ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57646— 2026

Добавки пищевые

НИЗИН Е234

Технические условия

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2026

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Обществом с ограниченной ответственностью «Бавар+» (ООО «Бавар+»), 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 13 апреля 2026 г. № 353-ст

4 ВЗАМЕН ГОСТ Р 57646—2017

*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», 2026

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 3
4 Технические требования 3
5 Требования безопасности производства 6
6 Правила приемки 6
7 Методы контроля 6
8 Транспортирование и хранение 8
Приложение А (обязательное) Методы испытаний пищевой добавки низин (Е234): определение количественного содержания основного вещества низина в образцах пищевой добавки низин (Е234) и определение стабильности низина в кислых и щелочных условиях методом микробиологического анализа 9
Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендуемый депозитарий для тест-штамма, используемого для выполнения испытаний 16
Приложение В (рекомендуемое) Форма таблицы регистрации результатов 17
Библиография 19

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Добавки пищевые

НИЗИН Е234

Технические условия

Food additives. Nisin E234. Specifications

Дата введения — 2026—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевую добавку низин Е234 микробного происхождения, содержащую активное вещество низин, вырабатываемый молочнокислыми микроорганизмами *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, для применения в промышленности в качестве консерванта.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 8.579 Государственная система обеспечения единства измерений. Требования к количеству фасованных товаров при их производстве, фасовании, продаже и импорте

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 12.1.008 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

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

ГОСТ 12.2.003 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.3.002 Система стандартов безопасности труда. Процессы производственные. Общие требования безопасности

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

ГОСТ 12.4.028 Система стандартов безопасности труда. Респираторы ШБ-1 «Лепесток». Технические условия

ГОСТ 12.4.103 Система стандартов безопасности труда. Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация

ГОСТ 12.4.253 (EN 166:2002) Система стандартов безопасности труда. Средства индивидуальной защиты глаз и лица. Общие технические требования

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

ГОСТ 2493 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 10444.11 (ISO 15214:1998) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 10444.15 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ГОСТ 13511 Ящики из гофрированного картона для пищевых продуктов, спичек, табачных изделий и моющих средств. Технические условия

ГОСТ 15113.4 Концентраты пищевые. Гравиметрические методы определения массовой доли влаги

ГОСТ 15113.7 Концентраты пищевые. Методы определения поваренной соли

ГОСТ 15846 Продукция, отправляемая в районы Крайнего Севера и приравненные к ним местности. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 17299 Спирт этиловый технический. Технические условия

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

ГОСТ 20010 Перчатки резиновые технические. Технические условия

ГОСТ 26669 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26927 Сырье и продукты пищевые. Методы определения ртути

ГОСТ 26930 Сырье и продукты пищевые. Методы определения мышьяка

ГОСТ 26932 Сырье и продукты пищевые. Методы определения свинца

ГОСТ 27025 Реактивы. Общие указания по проведению испытаний

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

ГОСТ 30178 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов

ГОСТ 30538 Продукты пищевые. Методика определения токсичных элементов атомно-эмиссионным методом

ГОСТ 30726 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида Escherichia coli

ГОСТ 31266 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка

ГОСТ 31628 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрический метод определения массовой концентрации мышьяка

ГОСТ 31659 (ISO 6579-1:2017) Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод обнаружения, подсчета и серотипирования бактерий рода Salmonella. Часть 1. Обнаружение Salmonella spp

ГОСТ 31747 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 34427 Продукты пищевые и корма для животных. Определение ртути методом атомно-абсорбционной спектрометрии на основе эффекта Зеемана

ГОСТ 34757 Упаковка. Маркировка, указывающая на способ обращения с грузами

ГОСТ EN 14083 Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение свинца, кадмия, хрома и молибдена с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии с атомизацией в графитовой печи с предварительной минерализацией пробы при повышенном давлении

ГОСТ EN 14084 Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение содержания свинца, кадмия, цинка, меди и железа с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии после микроволнового разложения

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

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

ГОСТ Р 51766 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка

ГОСТ Р 53183 (ЕН 13806:2002) Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение ртути методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара с предварительной минерализацией пробы под давлением

ГОСТ Р 55878 Спирт этиловый технический гидролизный ректификованный. Технические условия

ГОСТ Р 57233 Продукция микробиологическая. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 57234 Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ Р 70152 Качество воды. Методы внутреннего лабораторного контроля качества проведения микробиологических и паразитологических исследований

ГОСТ Р 70295 Глюкоза кристаллическая. Технические условия

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 [1], [2], а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **низин:** Смесь природных близкородственных антимикробных полипептидов, вырабатываемых штаммами *Lactococcus lactis* subsp. *lactis.*

Примечание — Основным вариантом низина, синтезируемым *Lactococcus lactis* subsp. *lactis,* является низин А.

3.2 **пищевая добавка низин (Е234):** Стандартизированная форма низина, вырабатываемая в виде сухого концентрата, содержащего: чистое вещество низин, не менее 22,5 мкг/мг (биологическая активность не менее 900 МЕ/мг); наполнитель хлористый натрий, не менее 50 %, а также остаточные продукты ферментации: белки и углеводы.

Примечание — Биологическая активность низина измеряется в международных единицах (МЕ), одна МЕ низина эквивалентна 0,025 мкг чистого вещества низина, удельная биологическая активность которого составляет 40 000 МЕ/мг.

4 Технические требования

4.1 Характеристики

4.1.1 Пищевая добавка низин (Е234) должна соответствовать требованиям настоящего стандарта и изготавливаться по технической документации с соблюдением требований и норм, установленных в [2] и других нормативных правовых актах, действующих на территории Российской Федерации и распространяющихся на данный вид продукции.

4.1.2 Пищевая добавка низин (Е234) производится в виде стандартизированного концентрата низина (далее — концентрат низина) для применения в промышленности в качестве консерванта согласно [2]. Стандартизированная форма концентрата низина вырабатывается в сухом виде и содержит: чистое вещество низин, не менее 22,5 мкг/мг (биологическая активность не менее 900 МЕ/мг); наполнитель хлористый натрий, не менее 50 %, а также остаточные продукты ферментации: белки и углеводы. Низин вырабатывается в условиях ферментации штаммами *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, с последую-

щими стадиями выделения, очистки, концентрирования, распылительной сушки и стандартизации для получения готовой формы пищевой добавки низин (Е234). Удельная биологическая активность низина, выраженная в международных единицах (МЕ), составляет 40 000 МЕ/мг, одна МЕ низина эквивалентна 0,025 мкг чистого вещества низина.

По органолептическим и физико-химическим показателям пищевая добавка низин (Е234) должна соответствовать требованиям, указанным в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика или значение показателя	Метод испытания
Внешний вид	Порошок однородный	По 7.2
Цвет	От белого до светло-коричневого	По 7.2
Массовая доля влаги, %, не более	4,0	По 7.3
Содержание основного вещества низина: - в единицах биологической активности, МЕ/мг, не менее - в массовое содержание (мкг/мг)*, не менее	 900,0 22,5	По 7.4.1
Стабильность низина в кислых условиях	Сохранение биологической активности на уровне 100 % от исходного значения (с учетом погрешности измерения) после кипячения в течение 5 мин в растворе 0,02 н соляной кислоты с содержанием низина 0,05 мг/см^3 (биологическая активность 50 МЕ/см^3)	По 7.4.2
Стабильность низина в щелочных условиях	Полная потеря биологической активности низина после выдержки при температуре 65 °С в течение 30 мин в щелочном растворе при pH = 11,0 с содержанием низина 0,05 мг/см^3 (биологическая активность 50 МЕ/см^3)	По 7.4.3
Хлорид натрия, %, не менее	50,0	По 7.5
* 1 мг чистого низина соответствует 40 000 МЕ.		

4.1.3 По микробиологическим показателям пищевая добавка низин (Е234) должна соответствовать требованиям, указанным в таблице 2.

Таблица 2

Наименование показателя	Характеристика или значение показателя	Метод испытания
Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), КОЕ/г, не более	10	По 7.6
Бактерии группы кишечных палочек (колиформные бактерии), в массе продукта	В 0,3 г не допускаются	По 7.7
Escherichia coli, в массе продукта	В 25 г не допускаются	По 7.8
Патогенные, в т. ч. сальмонеллы, в массе продукта	В 25 г не допускаются	По 7.9
Жизнеспособные клетки продуцента (молочнокислые микроорганизмы *Lactococcus lactis*), в массе продукта	В 1 г не допускаются	По 7.10

4.1.4 Содержание токсичных элементов в пищевой добавке низин (Е234) должно соответствовать требованиям таблицы 3.

Таблица 3

Токсичные элементы	Допустимые уровни, мг/кг, не более	Метод испытания
Свинец	5	По 7.11
Мышьяк	1	По 7.12
Ртуть	1	По 7.13

4.2 Требования к сырью

4.2.1 Сырье и материалы, используемые для изготовления пищевой добавки низин (Е234), должны быть разрешены для использования в пищевой промышленности и соответствовать требованиям, установленным в [1], [2], [3].

4.2.2 Для производства пищевой добавки низин (Е234) используют сырье (сухое): обезжиренное молоко и отдельные компоненты, полученные из него, дрожжевой экстракт, углеводы и вспомогательные материалы, указанные в технологическом регламенте.

4.2.3 Допускается использовать технологические вспомогательные средства, разрешенные к применению в пищевой промышленности и соответствующие требованиям [2].

4.3 Маркировка

4.3.1 Маркировка пищевой добавки низин (Е234) должна соответствовать требованиям [2], [4], в наименовании продукции указывается «Пищевая добавка Низин (Е234)», дополнительно наносится надпись «Не для розничной продажи».

На каждой упаковочной единице (банках или пакетах) должна быть маркировка с изображением манипуляционных знаков «Беречь от влаги», «Беречь от солнечных лучей».

4.3.2 Маркировка транспортной упаковки должна соответствовать требованиям [4] и может быть дополнена манипуляционными знаками «Беречь от влаги», «Беречь от солнечных лучей», принятыми для маркировки транспортной упаковки грузов по ГОСТ 34757.

4.4 Упаковка

4.4.1 Используемые для упаковывания материалы и транспортная упаковка должны соответствовать требованиям [5] и документам, в соответствии с которыми они произведены, обеспечивать сохранность качества и безопасности в течение срока годности продукции при соблюдении условий транспортирования, хранения и реализации.

4.4.2 Упаковку и маркировку пищевой добавки низин (Е234) проводят в соответствии с ГОСТ Р 57234.

4.4.3 Пищевую добавку низин (Е234) фасуют в банки из полиэтилена высокого давления (ПВД) с закручивающейся крышкой, снабженные контролем первого вскрытия, допускается фасовать в фольгированные пакеты типа дой-пак и зип-пакет из комбинированных материалов с внутренним полимерным слоем, массой нетто: 50, 100, 500 и/или 1000 г. Способ упаковки должен обеспечивать герметичность упаковки, защиту от солнечных лучей и сохранность качества продукта. Упаковка должна быть изготовлена из материалов, разрешенных для контакта с пищевыми продуктами в соответствии с [5].

4.4.4 Масса нетто упаковочной единицы (банки или пакеты), должна соответствовать номинальной массе, указанной в маркировке, с учетом допускаемых отклонений.

Пределы допускаемых отрицательных отклонений массы продукта от номинального количества в единице упаковки должны соответствовать требованиям ГОСТ 8.579.

4.4.5 Упаковочные единицы (банки или пакеты) (см. 4.4.3) укладывают в транспортную упаковку с соблюдением мер, исключающих возможность повреждения при перевозке. Транспортная упаковка должна обеспечивать безопасность, целостность и соблюдение условий хранения при транспортировании.

4.4.6 В качестве транспортной упаковки используют ящики из гофрированного картона по ГОСТ 13511.

4.4.7 Допускается применение других видов упаковки и упаковочных материалов, разрешенных для упаковки и реализации пищевой продукции по качеству не ниже указанных.

5 Требования безопасности производства

5.1 Общие требования безопасности производственных процессов — по ГОСТ 12.1.008, ГОСТ 12.3.002.

5.2 Требования к воздуху рабочей зоны — по ГОСТ 12.1.005.

5.3 Средства защиты должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.4.103. При работе с концентратом низина необходимо применять индивидуальные средства защиты отечественного производства: респиратор ШБ-1 «Лепесток» по ГОСТ 12.4.028, защитные очки по ГОСТ 12.4.253, резиновые перчатки по ГОСТ 20010 или импортные с аналогичными или лучшими характеристиками; необходимо следует соблюдать меры личной гигиены.

5.4 Производственное оборудование должно отвечать требованиям ГОСТ 12.2.003.

6 Правила приемки

6.1 Правила приемки пищевой добавки низин (Е234) — по ГОСТ Р 57233.

6.2 Пищевую добавку низин (Е234) принимают партиями. Партией считается любое количество продукции, изготовленное за один технологический цикл, однородное по показателям качества и оформленное одним документом о качестве, обеспечивающим прослеживаемость продукции.

В документе о качестве указывают:

- наименование организации, в систему которой входит предприятие-изготовитель;
- наименование предприятия-изготовителя и (или) его товарный знак;
- наименование продукта;
- номер партии;
- количество упаковочных единиц в партии;
- массу нетто упаковочной единицы;
- дату выработки (год, месяц, число);
- показатели качества (результаты испытаний);
- дату выдачи документа о качестве;
- гарантийный срок и условия хранения;
- обозначение настоящего стандарта.

6.3 Порядок и периодичность контроля показателей качества и безопасности устанавливает изготовитель продукции с учетом требований [2] и настоящего стандарта, и осуществляет систематически в соответствии с программой производственного контроля, утвержденной в установленном порядке.

6.4 Для контроля качества и проверки соответствия продукции требованиям настоящего стандарта, технической документации и нормативных правовых актов проводят приемо-сдаточные испытания методом выборочного контроля для каждой партии пищевой добавки низин (Е234) по качеству упаковки, соответствию маркировки, массе продукта, органолептическим и физико-химическим показателям.

Объем выборки определяется в зависимости от общего количества упаковочных единиц (банок или пакетов), в партии в соответствии с ГОСТ Р 57233.

6.5 При неудовлетворительных результатах испытаний хотя бы по одному показателю по нему проводят повторные испытания на удвоенном количестве выборки, взятой от той же партии продукции.

Результаты испытаний распространяют на всю партию.

7 Методы контроля

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 31904.

7.1.2 Перед отбором точечных проб визуально оценивают внешний вид транспортной упаковки и упаковочных единиц (банок или пакетов), попавших в выборку. При этом проверяют соответствие упаковки требованиям [5] и настоящего стандарта, правильность маркировки, наличие или отсутствие дефектов упаковки, ее герметичность.

7.1.3 От каждой отобранной единицы упаковки, попавшей в выборку, отбирают точечные пробы. Точечные пробы смешивают вместе и получают объединенную пробу массой достаточной, чтобы объединенная проба составляла не менее 200 г.

7.1.4 Объединенную пробу делят пополам и помещают отдельно в герметично закрывающиеся стерильные контейнеры или в стерильные полиэтиленовые пакеты, снабженные замком (например, зип-замок или зажим).

Одну пробу передают в лабораторию для анализа качества пищевой добавки низин (Е234), а другую пробу хранят в течение срока годности пищевой добавки низин (Е234) на случай разногласий в оценке качества.

7.1.5 Пробы, направляемые в лабораторию или на хранение, опечатывают и снабжают этикеткой с указанием:

- наименования пищевой добавки;
- обозначения НТД на продукцию;
- наименования предприятия-изготовителя и (или) его товарного знака;
- номера партии;
- массы нетто партии;
- даты отбора пробы;
- должности и подписи лица, отбиравшего пробу;
- гарантийного срока хранения.

7.2 Определение внешнего вида

Для определения внешнего вида и цвета часть объединенной пробы помещают на лист белой бумаги и рассматривают при дневном рассеянном свете или ярком искусственном освещении.

7.3 Определение массовой доли влаги

Определение массовой доли влаги проводят по ГОСТ 15113.4.

7.4 Определение низина

7.4.1 Методика испытаний — определение количественного содержания основного вещества низина в образцах пищевой добавки низин (Е234)

Определение низина проводят микробиологическим методом диффузии в агар с тест-культурой *Heyndrickxia coagulans* штамм ВКПМ В-15356. Методика представлена в А.3.

7.4.2 Определение стабильности низина в кислых условиях

Низин стабилен в кислом растворе 0,02 н HCl при кипячении в течение 5 мин, что отличает его от других антимикробных веществ и подтверждает подлинность бактериоцина низина.

Методика определения стабильности низина в кислых условиях представлена в А.4.

7.4.3 Определение стабильности низина в щелочных условиях

Низин полностью теряет активность в щелочном растворе с pH 11 при прогреве в течение 30 мин при температуре 65 °С, что отличает его от других антимикробных веществ и подтверждает подлинность бактериоцина низина.

Методика определения стабильности низина в щелочных условиях представлена в А.5.

7.5 Определение хлорида натрия

Определение хлорида натрия проводят по ГОСТ 15113.7.

7.6 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов

Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов — по ГОСТ 10444.15.

7.7 Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

Наличие бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) определяют по ГОСТ 31747.

7.8 Определение *Escherichia coli*

Наличие *Escherichia coli* определяют по ГОСТ 30726.

7.9 Определение патогенных, в т. ч. сальмонелл

Наличие патогенных, в т. ч. сальмонеллы, определяют по ГОСТ 31659.

7.10 Определение молочнокислых микроорганизмов

Наличие жизнеспособных клеток продуцента — молочнокислых микроорганизмов *Lactococcus lactis* определяют по ГОСТ 10444.11.

7.11 Определение содержания свинца

Содержание свинца определяют по ГОСТ 26932, ГОСТ 30178, ГОСТ 30538, ГОСТ EN 14083, ГОСТ EN 14084.

7.12 Определение содержания мышьяка

Содержание мышьяка определяют по ГОСТ 26930, ГОСТ 30538, ГОСТ 31628, ГОСТ Р 51766.

7.13 Определение содержания ртути

Содержание ртути определяют по ГОСТ 26927, ГОСТ 34427, ГОСТ Р 53183.

7.14 При проведении испытаний допускается применять другие аттестованные методы анализа, за исключением методов в 7.4, обеспечивающие достоверность результатов измерений, в т. ч. включенные в технические регламенты, международные, межгосударственные и национальные стандарты, содержащие правила и методы исследований и измерений и действующие на территории государства, принявшего стандарт.

8 Транспортирование и хранение

8.1 Пищевую добавку низин (Е234) в транспортной упаковке транспортируют всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок грузов, действующими на соответствующем виде транспорта, согласно [2] в условиях, обеспечивающих сохранность продукта в течение всего срока транспортирования.

8.2 При погрузке, выгрузке продукция должна быть защищена от воздействия атмосферных осадков.

8.3 Пищевую добавку низин (Е234) хранят в чистых, сухих, вентилируемых помещениях, при контролируемой относительной влажности не более 75 % и температуре окружающего воздуха не выше 20 °С.

8.4 Срок годности и условия хранения пищевой добавки низин (Е234) устанавливает изготовитель.

8.5 Не допускается совместное хранение пищевой добавки низин (Е234) с ядовитыми веществами и остро пахнущими продуктами.

8.6 Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение продукции, отправляемой в районы Крайнего Севера и приравненные к ним местности, — по ГОСТ 15846.

Приложение А
(обязательное)

Методы испытаний пищевой добавки низин (Е234): определение количественного содержания основного вещества низина в образцах пищевой добавки низин (Е234) и определение стабильности низина в кислых и щелочных условиях методом микробиологического анализа

Сущность метода определения содержания основного (чистого) вещества низина в образце пищевой добавки низин (Е234) (далее — испытуемый образец низина) заключается в сравнении зон задержки роста тест-культуры *Heyndrickxia coagulans* (штамм ВКПМ В-15356) ингибирующим действием низина в испытуемом образце низина и в стандартном образце. Методика предназначена для количественного определения содержания основного вещества низина в образце пищевой добавки низин (Е234) в линейном диапазоне логарифмической зависимости размеров зон угнетения роста тест-штамма от концентрации низина в калибровочном диапазоне 1,25—10 МЕ/см^3.

Подтверждение подлинности бактериоцина низина проводят в тестах на стабильность низина в кислых и щелочных условиях при нагревании. Биологическая активность низина сохраняется в 0,02\н растворе соляной кислоты при кипячении в течение 5 мин и полностью инактивируется в щелочном растворе с pH 11 при термостатировании при 65 °С в течение 30 мин в отличие от других бактериоцинов.

А.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы:

- дозатор механический одноканальный с переменным объемом от 0,02 до 0,2 см^3 с допустимой относительной погрешностью дозирования не более ±(2,0—1,5) %, с одноразовыми наконечниками;
- дозатор механический одноканальный с переменным объемом от 0,1 до 1 см^3 с допустимой относительной погрешностью дозирования не более ±(2,0—1,5) %, с одноразовыми наконечниками;
- дозатор механический одноканальный с переменным объемом от 1 до 5 см^3 с допустимой относительной погрешностью дозирования не более ±1,0 %, с одноразовыми наконечниками;
- весы специального (I) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом не более 1 мг и действительной ценой деления d не более 0,1 мг;
- весы неавтоматического действия высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности взвешивания не более ±0,01 г;
- колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 50, 100, 250, 1000 см^3 по ГОСТ 1770;
- pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений не более pH ±0,1;
- стандартный образец мутности бактериальных взвесей, соответствующий 10 МЕ;
- цилиндры мерные 100, 250 см^3 по ГОСТ 1770 или импортные;
- электронный штангенциркуль, обеспечивающий точность измерения до 0,1 мм;
- баня водяная, позволяющая поддерживать температуру 40 °С — 65 °С с точностью ±1 °С;
- бокс биологической защиты класса II;
- вортекс лабораторный для пробирок;
- мешалка магнитная;
- облучатель бактерицидный;
- плита электрическая (кроме инфракрасных и индукционных);
- стерилизатор паровой, обеспечивающий режим стерилизации при температуре (121 ± 1) °С;
- термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру в диапазоне 40 °С — 55 °С с точностью ±1 °С;
- холодильник, позволяющий поддерживать рабочую температуру 2 °С — 8 °С;
- шкаф (стол) лабораторный;
- шкаф сушильный стерилизационный, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С;
- зонд-тампоны ватные стерильные;
- колбы конические термостойкие вместимостью 250, 500 см^3;
- палочки стеклянные;
- пробирки стеклянные типов П1-16-150, П2-16-150 и центрифужные П-1-10 по ГОСТ 25336;
- петля бактериологическая или одноразовые стерильные;
- пипетки серологические градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 см^3 стеклянные по ГОСТ 29227 или импортные;
- пипетки серологические градуированные из полимерного материала, вместимостью 1, 2, 5, 10 см^3, стерильные;
- пинцет;
- пробойник (просечка) для формирования лунок в агаре диаметром 7 мм (например, типа ПЛ-7);
- спиртовки лабораторные;
- стаканы стеклянные вместимостью 100, 250, 500 см^3;
- столик специальный с горизонтальным уровнем;
- флаконы стеклянные термоустойчивые с винтовыми пластиковыми крышками вместимостью 100 см^3;

- чашки биологические (Петри) стеклянные или одноразовые из полимерных материалов, диаметром 90—100 мм;
- чашки биологические (Петри) (кюветы) стеклянные или одноразовые из полимерных материалов, круглые диаметром не менее 150 мм или квадратные размером 245 × 245 мм;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206 или импортный;
- вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144;
- глюкоза кристаллическая по ГОСТ Р 70295 или импортная;
- дрожжевой экстракт, сухой;
- калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный, х.ч., по ГОСТ 2493 или импортный;
- калий фосфорнокислый однозамещенный, х.ч., по ГОСТ 4198 или импортный;
- кислота соляная, концентрированная, х.ч., по ГОСТ 3118 или импортная;
- натрия гидроокись (гидроксид натрия), х.ч., по ГОСТ 4328 или импортная;
- натрий хлористый, х.ч., по ГОСТ 4233 или импортный;
- пептон соевый, сухой;
- спирт этиловый, 96 %-ный по ГОСТ 17299 или ГОСТ Р 55878;
- стандарт-титр кислота соляная 0,1 моль/дм^3 (0,1 н.);
- твин-80;
- триптон, сухой;
- триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (ТСАДЭ), сухой;
- триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (ТСБДЭ), сухой;
- ферментативный гидролизат казеина, сухой;
- Стандартный образец (СО), вторичный стандартный образец (ВСО) или стандартный образец предприятия (СОП) (стандартизированный концентрат) низина с биологической активностью не менее 1000 МЕ/мг с сертификатом анализа на данную партию;
- тест-культура *H. coagulans* штамм ВКПМ В-15356.

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, по качеству не ниже указанных, за исключением тест-культуры, рекомендуемый депозитарий для которой представлен в приложении Б.

Питательные среды и реагенты должны соответствовать нормативным документам или документам производителя. Приготовление и контроль качества питательных сред осуществляют в соответствии с ГОСТ ISO 11133.

А.2 Подготовка к испытанию

А.2.1 Отбор и подготовку проб испытуемого образца низина проводят в соответствии с ГОСТ 31904, ГОСТ 26669, ГОСТ ISO 7218.

А.2.2 Подготовка лабораторной посуды — по ГОСТ ISO 7218.

Подготавливают стерильные стеклянные пробирки, стерильные стеклянные чашки Петри, стерильные стеклянные пипетки.

Для выполнения разведений растворов низина подготавливают стеклянные центрифужные пробирки вместимостью 10 см^3, для этого чистые пробирки обрабатывают кипячением в дистиллированной воде в течение не менее 10 мин, после высушивают.

А.2.3 Приготовление 0,02 н раствора соляной кислоты

Из стандарт-титра 0,1 н соляной кислоты (HCl) готовят 0,1 н раствор в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 см^3. Из 0,1 н раствора HCl готовят 0,02 н раствор HCl путем разбавления в пять раз в дистиллированной воде, раствор готовят в необходимом количестве.

А.2.4 Приготовление 1 н раствора соляной кислоты

Из стандарт-титра 0,1 н соляной кислоты (HCl) готовят 1 н раствор в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3.

Готовый раствор хранят в плотно закрытой стеклянной колбе или склянке. При приготовлении растворов следует соблюдать требования ГОСТ 27025.

А.2.5 Приготовление изотонического раствора хлористого натрия

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают (8,5 ± 1) г хлористого натрия. Добавляют дистиллированную воду и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят дистиллированной водой до метки. Полученный раствор разливают по 100 см^3 в колбы или флаконы соответствующей вместимости, укупоривают и автоклавируют при (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

Готовый стерильный изотонический раствор допускается хранить до 3 мес при температуре 2 °С — 8 °С.

А.2.6 Приготовление калий-фосфатного буфера

Навески калия фосфорнокислого двузамещенного 3-водного 0,12 г и калия фосфорнокислого однозамещенного — 6,664 г растворяют в 1000 см^3 дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3, контролируют pH, значение pH = 5,1—5,2.

Раствор используют для приготовления агаризованной питательной среды для анализа низина (см. А.2.10.2).

При необходимости калий-фосфатный буфер автоклавируют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

Готовый стерильный раствор хранят в защищенном от света месте до 3 мес при температуре 2 °С — 8 °С.

А.2.7 Приготовление 5 н раствора гидроокиси натрия

Навеску (20 ± 0,1) г сухой гидроокиси натрия растворяют при перемешивании в объеме 50—70 см^3 дистиллированной воды в стеклянном термостойком стакане до полного растворения и охлаждают до комнатной температуры. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Готовый раствор хранят в плотно закрытой стеклянной колбе или склянке. При приготовлении растворов следует соблюдать требования ГОСТ 27025.

А.2.8 Подготовка стандартных растворов низина

В процессе приготовления растворов низина используют стеклянные центрифужные пробирки, автоматические дозаторы, вортекс для перемешивания, не допускается воздействие прямых солнечных лучей на растворы низина.

При дозировании отбор и выдачу доз необходимо проводят в соответствии с регламентом, установленным для дозаторов конкретного типа. Перед началом основного дозирования необходимо смочить наконечник путем неоднократного забора и сброса жидкости.

Перемешивание растворов проводят при минимальных режимах, обеспечивающих перемешивание, повышенная аэрация растворов может приводить к инактивации низина.

А.2.8.1 Приготовление основного стандартного раствора низина с содержанием стандартизованного концентрата низина 1,0 мг/см^3

Основной стандартный раствор (ОРС) низина 1,0 мг/см^3 готовят из стандартизованного концентрата низина (СО или ВСО) с известной биологической активностью не менее 1000 МЕ/мг, допускается использование стандартного образца предприятия низина (СОП). Навеску (250 ± 0,1) мг сухого стандартизованного концентрата низина растворяют в 0,02 н растворе HCl в мерной колбе вместимостью 250 см^3, раствор термостатируют при (55 ± 1) °С в течение 1 ч, после охлаждают до комнатной температуры в защищенном от света месте.

Таким образом получают ОРС с содержанием 1,0 мг/см^3 низина, что соответствует биологической активности низина не менее 1000 МЕ/см^3. ОСР используют в течение дня, хранению не подлежит.

А.2.8.2 Стандартные растворы низина для калибровочной кривой

Стандартные растворы низина (С1—С4) готовят в двух повторностях (параллельные разведения) (С1.1/С1.2—С4.1/С4.2) из ОСР путем разведения в 0,02 н растворе HCl.

Стандартный раствор С1 с концентрацией 0,01 мг/см^3 (биологическая активность 10 МЕ/см^3) готовят следующим образом: 1 см^3 ОРС (см. А.2.8.1) вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доливают до метки 0,02 н раствором HCl, тщательно перемешивают. Далее готовят стандартные растворы С2—С4 по схеме, приведенной в таблице А.1.

Таблица А.1 — Схема приготовления стандартных растворов низина и растворов испытуемого образца

Обозначение раствора	Фактор разбавления F	Концентрация низина в стандартных растворах, c_{st}		Соотношение		
				Растворы низина		Раствор 0,02 н HCl
		по сухому веществу, мг/см^3	по биологической активности*, МЕ/см^3	Обозначение	Объем, см^3	Объем, см^3
С1/И1	100	0,01	10	ОРС/ОРИ	1	99
С2/И2	200	0,005	5,0	С1/И1	1	1
С3/И3	400	0,0025	2,5	С2/И2	1	1
С4/	800	0,00125	1,25	С3/	1	1
* Ориентировочные значения для СО с активностью не менее 1000 МЕ/мг.						

Стандартные растворы (С1—С4) с содержанием низина 1,25; 2,5; 5,0; 10 МЕ/см^3 используют в качестве калибровочных в анализе. Стандартные растворы используют в течение дня, хранению не подлежат.

А.2.9 Подготовка растворов испытуемого образца низина

Для каждого испытуемого образца низина проводят три параллельных определения, для этого из каждого образца низина готовят точно три навески А, Б и В аналогично процедуре по А.2.8.1. Далее готовят основные растворы испытуемых образцов низина (ОРИ) с концентрацией 1,0 мг/см^3 таким же образом, как ОРС (см. А.2.8.1).

Растворы испытуемых образцов (И1—И3) для каждой навески готовят в двух параллельных разведениях (А1/А2, Б1/Б2, В1/В2), процедуру разведения проводят таким же образом, как для стандартных растворов (С1—С3)

по А.2.8.2 (таблица А.1). Далее для анализа используют растворы (И2, И3) со степенью разведения в 200 и 400 раз. В процессе приготовления растворов используют стеклянные центрифужные пробирки, автоматические дозаторы, вортекс для перемешивания, не допускается воздействие прямых солнечных лучей на растворы.

Испытуемые растворы используют в течение дня, хранению не подлежат.

А.2.10 Приготовление питательных сред

А.2.10.1 Питательная среда для получения субкультуры

Готовят триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (ТСАДЭ). Для этого используют сухую питательную среду ТСАДЭ следующего состава (г/л): триптон или ферментативный гидролизат казеина — 17,0; соевый пептон — 3,0; хлористый натрий — 5,0; фосфорнокислый двузамещенный калий — 2,5; глюкоза — 2,5; дрожжевой экстракт — 6,0; микробиологический агар — 15,0, дополнительно добавляют микробиологический агар из расчета 2 г/дм^3.

Допускается приготовление из сухой среды ТСБДЭ путем добавления микробиологического агара из расчета 17 г/дм^3 или приготовление среды из компонентов аналогичного состава.

Питательную среду автоклавируют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин или в соответствии с инструкцией изготовителя. Готовую стерильную среду разливают в чашки Петри размером 90—100 мм.

А.2.10.2 Питательная среда для анализа низина

Готовят питательную среду — триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (ТСАДЭ) в необходимом количестве как в А.2.10.1, при этом для растворения сухих компонентов вместо дистиллированной воды используют калий-фосфатный буфер (см. А.2.6).

Питательную среду автоклавируют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин или в соответствии с инструкцией изготовителя. Сразу после стерилизации в горячую питательную среду асептически вносят Твин-80 в количестве 0,5 % (масс./об.), тщательно перемешивают, при этом наблюдается помутнение среды, которое по мере остывания исчезает. Для проведения анализа готовую стерильную среду охлаждают до температуры 50 °С — 55 °С.

Для анализа низина используют чашки (кюветы), размер которых определяют с учетом размещения необходимого количества лунок. Необходимое количество лунок определяют из расчета: 16 лунок для стандартных растворов (четыре концентрации в четырех повторностях), 24 лунки для одного испытуемого образца (для трех навесок) (три навески — две концентрации — в четырех повторностях) и одна лунка для раствора 0,02 н HCl, в качестве внутреннего отрицательного контроля, таким образом, для исследования одного образца необходима 41 лунка.

Объем питательной среды рассчитывают с учетом площади используемых чашек (кювет), так чтобы толщина слоя агара была 4,3—4,4 мм. Например, на одну чашку (кювету) размером 245 × 245 мм необходимо 220 см^3 питательного агара ТСАДЭ.

А.2.11 Подготовка тест-культуры

Субкультуру выращивают в чашках Петри на питательном агаре ТСАДЭ (см. А.2.10.1) в течение 18—24 ч при температуре (40 ± 1) °С. Из суточной культуры готовят инокулят. Для этого с помощью стерильного зонд-тампона отбирают небольшое количество бактериальной массы и переносят в пробирку со стерильным изотоническим раствором (см. А.2.5), суспендируют и тщательно перемешивают, доводя плотность бактериальной суспензии до 10 МЕ по стандарту мутности бактериальных взвесей (по ГОСТ Р 70152). Далее суспензию разводят стерильным изотоническим раствором в 10 раз в количестве, необходимом для засева подготовленного питательного агара ТСАДЭ (см. А.2.10.2), объем посевной дозы составляет 2,3 % от объема питательной среды. Так, например, в 220 см^3 питательного агара вносят 5 см^3 подготовленной бактериальной суспензии. Инокулят следует использовать в течение 15 мин после приготовления.

Для получения субкультуры используют тест-культуру, предварительно пересеянную (обновленную) и хранящуюся в холодильнике не более 7 сут.

А.2.12 Подготовка чашек (кювет) с тест-культурой

Стерильные чашки (кюветы) располагают на столике со строго горизонтальной поверхностью. В расплавленный питательный агар ТСАДЭ (см. А.2.10.2), охлажденный до 50 °С — 55 °С, стерильной пипеткой вносят необходимое количество подготовленной суспензии тест-культуры (см. А.2.11), тщательно перемешивают, после чего все содержимое равномерно распределяют в чашке (кювете), не допуская образования пузырей. Чашки (кюветы) оставляют открытыми для застывания на 20—30 мин.

Для разметки лунок на чашке (кювете) используют трафарет, в котором отмечают положения лунок, так чтобы расстояние между центрами лунок и от центра лунки до края чашки (кюветы) было примерно 28—30 мм. При использовании квадратных кювет размером 245 × 245 мм пример разметки лунок и проб на трафарете приведен в приложении В.

После застывания инокулированной среды в слое агара пробойником (просечкой) вырезают лунки диаметром 7 мм. Образовавшиеся блоки агара удаляют из лунок асептически любым способом, не допуская неровности краев и растрескивания лунок.

Время от внесения тест-культуры в питательный агар до внесения аналитических растворов (проб) в лунки должно быть не более 1 ч.

А.3 Определения содержания основного вещества низина в образцах пищевой добавки низин (Е324)

А.3.1 Внесение аналитических растворов

Аналитические растворы, приготовленные по А.2.8.2 и А.2.9, вносят в лунки на чашке Петри (кювете) в определенной последовательности, местоположение каждого раствора маркируют на чашках или размечают на трафарете. Каждый раствор (для каждого разведения) вносят в двухкратной повторности таким образом, чтобы повторности располагались на противоположных сторонах чашки Петри (кюветы).

Подготовленные стандартные растворы (С1—С4) и растворы испытуемого образца (И2, И3) перемешивают с помощью вортекса и вносят с помощью автоматического дозатора по 0,1 $см^3$ параллельно в две лунки каждый, отрицательный контроль достаточно вносить в одну лунку.

Последовательность внесения растворов стандартного и испытуемого образцов в лунки должна быть следующая: начиная с самой низкой концентрации, вначале вносят растворы испытуемых образцов (И3, И2), потом растворы стандартных образцов (С4-С2—С2-С1), последним вносят отрицательный контроль. Общее время внесения растворов не должно превышать 10—12 мин.

А.3.2 Инкубирование посевов

Чашки (кюветы) выдерживают 2 ч при комнатной температуре, не выше 25 °С, для предварительной диффузии низина, после осторожно, не допуская колебания растворов в лунках, переносят в термостат и инкубируют при (55 ± 1) °С в течение 16—18 ч.

А.3.3 Обработка результатов

После инкубирования (см. А.3.2) чашки Петри (кюветы) охлаждают на столе до комнатной температуры, предварительно сняв крышку. Результаты оценивают, просматривая чашки Петри в проходящем свете от любого источника света. Диаметры прозрачных зон ингибирования роста тест-культуры, измеряют электронным штангенциркулем с точностью до 0,1 мм, за конечное значение принимают среднее арифметическое значение диаметров, измеренных в двух перпендикулярных направлениях. Полученные значения записывают в таблицу регистрации результатов, пример которой приведен в таблице В.1 приложения В.

Содержание чистого вещества низина в испытуемых растворах (c_i) может быть определено по калибровочному графику двумя способами: графическим методом (метод А) или путем расчета с использованием программного обеспечения (MS Excel) (метод Б). Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах по значениям для стандартных растворов, откладывая: по оси X — величину зон ингибирования (d_{st}) (мм), а по оси Y — логарифм концентрации низина (lg c_{st}) в единицах биологической активности (МЕ/$см^3$).

При расчете концентраций в исследуемых образцах учитывают только зоны ингибирования, размер которых укладывается в диапазон размеров зон для растворов стандартного образца в диапазоне концентраций 1,25—10 МЕ/$см^3$.

При выполнении условий методики размер зон для минимальной концентрации 1,25 МЕ/$см^3$ должен быть не менее 16,5 мм, если размер зон менее, то исследование необходимо повторить.

Расчет значений содержания низина проводят для каждой зоны, удовлетворяющей указанным выше условиям. Значения, полученные для параллельных разведений проб стандартного образца, внесенных в лунки 2-кратной повторности, учитывают как 4-кратную повторность одного образца СО. Значения, полученные для параллельных разведений проб испытуемого образца, внесенных в лунки в 2-кратной повторности, учитывают, как 4-кратную повторность для каждого из трех параллельных определений одного образца.

Метод А. Обработка результатов анализа графическим способом

Калибровочный график строят по среднеарифметическим значениям диаметров зон четырех повторностей для стандартных растворов (С1—С4). На линейном участке графика для каждого испытуемого раствора (И2, И3) (в каждой отдельной повторности) по величине зоны ингибирования (d_i) определяют соответствующее значение логарифма lg (c_i) концентрации низина, которое пересчитывают в единицы биологической активности (c_i) (МЕ/$см^3$). Далее проводят расчет биологической активности низина (N_P) (МЕ/мг) и массовой концентрации основного вещества низина в испытуемом образце низина (X) (мг/г) (см. А.3.3.1—А.3.3.3).

Метод Б. Обработка результатов анализа с использованием программного обеспечения.

С использованием программного обеспечения (MS Excel) выполняют построение калибровочного графика, проводят линейную аппроксимацию, получая уравнение линейной зависимости логарифма концентрации низина (lg c_{st}) в стандартных растворах от величин зон ингибирования (среднеарифметическое значение по четырем повторностям) d_{st} (мм):

$$y = a \cdot x - b;\ R^2, \qquad (А.1)$$

где y — логарифм концентрации низина lg c (МЕ/$см^3$);

x — величина зоны ингибирования d, мм;

a и b — коэффициенты уравнения линейной регрессии;

R^2 — величина достоверной аппроксимации (коэффициент корреляции).

Для калибровочного графика должно выполняться условие — линейность в исследуемом диапазоне концентраций низина 0,625 — 10 МЕ/$см^3$ и величина коэффициента корреляции $R^2 > 0,98$. При невыполнении этих условий допускается удалить из расчетов два из четырех повторений для крайних точек калибровочного графика — в

наибольшей и/или наименьшей концентрации низина, если после этого коэффициент корреляции останется $R^2 < 0,98$, то исследование необходимо повторить.

Значения логарифма концентрации низина lg (c_i) для каждого испытуемого раствора пересчитывают в единицы активности c_i (МЕ/см^3).

А.3.3.1 Концентрацию (содержание) низина в испытуемом образце (X) рассчитывают в следующей последовательности:

а) рассчитывают концентрацию низина C_i в i-м растворе испытуемой пробы (образца), МЕ/см^3:

$$C_i = F \cdot c_i, \quad (A.2)$$

где c_i — значение, определяемое по калибровочному графику, МЕ/см^3;

F — фактор разбавления i-го раствора пробы;

б) концентрацию низина в опытном растворе (ОРИ) испытуемого образца С, МЕ/см^3 вычисляют как среднее арифметическое значений C_i, полученных для 4-кратной повторности во всех разведениях:

$$C = \Sigma(C_i)/n, \quad (A.3)$$

где n — число повторностей;

в) рассчитывают поправочный коэффициент K_N, учитывающий аналитическое значение содержания низина в СО (по сертификату анализа на стандартный образец) в пересчете на эталонный образец концентрата низина с содержанием 1000 МЕ/мг:

$$K_N = 1000/N_{St}, \quad (A.4)$$

где N_{St} — содержание низина в СО, МЕ/мг;

1000 — содержание низина в эталонном стандартном образце, МЕ/мг.

А.3.3.2 Концентрацию низина в испытуемом образце низина N_P в единицах биологической активности (МЕ/мг) рассчитывают с учетом поправочного коэффициента K_N:

$$N_P = (C/K) \cdot K_N, \quad (A.5)$$

где C — концентрация низина в ОРИ испытуемого образца, МЕ/см^3;

K — коэффициент пересчета с учетом концентрации основного раствора (ОР), равный 1,0 мг/см^3;

K_N — поправочный коэффициент.

А.3.3.3 Массовую концентрацию низина в испытуемом образце низина X, мкг/мг, рассчитывают путем пересчета концентрации в единицах биологической активности (МЕ/мг) в единицы массовой концентрации чистого вещества низина в испытуемом образце низина (мг/г).

$$X = N_P \cdot A_N, \quad (A.6)$$

где X — массовая концентрация чистого вещества низина в испытуемом образце низина, мкг/мг;

N_P — концентрация низина в испытуемом образце низина в единицах биологической активности, МЕ/мг;

A_N — удельная биологическая активность чистого вещества низина, равная 0,025 мкг/МЕ.

В испытуемом образце пищевой добавки низин (Е234) должно содержаться не менее 22,5 мкг/мг чистого вещества низина (2,25 % масс/масс), что соответствует биологической активности не менее 900 МЕ/мг.

А.3.4 Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и ее составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не превышает значений, приведенных в таблице А.2 для указанного диапазона концентраций.

Метрологические параметры установлены при проведении количественного определения с тест-культурой *Heyndrickxia coagulans* штамм ВКПМ В-15356.

Таблица А.2 — Значения характеристики диапазона измерений и показателя точности

Диапазон измеряемых концентраций чистого вещества низина А в испытуемом образце низина, мкг/мг	Показатель точности (границы относительной погрешности ±δ, %, $P = 0,95$	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости) σR, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений) r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях) R, % ($P = 0,95$)
0,031—0,25	10	3,5	4,9	10	14

А.3.5 Проверка приемлемости результатов параллельных определений

При расчете учитывают только результаты, удовлетворяющие условиям диапазона определяемых концентраций низина в испытуемом образце (значение равно или выше нижней границы/равно или ниже верхней границы), в границах диапазона измеряемых концентраций 0,031—0,25 мкг/мг.

В случае обнаружения содержания низина в подготовленном растворе (экстракте) выше верхней границы градуировочного графика, проводят дополнительное разведение подготовленного раствора (экстракта) и в дальнейшем учитывают это разведение при обработке результата анализа.

За результат количественного анализа принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений $\overline{X}$, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости r (%) (см. таблицу А.2), если выполняется условие [6]:

$$r_k = (X_{max} - X_{min}) \cdot 100/\overline{X} \le r, \quad (А.7)$$

где X_{max} — максимальное, а X_{min} — минимальное из трех параллельных определений, мкг/мг;

r — значение предела повторяемости, % (см. таблицу А.2), при этом $r = 2{,}8\sigma_r$.

При невыполнении указанного условия выясняют причины превышения погрешности измерения, устраняют их и вновь выполняют анализ.

А.3.6 Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$$(\overline{X} \pm \Delta) \text{ мг/кг при вероятности } P = 0{,}95,$$

где $\overline{X}$ — среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ — граница абсолютной погрешности, мкг/мг:

$$\Delta = \delta \cdot \overline{X}/100, \quad (А.8)$$

где δ — граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, см. таблицу А.2), %.

А.4 Определение стабильности низина в кислых условиях

А.4.1 Приготовление раствора испытуемого образца низина 0,05 мг/см^3

Готовят раствор с содержанием испытуемого образца низина 0,05 мг/см^3 (соответствует биологической активности примерно 50 МЕ/см^3) путем разведения основного раствора испытуемого образца низина (ОРИ) (см. А.2.9) в 20 раз в 0,02 н растворе HCl (см. А.2.3). Для этого в мерную колбу вместимостью 100 см^3 точно вносят автоматическим дозатором 5 см^3 ОРИ и доводят до метки раствором 0,02 н HCl, тщательно перемешивают.

А.4.2 Прогрев кислого раствора низина

Приготовленный раствор низина в количестве 50 см^3 переносят в стеклянный термоустойчивый флакон с закручивающейся винтовой крышкой, плотно закрывают, не допуская испарения, кипятят в течение 5 мин с момента закипания, после чего раствор охлаждают до комнатной температуры, не допускается воздействие прямых солнечных лучей. Раствор хранению не подлежит, биологическую активность низина определяют в тот же день.

А.4.3 Определение содержания низина в кислом растворе после прогрева

Содержание низина в прогретом и непрогретом растворах определяют в соответствии с процедурой по А.3. Растворы разводят в пять раз путем добавления к 1 см^3 раствора низина 4 см^3 раствора 0,02 н HCl (см. А.2.3), перемешивают. Таким образом получают растворы с содержанием испытуемого образца низина 0,01 мг/см^3 по сухому веществу или примерно 10 МЕ/см^3 в единицах биологической активности низина, что соответствует раствору испытуемого образца И2 (см. таблицу А.1). Далее проводят двухкратные разведения для получения растворов аналогично растворам И3—И5. В приготовленных растворах определяют содержание низина в соответствии с методикой анализа (см. А.3).

Полученные результаты сравнивают, расхождение в значениях не должно превышать величину относительной погрешности, приведенную в таблице А.2.

А.5 Определение стабильности низина в щелочных условиях

А.5.1 Прогрев щелочного раствора низина

Используют 40 см^3 раствора с содержанием испытуемого образца низина 0,05 мг/см^3, приготовленного по А.4.1. В раствор при перемешивании добавляют 5 н раствор гидроокиси натрия (см. А.2.7), доводят pH до (11 ± 0,1) единиц, значение pH контролируют с помощью pH-метра. Щелочной раствор низина переносят в термоустойчивый флакон с закручивающейся винтовой крышкой, плотно закрывают, не допуская испарения, нагревают до (65 ± 1) °С и выдерживают при этой температуре в течение 30 мин в водяной бане, после охлаждают до комнатной температуры.

Далее в щелочном растворе устанавливают pH (2,0 ± 0,1) единиц, путем добавления 1,0 н раствора соляной кислоты (см. А.2.4) при перемешивании, значение pH контролируют с помощью pH-метра.

А.5.2 Определение содержания низина в щелочном растворе после прогрева

Содержание низина в растворе до и после щелочной обработки определяют в соответствии с методикой анализа (см. А.3), растворы после щелочной обработки (см. А.5.1) анализируют без разведения.

Полученные результаты сравнивают, после щелочной обработки низин полностью теряет биологическую активность и не обнаруживается в растворе.

Результаты исследований, подтверждающие сохранение активности низина в кислом растворе и инактивацию в щелочном при термической обработке по А.4 и А.5, подтверждают наличие в испытуемом образце бактериоцина низина.

А.6 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать требования ГОСТ ISO 7218.

Требования, обеспечивающие безопасность работы лаборатории:

- помещение лаборатории должно отвечать требованиям ГОСТ ISO 7218;
- 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 безопасности при работе в микробиологической лаборатории и соблюдение надлежащей лабораторной практики для микробиологических лабораторий при исследовании пищевых продуктов — по ГОСТ ISO 7218;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками — в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Примечание — Группу опасности микроорганизма, распространенного в пределах конкретной страны, устанавливают соответствующими национальными нормативными документами.

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

А.7 Требования к оператору

К проведению анализа допускаются лица, имеющие специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие инструктаж по соблюдению требований биологической безопасности, освоившие выполнение предусмотренных методикой операций и прошедшие обучение приемам работы с оборудованием.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Рекомендуемый депозитарий для тест-штамма, используемого для выполнения испытаний

Рекомендуемый депозитарий для тест-штамма *Heyndrickxia coagulans* ВКПМ В-15356, используемого для выполнения испытаний, — Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика) (штамм № В-15356).

Штамм *Heyndrickxia coagulans* ВКПМ В-15356 не входит в перечень микроорганизмов I—IV групп патогенности согласно [7].

Приложение В
(рекомендуемое)

Форма таблицы регистрации результатов

Таблица В.1 — Таблица регистрации результатов

№ п/п	Обозначения проб	Кратность разведения образцов, обозначения растворов				Примечания
		800	400	200	100	
		С4	С3/И3	С2/И2	С1	
		Размеры зон ингибирования, мм[1)]				
1	А1.1	—	И3.1	И2.1	—	
2	А1.2	—	И3.2	И2.2	—	
3	А2.1	—	И3.3	И2.3	—	
4	А2.2	—	И3.4	И2.4	—	
5	Б1.1	—	И3.1	И2.1	—	
6	Б1.2	—	И3.2	И2.2	—	
7	Б2.1	—	И3.3	И2.3	—	
8	Б2.2	—	И3.4	И2.4	—	
9	В1.1	—	И3.1	И2.1	—	
10	В1.2	—	И3.2	И2.2	—	
11	В2.1	—	И3.3	И2.3	—	
12	В2.2	—	И3.4	И2.4	—	
13	Стандарт 1.1	С4.1	С3.1	С2.1	С1.1	
14	Стандарт 1.2	С4.2	С3.2	С2.2	С1.2	
15	Стандарт 2.1	С4.3	С3.3	С2.3	С1.3	
16	Стандарт 2.2	С4.4	С3.4	С2.4	С1.4	
17	Отрицательный контроль (без разведений)	ОК	—	—	—	

[1)] Среднее арифметическое значение диаметров, измеренных в двух перпендикулярных направлениях.

Схема размещения проб в квадратной кювете (245 × 245 мм)

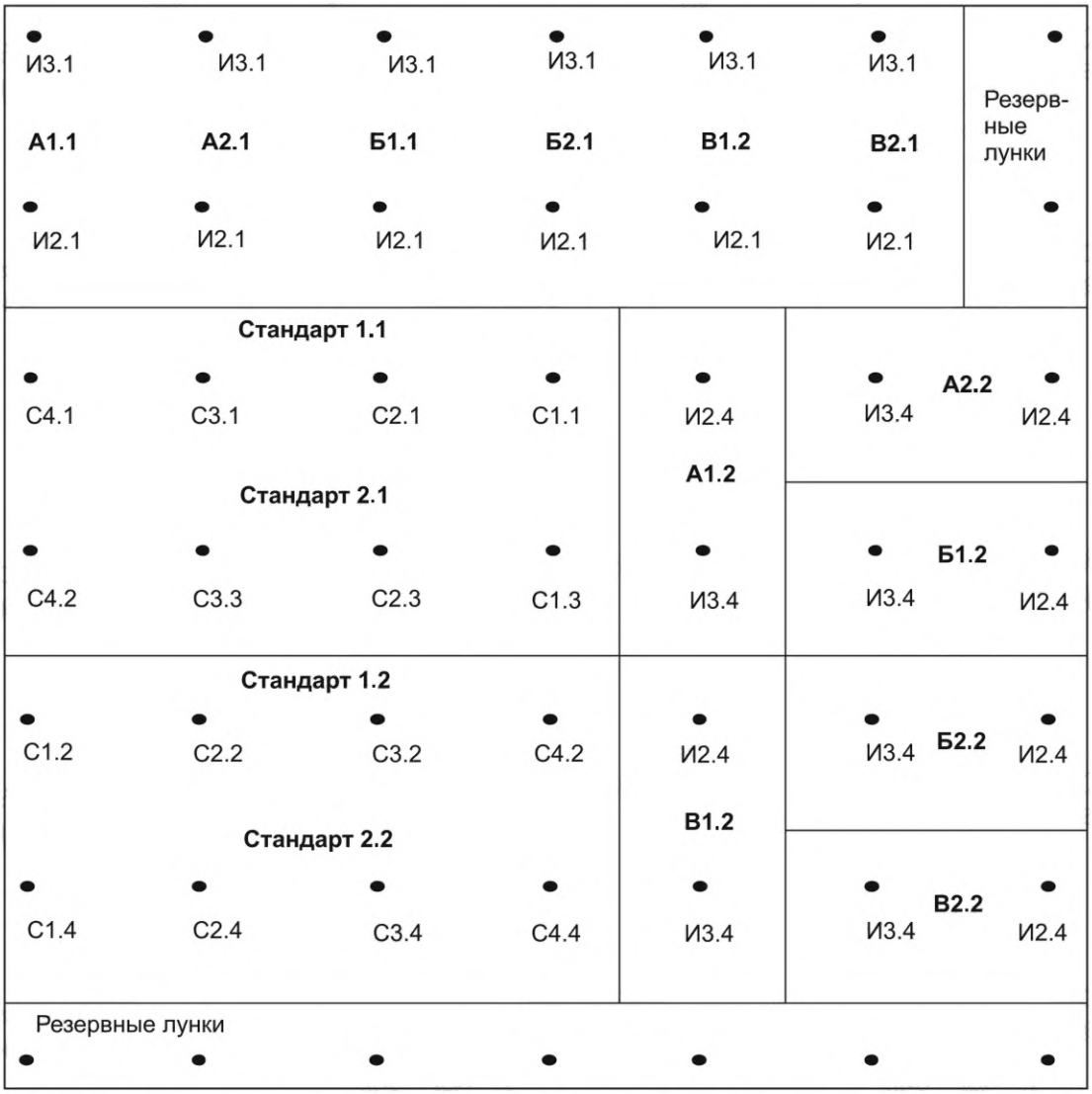

Рисунок В.1 — Пример разметки трафарета для одного образца (обозначения точек приведены в таблице В.1)

Библиография

[1]	Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011	О безопасности пищевой продукции
[2]	Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012	Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств
[3]	Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013	О безопасности молока и молочной продукции
[4]	Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022/2011	Пищевая продукция в части ее маркировки
[5]	Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 005/2011	О безопасности упаковки
[6]	РМГ 76-2014	Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа
[7]	СП 3.3686-21	Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней

УДК 579.66.663:006.354 ОКС 07.100.01

Ключевые слова: добавка пищевая низин, продукция микробиологическая, бактериоцин низин, пищевая добавка, консервант, Е234

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 16.04.2026. Подписано в печать 04.05.2026. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,37.

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