроизводимости, равный 10 %;

$\bar{X}$ — среднеарифметическое значение двух определений, выполненных в двух разных лабораториях, мг/см^3.

УДК 577.15:543.06:006.354

ОКС 07.080
07.100.30

Ключевые слова: ферментные препараты, активность маннаназы, ферментативный гидролиз, субстрат

Редактор *Е.В. Якубова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

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. 1,26.

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