МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ ISO 15163— 2014**

## Молоко и молочные продукты

# СЫЧУЖНЫЙ ФЕРМЕНТ ИЗ СЫЧУГОВ ТЕЛЯТ И ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ИЗ СЫЧУГОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

## Определение содержания химозина и говяжьего пепсина методом хроматографии

(ISO 15163:2012, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

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

**Сведения о стандарте**

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

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 мая 2014 г. № 67-П)

За принятие проголосовали:

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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 июля 2014 г. № 718-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 15163—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2016 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 15163:2012 Milk and milk products — Calf rennet and adult bovine rennet — Determination by chromatography of chymosin and bovine pepsin contents (Молоко и молочные продукты. Сычужный фермент из желудка телят и взрослых коров. Определение содержания химозина и говяжьего пепсина методом хроматографии).

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

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеется в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартинформ, 2015

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

## Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Принцип . . . 1
4 Реактивы . . . 2
5 Оборудование и химическая посуда . . . 3
6 Отбор проб . . . 3
7 Методика . . . 4
7.1 Проверка . . . 4
7.2 Подготовка чистой колонки со смолой Fractogel . . . 4
7.3 Регенерация и уравновешивание смолы Fractogel в колонке . . . 4
7.4 Хранение колонки со смолой Fractogel . . . 4
7.5 Приготовление пробы для испытания . . . 4
7.6 Анализ обессоленного сычужного фермента . . . 5
7.7 Определение времени свертывания . . . 7
8 Вычисление и представление результатов . . . 7
8.1 Вычисление активности химозина и пепсина, выражаемой в процентах . . . 7
8.2 Вычисление активности химозина и говяжьего пепсина, в миллиграммах на $дм^3$ . . . 7
8.3 Выражение результатов . . . 8
9 Прецизионность . . . 8
9.1 Межлабораторные испытания . . . 8
9.2 Повторяемость . . . 8
9.3 Воспроизводимость . . . 9
10 Протокол испытаний . . . 9
Приложение А (справочное) Количественное определение молокосвертывающих ферментов в промышленных коагулянтах методом двойной иммунодиффузии . . . 10
Приложение В (справочное) Межлабораторные испытания . . . 14
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам . . . 15
Библиография . . . 16

## Введение

Препараты на основе сычужного фермента из сычугов телят и взрослых животных (КРС) содержат в разных количествах в качестве основных молокосвертывающих ферментов: химозин и говяжий пепсин. Доля химозина по отношению к пепсину в сычуге (четвертый отдел желудка жвачных) с возрастом и отлучением теленка от молока матери уменьшается.

Соотношение сычугов молодняка к сычугам взрослых животных в сырье для производства фермента сильно влияет на соотношение химозина и пепсина в конечном сычужном ферменте. Чем больше доля сычугов молодых вскормленных молоком телят, тем выше доля химозина в сычужном ферменте и наоборот [5], [6].

Как химозин, так и пепсин характеризуются различной молокосвертывающей активностью и пригодностью для производства сыров. Молокосвертывающая активность пепсина, например, намного больше зависит от показателя pH, чем активность химозина, кроме того, пепсин также имеет более общую протеолитическую активность, чем химозин.

Поэтому важно проанализировать содержание химозина и пепсина в дополнение к концентрации (общей молокосвертывающей активности) сычужного фермента [6], [7].

**М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й  С Т А Н Д А Р Т**

**Молоко и молочные продукты**

# СЫЧУЖНЫЙ ФЕРМЕНТ ИЗ СЫЧУГОВ ТЕЛЯТ И ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ИЗ СЫЧУГОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**Определение содержания химозина и говяжьего пепсина методом хроматографии**

Milk and milk products. Calf rennet and adult bovine rennet.
Determination of chymosin and bovine pepsin contents by chromatography

**Дата введения — 2016—01—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения количества химозина и говяжьего пепсина в пробе ферментных препаратов из сычугов телят и крупного рогатого скота. Кроме того, стандарт может применяться при приготовлении молокосвертывающих ферментных препаратов на основе сычужного фермента телят и смеси ферментов, полученных в процессе ферментации сычугов взрослых особей крупного рогатого скота.

## 2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для датированных ссылок применяется только цитированное издание документа. Для недатированных ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 11815|IDF 157:2007 Milk — Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets (Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего ферментного препарата)

## 3 Принцип

На первом этапе пробу сычужного фермента обессоливают, а химозин и говяжий пепсин разделяют на анионообменной колонке [8], [9]. На втором этапе определяют молокосвертывающую активность каждого из двух разделенных ферментов в соответствии с ISO 11815|IDF 157 (восстановленного молока с pH 6,5). Ферментативный состав пробы сычужного фермента выражают в процентах активности химозина и пепсина от суммы активностей обоих компонентов в соответствии с Международными молокосвертывающими единицами (ММЕ), или результаты выражают в миллиграммах на 1 $дм^3$ активного химозина и миллиграммах на 1 $дм^3$ активного пепсина.

Общая молокосвертывающая активность первой партии контрольного сычужного фермента из сычугов телят и первой партии контрольного сухого ферментного препарата от взрослых животных была установлена на уровне 1000 ММЕ/г. Будущие контрольные стандартные пробы должны быть установлены относительно предыдущих стандартных проб (см. ISO 11815|IDF 157).

В настоящем стандарте приведено описание ручных средств для проведения анионообменной хроматографии, а также автоматизированных средств.

Это контрольный метод, поэтому изменения могут быть сделаны только при получении такого же результата, а повторяемость и воспроизводимость будет соответствовать исходному контрольному методу. Любые изменения установленного в настоящем стандарте метода должны быть указаны в протоколе испытаний (см. раздел 10).

**Издание официальное**

## 4 Реактивы

Если не указано иное, используют реактивы только установленной аналитической чистоты и дистиллированную или деминерализованную воду, или воду эквивалентной чистоты.

4.1 Смола, Fractogel® EMD DEAE (M) (Merck cat. no. 1.16883)[1] или Mono Q® 1 см$^3$ предварительно упакованной колонки (HR 5/5 или 5/50 GL от GE Healthcare)[2] или эквивалентная смола.

Примечания

1 Fractogel® EMD DEAE (M) — подходящая смола для ручного ввода проб, а Mono Q® подходит для автоматического ввода.

2 Если смолу Fractogel® или Mono Q® заменить другой смолой, то скорее всего появится необходимость заменить и буферные растворы по 4.12, что приведет к необходимости повторной оценки метода.

4.2 Пиперазина гексагидрат ($C_4H_{10}N_2 \cdot 6H_2O$).

4.3 Хлорид натрия (NaCl).

4.4 Тимол, необязательный консервант.

4.5 Гидроксид натрия (NaOH).

4.6 Раствор соляной кислоты, $c$(HCl) = 1 моль/дм$^3$.

4.7 Этанол ($C_2H_5OH$), с объемной долей не менее 96 %.

4.8 Этанол ($C_2H_5OH$), с объемной долей не менее 20 %.

Добавляют 105 см$^3$ 96 %-ного этанола (4.7) к 400 см$^3$ воды и перемешивают. Если требуется стерильная фильтрация, воду до перемешивания с этанолом фильтруют.

**4.9 Мочевина, $c(N_2H_4CO)$ = 8 моль/дм$^3$**

Растворяют 48 г мочевины в воде и доводят до общего объема 100 см$^3$.

4.10 Система трубок для диализа, диаметром около 1 см (Union Carbide)[3] или эквивалентного (необязательно).

Примечание — Качество системы трубок для диализа не является решающим.

4.11 Колонки для обессоливания, Bio-Rad-Econopac 10DG (cat. no. 732-2010)[4] или эквивалентные (необязательно).

Используют или систему трубок для диализа (4.10), или колонки для обессоливания сычужного фермента.

**4.12 Буферные растворы**

**4.12.1 Буферный раствор I, пиперазин [$(CH_2)_4$ $(NH)_2$], $c$[$(CH_2)_4$ $(NH)_2$] = 0,025 моль/дм$^3$**

В лабораторный стакан отвешивают 4,85 г пиперазина (4.2) и 42,8 г раствора соляной кислоты (4.6) и перемешивают. Содержимое стакана количественно переносят в мерную колбу с одной меткой вместимостью 1000 см$^3$ (5.5), доводят водой до метки и перемешивают. Активная кислотность раствора должна быть (5,30 ± 0,05) ед. pH. При необходимости ее регулируют пиперазином или соляной кислотой. Перед использованием дегазируют и консервируют буферный раствор по 4.12.5.

**4.12.2 Буферный раствор II, $c$(NaCl) = 0,25 моль/дм$^3$**

В мерную колбу с одной меткой вместимостью 1000 см$^3$ (5.5) помещают 14,6 г NaCl. Добавляют буферный раствор I (4.12.1) до метки и перемешивают. Активную кислотность (pH) не регулируют. Буферный раствор II используется только для ручного метода. Перед использованием буферный раствор дегазируют и консервируют по 4.12.5.

---

[1] Fractogel® EMD DEAE (M) — это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

[2] Mono Q® 1 см$^3$ предварительно упакованной колонки — это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

[3] Union Carbide — это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

[4] Bio-Rad — Econopac 10DG — это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

**4.12.3 Буферный раствор III, *c*(NaCl) = 0,50 моль/дм$^3$**

В мерную колбу с одной меткой вместимостью 1000 см$^3$ (5.5) помещают 29,2 г NaCl. Добавляют буферный раствор I (4.12.1) до метки и перемешивают. Активную кислотность (pH) не регулируют. Буферный раствор III используется только для ручного метода. Перед использованием дегазируют и консервируют буферный раствор по 4.12.5.

**4.12.4 Буферный раствор IV, *c*(NaCl) = 1,0 моль/дм$^3$**

В мерную колбу с одной меткой вместимостью 1000 см$^3$ (5.5) помещают 58,4 г NaCl. Добавляют буферный раствор I (4.12.1) до метки и перемешивают. Активную кислотность (pH) не регулируют. Буферный раствор III используется только для ручного метода. Перед использованием дегазируют и консервируют буферный раствор по 4.12.5.

**4.12.5 Дегазация и консервация**

Перед использованием буферные растворы от I до IV (4.12.1—4.12.4) дегазируют в вакууме или используют ультразвуковую водяную баню. Консервируют буферные растворы от I до IV для ручного метода, добавляя несколько кристаллов тимола, а для автоматического метода применяют стерильную фильтрацию, используя фильтр размером 0,2 мкм.

Буферные растворы с I до IV хранят не менее пяти дней при комнатной температуре или в течение двух месяцев в холодильнике.

## 5 Оборудование и химическая посуда

5.1 Многоканальный перистальтический насос или другой подходящий насос (только для ручного ввода).

5.2 pH-метр, пределы допускаемого значения основной (абсолютной) погрешности не более 0,01 ед. pH.

5.3 Хроматографическая колонка, диаметром 1,0 см и длиной 10 см, с адаптером потока в одном направлении или эквивалентная колонка, подходящая для слоя геля высотой 5 см (только для ручного ввода).

5.4 Магнитная мешалка.

5.5 Мерные колбы с одной меткой, нужной вместимости по [2].

5.6 FPLC®[1], ÄKTA®[2] или HPLC оборудование, пригодное для поставленной цели, используется только для автоматического ввода.

5.7 Лабораторное оборудование, для определения времени свертывания (см. ISO 11815|IDF 157).

## 6 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, рассматриваемого в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приводится в [1].

Примечание — Отбор проб жидкого ферментного препарата установлен в [1], разделе 9, а порошкового (сухого) ферментного препарата — разделе 13.

Репрезентативную пробу следует направить в лабораторию. Проба не должна быть повреждена или изменена при транспортировании или хранении.

Примечание — Порошковые продукты могут легко разделяться.

Пробы хранят в темном месте при температуре от 0 °С до 5 °С.

---

[1] FPLC® — это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

[2] ÄKTA® — это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

## 7 Методика

### 7.1 Проверка

Перед проведением анализа проверяют ферментный препарат на отсутствие основных молокосвертывающих ферментов не животного происхождения, используя подходящий метод (см. приложение А). Проверку можно не проводить, если известно, что фермент содержит химозин и пепсин только животного происхождения.

### 7.2 Подготовка чистой колонки со смолой Fractogel

Готовую к использованию суспензию смолы Fractogel (4.1) после дегазации в вакууме разливают непосредственно из бутыли поставщика или, используя ультразвуковую водяную баню, заполняют ею колонку (5.3), установленную вертикально, с открытым выпуском, пока слой осажденной смолы Fractogel не достигнет высоты от 4,5 до 5,5 см. Во время проведения процедуры гелевая основа не должна быть сухой.

Закрывают выпускную трубку. Погружают конец впускного отверстия трубки перистальтического насоса в лабораторный стакан с буферным раствором I (4.12.1). Подсоединяют трубку адаптера к отводной трубке насоса. Регулируют скорость потока до $(1{,}3 \pm 0{,}1)$ см$^3$/мин. Заполняют трубку адаптера буферным раствором I (4.12.1), не превышая общий внутренний объем трубок 1,5 см$^3$.

Закрывают колонку адаптером, как указано изготовителем колонки. Сжимают адаптером несколько миллиметров гелевой основы, чтобы ликвидировать свободное пространство над ней. Следует предупредить попадание пузырьков воздуха в колонку. Промывают колонку буферным раствором I (4.12.1) в течение 5 мин при скорости потока 1,3 см$^3$/мин.

### 7.3 Регенерация и уравновешивание смолы Fractogel в колонке

После подготовки новой колонки и после каждого цикла проводят регенерацию и приведение в равновесие смолы Fractogel (4.1) в колонке следующим способом.

Регенерируют смолу Fractogel в колонке, используя не менее 15 см$^3$ буферного раствора IV (4.12.4), подавая его в течение 11—12 мин со скоростью потока 1,3 см$^3$/мин. Колонку приводят в равновесие, используя не менее 40 см$^3$ буферного раствора I (4.12.1), подавая его в течение 30 мин. После этого колонка готова для загрузки пробы для анализа.

Одну и ту же колонку можно использовать более 20 раз. После частого использования колонку очищают более тщательно, промывая ее раствором NaOH молярной концентрации 0,1 моль/дм$^3$ в течение 10 мин, а затем водой в течение 10 мин. Затем проводят обычную процедуру регенерации и приведения в равновесие, как описано выше.

### 7.4 Хранение колонки со смолой Fractogel

Если колонка должна храниться более одной недели, ее промывают 15 см$^3$ 20 %-ного этанола (4.8) с помощью перистальтического насоса (5.1). Хранят колонку с плотно закрытыми впускными и выпускными каналами.

Колонку можно хранить несколько месяцев при комнатной температуре, стараясь избегать попадания прямого солнечного света.

### 7.5 Приготовление пробы для испытания

#### 7.5.1 Общие требования

Жидкие пробы ферментных препаратов анализируют после подготовки по 7.5.2.

Пробу порошковых ферментных препаратов готовят следующим образом. Сухие пробы перед обессоливанием растворяют в подходящем количестве буферного раствора I (4.12.1) или с использованием буферного раствора с pH 5,5 (см. ISO 11815|IDF 157), чтобы получить раствор с общей молокосвертывающей активностью 200 ММЕ/см$^3$.

Перед обессоливанием определяют время свертывания растворенной пробы фермента в соответствии с ISO 11815|IDF 157. Проводят приблизительную оценку активности пробы, выраженную в ММЕ/см$^3$, устанавливая ее относительно эталона сычужного фермента, чтобы определить количество пробы на колонку (7.6.1 или 7.6.2).

Если результаты выражаются в миллиграммах на дм$^3$, при определении времени свертывания пробы сычужного фермента проводят два параллельных определения в соответствии с ISO 11815|IDF 157. В этом случае измеряют время свертывания одновременно или в быстрой последовательности до и после обессоливания.

Перед внесением пробы для анализа в колонку ее обессоливают путем диализа (7.5.2) или гель-фильтрации (7.5.3).

### 7.5.2 Обессоливание путем диализа

Диализную трубку (4.10) погружают в кипящую воду на 5 мин и промывают ее внутри и снаружи водой.

Диализ 5 $см^3$ приготовленной анализируемой пробы (7.5) (активностью около 900 ММЕ) по отношению к 500 $см^3$ буферного раствора I (4.12.1) проводят при температуре 4 °С в течение от 5 до 20 ч. Диализную трубку очень крепко сжимают рукой, чтобы перекрыть ее в целях сокращения разбавления, которое происходит во время диализа. Во время диализа буферный раствор перемешивают магнитной мешалкой (5.4).

Если результаты выражаются в миллиграммах на $дм^3$, при определении времени свертывания пробы сычужного фермента, подвергнутой диализу, проводят два параллельных определения в соответствии с ISO 11815|IDF 157.

### 7.5.3 Обессоливание путем гель-фильтрации

Следуют инструкциям поставщика.

Колонку обессоливания (4.11) уравновешивают буферным раствором I (4.12.1). На колонку используют 3,3 $см^3$ приготовленной пробы (7.5). Элюируют пробу буферным раствором I (4.12.1) объемом 4,0 $см^3$.

Для проб с низким содержанием химозина или пепсина иногда необходимо выполнить вышеуказанную процедуру дважды, чтобы получить достаточную активность фермента и иметь возможность адекватно определить низкое содержание компонента.

Если результаты выражаются в миллиграммах на $дм^3$, при определении времени свертывания пробы сычужного фермента путем гель-фильтрации проводят два параллельных определения в соответствии с ISO 11815|IDF 157.

### 7.5.4 Срок службы колонки

Чтобы продлить срок службы колонок и избежать закупоривания, рекомендуется выполнять регулярную очистку обессоливающих колонок.

После каждого дня использования всю колонку промывают чистой водопроводной или дистиллированной водой. В колонку вводят 5 $см^3$ раствора мочевины молярной концентрации 8 моль/$дм^3$ и затем сливают. Промывают колонку один раз водопроводной водой и уравновешивают, пропуская через колонку полный объем резервуара с буферным раствором I (4.12.1).

Хранят уравновешенные колонки в прохладном месте с небольшим количеством буферного раствора над поверхностью геля. При длительном хранении рекомендуется хранить колонку в буферном растворе или дистиллированной воде с добавлением консервантов (см. инструкцию поставщика). При соблюдении этой процедуры можно использовать каждую колонку до двух лет или пока значительно не снизится скорость потока.

## 7.6 Анализ обессоленного сычужного фермента

### 7.6.1 Разделение химозина и пепсина в обычной колонке. Ручной ввод

После приведения колонок в равновесие в соответствии с 7.3 с помощью насоса (5.1) в колонку вводят определенное количество обессоленной пробы для анализа (7.5.2 или 7.5.3), погружая конец входной трубки насоса в трубку с пробой. Устанавливают скорость потока 1,3 $см^3$/мин.

Количество пробы должно быть достаточным, чтобы после разделения время свертывания наиболее слабой фракции составляло от 350 с до 550 с и чтобы можно было обнаружить активность в промежуточной фракции или в элюате после второй фракции. В большинстве случаев объем пробы после обессоливания составляет от 3 до 5 $см^3$. При этом общая молокосвертывающая активность на колонку не должна превышать 900 ММЕ. Если результаты выражаются в миллиграммах на $дм^3$, необходимо точно знать объем пробы, добавляемый в колонку. Этого не требуется, если результаты выражаются только в процентах.

Когда проба почти полностью введена во входную трубку, промывают трубку для анализа буферным раствором II объемом 1 $см^3$ (4.12.2). Следует избегать попадания пузырьков воздуха в трубку. Повторяют промывание после того, как первый раствор для промывки введен во входную трубку.

Погружают конец входной трубки в стакан, содержащий не менее 50 $см^3$ буферного раствора II (4.12.2). Собирают первую фракцию элюата в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 $см^3$ (5.5). Собирают точно до метки 50 $см^3$ или до объема 47 $см^3$. В последнем случае объем доводят до метки буферным раствором II (4.12.2).

Затем собирают пробу в количестве 3 $см^3$ в небольшой стакан, которую обозначают как промежуточную фракцию.

Далее погружают конец входной трубки перистальтического насоса (5.1) в стакан, содержащий не менее 50 см$^3$ буферного раствора III (4.12.3). Собирают вторую элюированную фракцию в другую мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 см$^3$ (5.5). Собирают точно до метки 50 см$^3$ или до объема 47 см$^3$. В последнем случае объем доводят до метки буферным раствором III (4.12.2).

Затем собирают пробу в количестве 3 см$^3$ в небольшой стакан, которую обозначают как вторичную фракцию.

Примечание — Первая элюированная фракция содержит химозин. Промежуточную фракцию используют для проверки правильности разделения двух ферментов. Вторая элюированная фракция содержит говяжий пепсин. Используя вторичную фракцию, проверяют полноту извлечения пепсина.

Если известно, что проба содержит очень малое количество химозина или пепсина, элюированные фракции 1 и 2 можно собрать в небольшие мерные колбы, например вместимостью 25 см$^3$.

**7.6.2 Разделение химозина и пепсина на оборудовании для FPLC®/ÄKTA®/HPLC. Автоматический ввод**

7.6.2.1 Следуют общим инструкциям к оборудованию (5.6) и колонке Mono Q (4.1), используя только буферные растворы I (4.12.1) и IV (4.12.4).

Составляют программу проведения анализа. Проверяют правильность разделения и соответствие полученных результатов ручному контрольному методу. При автоматическом вводе хроматограмма дана с уменьшением на коэффициент 5, то есть собирают 10 см$^3$ фракции вместо 50 см$^3$, отбираемых ручным способом. Кроме того, нет необходимости собирать промежуточную фракцию, потому что хроматограмма показывает, разделены ли химозин и пепсин полностью на фракции с одним ферментом в каждой.

Если колонка не использовалась в течение последних 24 ч, проводят «слепой» опыт, используя буферный раствор I (4.12.1) в качестве пробы для анализа.

7.6.2.2 При объеме пробы 0,5 или 1,0 см$^3$ следуют указанным рекомендациям по программе испытаний.

a) Начинают со 100 %-ного буферного раствора I (4.12.1) при скорости потока 2 см$^3$ /мин и регистрируют его на длине волны 280 нм. Вводят пробу объемом 0,500 см$^3$ или 1,000 см$^3$, которая была предварительно введена в петлю, в колонку.

b) После элюирования 0,60 см$^3$ буферного раствора I (4.12.1) начинают собирать фракцию 1 (фракция химозина).

c) После элюирования 1,50 см$^3$ буферного раствора I его заменяют на буферную смесь, состоящую из 80 % буферного раствора I (4.12.1) и 20 % буферного раствора IV (4.12.4) для элюирования фракции химозина.

d) После элюирования смеси, состоящей из соответственно 10,60 см$^3$ буферного раствора I и буферного раствора IV, останавливают сбор фракции 1 (объем 10 см$^3$) и для элюирования и сбора фракции 2 (фракция пепсина) заменяют смесь буферов I и IV на смесь, состоящую из 50 % буферного раствора I (4.12.1) и 50 % буферного раствора IV (4.12.4).

e) После элюирования 20,60 см$^3$ буферной смеси останавливают сбор фракции 2 (объем 10 см$^3$) и для промывания колонки заменяют смесь из 50 % буфера I и IV на 100 %-ный буферный раствор IV (4.12.4).

f) После элюирования 25,60 см$^3$ буферной смеси для уравновешивания колонки заменяют полностью буферный раствор IV на буферный раствор I (4.12.1).

g) После элюирования 32,60 см$^3$ буферного раствора I завершают программу.

7.6.2.3 Хроматографию пробы проводят следующим образом.

Предварительно вводят обессоленный ферментный препарат в петлю объемом 0,500 или 1,000 см$^3$ с молокосвертывающей активностью не более 180 ММЕ. Начинают проведение хроматографии и собирают две фракции. Определяют время свертывания первой и второй фракций в соответствии с ISO 11815|IDF 157.

Если известно, что образец содержит очень небольшое количество химозина (фермент из сычуга телят) или пепсина (фермента из сычугов крупного рогатого скота), размер фракции может быть изменен на 5 см$^3$, так как небольшое количество одного из ферментов элюируется в первые 5 см$^3$ фракции, которые могут быть проверены на хроматограмме. Если весь фермент элюируется в первые 5 см$^3$ фракции, то активность измеряют только в этой фракции и расчет корректируют путем деления молокосвертывающей активности на два. При этом время свертывания остальных 5 см$^3$ фракции должно быть не более 1800 с.

В целом рекомендуется вводить пробу известного состава через равные промежутки времени, в частности, при использовании автоматизированного метода.

Регулируют программу, если разделение фракции химозина и пепсина не является полным.

### 7.7 Определение времени свертывания

Тщательно перемешивают содержимое каждой фракции, полученной в соответствии с 7.6.1 или 7.6.2 до отбора пробы для анализа. Проводят необходимые разведения буферным раствором II (4.12.2) для первой фракции и буферным раствором III (4.12.3) для второй фракции.

Определяют время свертывания первой и второй элюированных фракций в соответствии с ISO 11815|IDF 157 с учетом следующего.

Определяют первую фракцию вместе с контрольным рабочим раствором сычужного фермента и вторую фракцию вместе с контрольным рабочим раствором говяжьего пепсина. Определяют время свертывания дважды в быстрой последовательности для каждой пары контрольных рабочих растворов и фракции, используя среднее время для вычислений.

Для анализа молока на свертываемость в соответствии с ISO 11815|IDF 157, при необходимости, допускается пятикратно увеличивать объем пробы, чтобы получить время свертывания в пределах от 350 до 550 с.

При этих условиях разводят соответствующий эталонный рабочий раствор сычужного фермента тем же буфером, который использовался для элюирования конкретной фракции, чтобы сохранить те же условия коагуляции для пробы и эталонного рабочего раствора сычужного фермента. Если требуется в три раза больший объем пробы (1,5 см$^3$ вместо 0,5 см$^3$), то для испытания молока на свертываемость следует использовать в три раза больший объем эталонного рабочего раствора фермента (1,5 см$^3$ вместо 0,5 см$^3$) (см. ISO 11815|IDF 157, 9.5.1).

Для фракций пробы с очень низким уровнем химозина или пепсина допускается время свертывания более 550 с только после увеличения в пять раз объема пробы на испытание.

Определяют время свертывания промежуточной и конечной фракций путем добавления пятикратного объема пробы (2,5 см$^3$ на 25 см$^3$ молока). Время свертывания должно быть более 1800 с, меньшее время показывает, что разделение было неудовлетворительным.

Выполняют все анализы как можно быстрее после разделения химозина и пепсина из-за вероятности денатурации ферментов в разбавленных растворах.

## 8 Вычисление и представление результатов

### 8.1 Вычисление активности химозина и пепсина, выражаемой в процентах

Активность химозина и говяжьего пепсина, выраженную в международных единицах свертываемости ММЕ/см$^3$, как указано в ISO 11815|IDF 157, можно пересчитать на активность химозина $a_c$, %, и говяжьего пепсина $a_p$, %, используя формулы соответственно

$$a_c = \frac{n_c \cdot 100}{n_c + n_p}, \quad (1)$$

$$a_p = 100 - a_c, \quad (2)$$

где $n_c$ — содержание химозина, выраженное в ММЕ/см$^3$;

$n_p$ — содержание пепсина, выраженное в ММЕ/см$^3$.

### 8.2 Вычисление активности химозина и говяжьего пепсина, в миллиграммах на дм$^3$

Концентрацию активного химозина и говяжьего пепсина выражают в миллиграммах на дм$^3$, если для приготовления субстрата используется стандартный молочный порошок. Коэффициенты $K_c$, $K_p$, $f_c$ и $f_p$ для стандартного молочного порошка предоставлены поставщиком (Cecalait)[1]. Концентрацию $\rho_x$ (или $\rho_c$ или $\rho_p$) химозина или говяжьего пепсина в ферментном препарате, мг/дм$^3$, вычисляют по формуле

$$\rho_x = \frac{K_x}{t_x - f_x} \frac{V}{V_p} d \frac{t_2}{t_1}, \quad (3)$$

где $K_x$ (или $K_c$, или $K_p$) — коэффициент, применяемый для вычисления концентрации активного химозина или говяжьего пепсина, мг/дм$^3$;

$t_x$ (или $t_c$, или $t_p$) — время свертывания, полученное с использованием 0,5 см$^3$ фракции 1, с;

$f_x$ — поправочный коэффициент $f_c$ или $f_p$ для времени задержки коагуляции, с;

$V_p$ — объем обессоленного препарата, используемого для анализа (7.6), см$^3$;

[1] Cecalait, rue de Versailles, B.P. 70129, 39802 POLIGNY, FRANCE (e-mail: gost.e-ecolog.ru ). Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке поставщика этого продукта со стороны ISO или IDF.

$V$ — объем собранной фракции ($V$ = 50 см$^3$), см$^3$;

$d$ — коэффициент разбавления или концентрации анализируемой фракции (например, $d$ = 3, когда 1 см$^3$ фракции был разбавлен 2 см$^3$ буфера для проведения испытания на свертываемость, и $d$ = 0,25, когда вместо 0,5 см$^3$ использовались 2 см$^3$ для 25 см$^3$ молока при испытании на свертываемость);

$t_1$ — время свертывания, полученное с разбавленным ферментным препаратом (7.5), с;

$t_2$ — время свертывания, полученное с обессоленным ферментным препаратом в том же разбавлении (7.5.2 или 7.5.3), с.

Для конкретного порошкового молока и конкретного ферментного препарата поправочный коэффициент $f$ получают путем построения графика времени свертывания относительно $1/\rho$ (см. пример). В соответствии с формулой Хольтера $t = f + b/c$, где $f$ — это экстраполированное значение $t$ для $b/c$ = 0. Поставщик стандартного порошкового молока также дает коэффициент $f$.

Пример — Для определения константы $f$ для фракции химозина готовят 100 см$^3$ концентрированного раствора чистого химозина в буферном растворе II (4.12.2). Этот препарат может быть получен из одного или нескольких разделений телячьего сычужного фермента (первая фракция) на хроматографе. Затем готовят не менее шести разных разбавлений этого препарата буферным раствором II (4.12.2).

Определяют время свертывания разных разбавлений в соответствии с методом, установленным в ISO 11815|IDF 157. Время свертывания следует равномерно распределить от 240 до 1200 с.

Значение $\rho$ для наименьшего разбавления (время свертывания около 300 с) принимают за 1,00, а значения для других разбавлений устанавливают в зависимости от этого, например, 0,50 (1/2), 0,33 (1/3), 0,25 (1/4), и т. д. Строят график $t = d\,(1/\rho)$ и вычисляют поправочный коэффициент $r$. Если $r$ равен или больше 0,999, можно определить константу $f$; если $r$ меньше 0,999, делают новые разбавления и повторяют измерение времени свертывания.

Для определения константы $f$ для фракции говяжьего пепсина готовят 100 см$^3$ концентрированного раствора чистого говяжьего пепсина в буферном растворе III (4.12.3). Этот препарат может быть получен из одного или нескольких разделений ферментного препарата из сычугов крупного рогатого скота (вторая фракция) на хроматографе. Затем готовят не менее шести разных разбавлений этого препарата буферным раствором III (4.12.3).

Определяют время свертывания в тех же временных пределах, как указано для фракции химозина, и вычисляют $r$. Если $r$ равно или больше 0,999, можно определить константу $f$.

### 8.3 Выражение результатов

Выражают результат испытания с точностью до целых значащих цифр.

## 9 Прецизионность

### 9.1 Межлабораторные испытания

Значения параметров прецизионности получены по результатам межлабораторных испытаний жидких ферментных препаратов, проведенных в 1995 г. в соответствии с ISO 5725[1)]. Результаты межлабораторных испытаний были статистически проанализированы вновь в марте 2009 г. в соответствии с [3] и [4]. Полученные значения не могут быть применимы к диапазонам концентраций и матрицам, кроме указанных.

Результаты исследования приводятся в приложении В.

Примечания

1 Значения повторяемости и воспроизводимости выводят из значений среднеквадратических отклонений $s_D$, которые являются оценками истинного среднеквадратического отклонения метода. Каждое значение повторяемости и воспроизводимости представляет максимальную разницу между двумя результатами испытаний, ожидаемых в 95 % случаев, при сравнении двух результатов. Если, в конечном итоге, значительно меньше, чем 95 % случаев находятся в пределах значений, указанных ниже (9.2 и 9.3), то рекомендуется проанализировать условия выполнения анализа.

2 Из-за некоторых различий растворяющей способности и определенной степени неоднородности порошкового ферментного препарата, процентные значения параметров прецизионности, повторяемости и воспроизводимости могут быть несколько выше при анализе порошкового сычужного фермента.

### 9.2 Повторяемость

Среднеквадратическое отклонение $s_r$ и коэффициент вариации повторяемости $C_{V,\,r}$, выражающие изменчивость независимых аналитических результатов, полученных одним и тем же оператором, на одном и том же оборудовании, в одних и тех же условиях, на одной и той же пробе для анализа жидкого ферментного препарата, в течение короткого промежутка времени, не более чем в 5 % случаев будет больше, чем a) или b):

---

[1)] ISO 5725:1986, в настоящее время отменен и заменен (в частях) на [3] и [4].

a) 0,7 % $s_r$ в абсолютном значении, выражая активность химозина и говяжьего пепсина в процентах;

b) 3,6 % $C_{V,\,r}$ по отношению к среднеарифметическому содержания химозина, выраженному в миллиграммах на дм$^3$, и 8,4 % $C_{V,\,r}$ по отношению к среднеарифметическому содержания говяжьего пепсина, выраженному в миллиграммах на дм$^3$.

Если два результата получены в этих условиях, то абсолютная разница $r$ между двумя результатами анализа жидкого ферментного препарата не будет превышать 2,0 % в абсолютном значении активности химозина и говяжьего пепсина в процентах.

### 9.3 Воспроизводимость

Среднеквадратическое отклонение $s_R$ и коэффициент вариации воспроизводимости $C_{V,\,R}$, выражающие изменчивость независимых аналитических результатов, полученных операторами в разных лабораториях, на разном оборудовании, в разных условиях анализа одной и той же пробы ферментного препарата, не более чем в 5 % случаев будет больше, чем a) или b):

a) 1,2 % $s_R$ в абсолютном значении, выражая активность химозина и говяжьего пепсина в процентах;

b) 6,9 % $C_{V,\,R}$ по отношению к среднеарифметическому содержания химозина, выраженному в миллиграммах на дм$^3$, и 12,0 % $C_{V,\,R}$ по отношению к среднеарифметическому содержания говяжьего пепсина, выраженному в миллиграммах на дм$^3$.

Если два результата получены в этих условиях, то абсолютная разница $R$ между двумя результатами анализа жидкого ферментного препарата не будет превышать 3,3 % в абсолютном значении активности химозина и говяжьего пепсина в процентах.

Примечания

1 Если, например, в одной лаборатории было установлено, что содержание химозина близко к 80 %, то результат, полученный в другой лаборатории, не должен отклоняться более чем на 3,3 % в абсолютном значении от 80 %, т. е. результаты должны находиться между 76,7 % и 83,3 %.

2 Значения показателей прецизионности действительны при оценке результатов широкого круга лабораторий. Опыт показывает, что высококвалифицированные специалисты лабораторий способны проводить анализ с воспроизводимостью $R$ между лабораториями, равной 1,9 % абсолютного значения, выраженного как процент активности химозина.

## 10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующую информацию:

a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы, включая подробности о фазе (жидкая или сухая);

b) применяемый метод отбора проб, если он известен;

c) применяемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все подробности проведения испытания, не указанные в настоящем стандарте или считающиеся необязательными, а также подробности, касающиеся любых инцидентов, которые могут повлиять на результат(ы);

e) полученный(е) результат(ы) испытания;

f) в случае проверки повторяемости, окончательный полученный зарегистрированный результат.

**Приложение А**
**(справочное)**

## Количественное определение молокосвертывающих ферментов в промышленных коагулянтах методом двойной иммунодиффузии

### А.1 Общие требования

Цель данного метода — определение возможного наличия одного или нескольких из следующих шести коагулирующих ферментов: химозина, говяжьего пепсина, свиного пепсина, ферментов из *Rhizomucor (Mucor) miehei, Rhizomucor (Mucor) pusillus* и *Cryphonectria (Endothia) parasitica* в ферментных препаратах.

Примечание — Метод, рассматриваемый в данном приложении, является дополнением к методу определения содержания химозина и говяжьего пепсина в ферментных препаратах из сычугов телят и крупного рогатого скота, при условии, что этот метод позволяет установить, только ли химозин и говяжий пепсин присутствуют в таких экстрактах или в них также имеются наиболее распространенные молокосвертывающие ферменты (кроме химозина и говяжьего пепсина). В последнем случае хроматографический метод неприменим. Не все молокосвертывающие ферменты можно идентифицировать с помощью этого метода, однако идентификация наличия химозина и говяжьего пепсина и отсутствие наиболее распространенных заменителей сычужного фермента дают высокую уверенность в том, что анализируемый ферментный препарат является натуральным ферментным препаратом животного происхождения.

Данный метод применим: a) ко всем ферментам из говяжьих и свиных желудков, способствующим коагуляции, и b) к ферментам, способствующим коагуляции и произведенным в промышленных целях из особых штаммов грибов *Rhizomucor (Mucor) miehei, Rhizomucor (Mucor) pusillus* и *Cryphonectria (Endothia) parasitica*.

### А.2 Принцип

В агарозной среде преципитация специфических антигенов-антител позволяет визуально определить наличие вышеуказанных ферментов в ферментных препаратах [10]. Первый шаг — наносят слой агарозы на пластинку. После затвердения агарозы в слое агарозного геля вырезают маленькие лунки, одни из которых заполняют антигеном в разных концентрациях, а другие — антисывороткой. Каждый из антагонистов мигрируют по направлению друг к другу (двойная иммунодиффузия) и образуются иммунные комплексы, которые преципитируют в полях геля и становятся видимыми как линии преципитации, когда относительные концентрации антигена и антисыворотки являются оптимальными.

### А.3 Оборудование и химическая посуда

Используют обычное лабораторное оборудование и химическую посуду, в частности, нижеприведенные.

А.3.1 Стеклянные пластинки (10 × 10 см) или покрытая агарозой полиэфирная пленка «Gelbond», имеется в наличии в FMC Corporation, Bio Products, Rockland, Maine 04841, USA[1)].

А.3.2 Микропипетки вместимостью 0,004 $см^3$ и 0,015 $см^3$.

А.3.3 Штампы размером диаметра 2,5 и 4,0 мм.

А.3.4 Пластмассовые подносы для окрашивания и промывания пластинок.

### А.4 Реактивы

Используют реактивы только установленного аналитического качества и дистиллированную или деминерализованную воду, либо воду эквивалентной чистоты.

Примечание — Любое упоминание или информация о праве собственности в настоящем стандарте приведены для удобства пользователей настоящего стандарта и не являются подтверждением таких прав со стороны ISO или IDF.

А.4.1 Агароза, Indubiose A37 (IBF), тип HSA (Litex)[2)] или эквивалентный.

Примечание — Выбор агарозы не является решающим.

А.4.2 Хлорид натрия (NaCl).

---

[1)] «Gelbond» является примером имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

[2)] Indubiose A37 — это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

А.4.3 Этанол, 95 %.

А.4.4 Уксусная кислота, 100 % (кристаллизованная).

**А.4.5 Моноспецифические антитела и эталонные ферментные растворы**

Моноспецифические антитела и эталонные ферментные растворы вместе с необходимыми инструкциями по применению можно получить в INRA (FR) или CHR. HANSEN (DK)[1)].

А.4.6 Кумасси бриллиантовый голубой, краситель R-250 или Serva Blue R[2)].

**А.5 Методика**

**А.5.1 Приготовление пластин с агарозой**

А.5.1.1 Хлорид натрия, массовая доля 9 г/дм$^3$.

Растворяют 9 г хлорида натрия в 1 дм$^3$ дистиллированной воды.

А.5.1.2 Раствор агарозы

Добавляют 1 г агарозы (А.4.1) к 100 см$^3$ 0,9 %-ного хлорида натрия (А.5.1.1) и растворяют на водяной бане при температуре 100 °С. Готовят свежий агарозный раствор непосредственно перед использованием.

А.5.1.3 Приготовление пластин с агарозой

После промывания стеклянных пластин этанолом наносят кистью слой агарозы. Как только пленка агарозы высохнет полностью, устанавливают пластину горизонтально, пипеткой наносят слой раствора агарозы (А.5.1.2) на пластину при 60 °С и оставляют отвердевать. Толщина слоя должна составлять 1,5 мм, например, для пластины размером 10 × 10 см требуется 15 см$^3$ раствора агарозы. Используя покрытую агарозой полиэфирную пленку, наливают 15 см$^3$ раствора агарозы на гидрофильную поверхность и оставляют отвердевать.

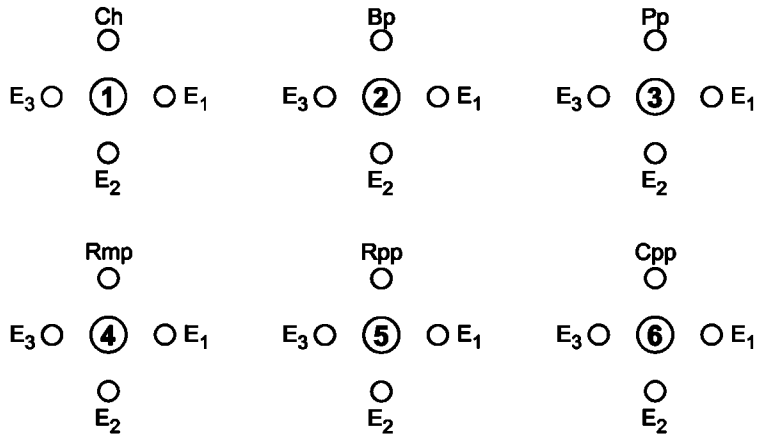
**А.5.2 Диффузия**

А.5.2.1 Приготовление проб

Можно анализировать неразведенные пробы, если их концентрация не превышает 200 МЕ/см$^3$, или анализировать пробы в разных разбавлениях водой (например, 1 : 20 и 1 : 100). Разводят эталонные ферментные растворы в соответствии с указаниями изготовителя, которые прилагаются к поставляемым антигенам и антисыворотке.

А.5.2.2 Приготовление пластин с агарозой

Непосредственно перед началом диффузии вырезают маленькие цилиндрические лунки в слое агарозы, используя штамп (А.3.3). В соответствии с объемом пробы (см. указания изготовителя) лунки должны быть диаметром 2,5 или 4,0 мм. Центр лунки с пробой должен располагаться на расстоянии 5 мм от центра лунки с антителом (см. рисунок А.1).




*1* — кроличья антисыворотка к химозину; *2* — кроличья антисыворотка к говяжьему пепсину; *3* — кроличья антисыворотка к свиному пепсину; *4* — кроличья антисыворотка к протеазе *Rhizomucor miehei*; *5* — кроличья антисыворотка к протеазе *Rhizomucor pusillus*; *6* — кроличья антисыворотка к протеазе *Cryphonectria parasitica*; Ch — эталонная проба химозина; Bp — эталонная проба говяжьего пепсина; Pp — эталонная проба свиного пепсина; Rmp — эталонная проба протеазы *Rhizomucor miehei*; Rpp — эталонная проба протеазы *Rhizomucor pusillus*; Cpp — эталонная проба протеазы *Cryphonectria parasitica*; $E_1$ — проба для анализа (испытуемая проба); $E_2$ — проба для анализа (испытуемая проба); $E_3$ — проба для анализа (испытуемая проба)

Рисунок А.1 — Пример расположения пластин

---

1) INRA, place du Champ de Foire, 39800 POLIGNY, France and Chr. Hansen A/S, 1-27 Jemholmen, 2650 HVIDOVRE, Denmark (fax + 45 36 86 77 76) — организации, поставляющие эти продукты.

2) Dye R-250 или Serva Blue R — это пример имеющихся в продаже подходящих продуктов. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о поддержке этих продуктов со стороны ISO или IDF.

Примечание — $E_1$, $E_2$ и $E_3$ могут быть тремя разными сычужными ферментами или одним ферментом в трех разных разведениях, т. е. неразведенные, разведенные в 20 и 100 раз соответственно.

**А.5.2.3 Введение проб**

В зависимости от диаметра лунки используют микропипетку (А.3.2) для введения 0,004 или 0,015 $см^3$ пробы в нужную лунку. Вводят антисыворотку в центральную лунку, эталонный фермент — в верхнюю лунку, а пробу для анализа и два разведения — в три другие лунки (см. рисунок А.1). Затем оставляют пластинки в атмосфере, насыщенной водяными парами, при комнатной температуре на период от 10 до 15 ч или следуют указаниям поставщика антисыворотки и эталонных ферментных растворов.

**А.5.3 Окрашивание пластин (необязательно)**

Рекомендуется окрашивать пластины, так как преципитат становится чище и он может проявиться в большей степени.

А.5.3.1 Приготовление красителя

Растворяют 5 г красителя голубого бриллиантового кумасси (А.4.6) в 1 $дм^3$ растворителя, приготовленного из этанола (А.4.3), уксусной кислоты (А.4.4) и воды в объемах 4,5 + 1,0 + 4,5 соответственно. Нагревают полученный раствор до 60 °С и фильтруют.

А.5.3.2 Промывание и окрашивание пластин

Каждую пластину покрывают одним слоем фильтровальной бумаги и несколькими слоями (например, 0,5 см) мягкой абсорбирующей бумаги, предварительно слегка спрессовав ее (например, с помощью книг) в течение не менее 10 мин. Бумагу удаляют и вымачивают пластину в растворе хлорида натрия массовой долей 9 $г/дм^3$ (А.5.1.1) более 1 ч. Повторяют процедуру прессования в течение 10 мин. Промывают пластину раствором хлорида натрия массовой долей 9 $г/дм^3$ при комнатной температуре всю ночь.

Пластину опять прессуют и вымачивают в дистиллированной воде в течение 30 мин. После вымачивания пластину заново прессуют и высушивают ее горячим воздухом.

Пустые лунки геля заполняют дистиллированной водой, чтобы предотвратить растрескивание геля во время прессования. Фильтровальную бумагу с геля удаляют после каждого прессования. Процедуру промывания можно изменить, используя более длительное время для промывания и меньше или совсем не применяя прессование геля, или используя более короткий промежуток времени промывания и более частое прессование геля (см. также инструкции поставщика).

Вымачивают пластину в красителе (А.5.3.1) не менее 15 мин.

Обесцвечивают пластину раствором этанола, уксусной кислоты и воды в объемах 4,5 + 1,0 + 4,5 соответственно, который применяют для приготовления красителя (А.5.3.1). Допускается после обесцвечивания пластину промыть водой и высушить горячим воздухом.

**А.6 Интерпретация результатов**

Кривые преципитации могут быть отмечены непосредственно после инкубации в виде матово-белой линии преципитации, но преципитат часто становится более заметным после окрашивания.

Возникновение линии преципитации между лункой, содержащей антитело против фермента А, и лункой, содержащей пробу для анализа Е, показывает присутствие фермента А в пробе Е. Между линией преципитации эталонного фермента и линией преципитации пробы должна быть непрерывность (см. рисунок А.2).

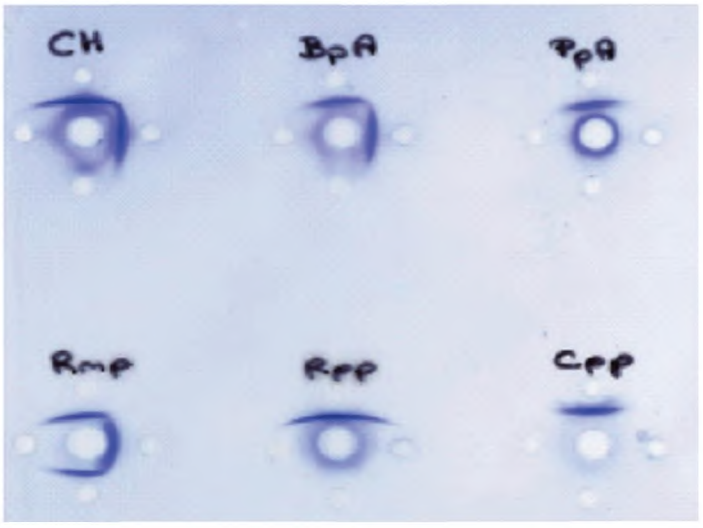



Рисунок А.2 — Пример результатов двойной иммунодиффузии

Пластина оценивается следующим образом:

- Преципитат между каждой сывороткой и соответствующей эталонной пробой (см. А.5.2.2) показывает, что испытание состоялось.
- Проба $E_1$ содержит химозин (CH), говяжий пепсин (BpA) и протеазу *Rhizomucor miehei* (Rmp).
- Проба $E_2$ содержит только протеазу *Rhizomucor miehei* (Rmp).
- Ни одна из проб не содержит свиной пепсин (PpA).
- Пробы $E_3$ не было на этой пластине.

### А.7 Чувствительность

Чувствительность метода меняется в зависимости от используемой антисыворотки, но в сычужном ферменте молокосвертывающей активностью 200 ММЕ/см$^3$ присутствие фермента можно легко обнаружить в смеси. В целом, может быть достигнуто пороговое значение 1 % общей активности фермента.

**Приложение В**
**(справочное)**

## Межлабораторные испытания

### В.1 Общие положения

Международные совместные испытания по IDF 110, включающие 10 лабораторий из шести стран, проводились на ферментных препаратах животного происхождения в 1995 г. Международное исследование было организовано м-ром А. Андрен (A. Andrén) (Швеция) осенью 1995 г. при участии: C. Repelius (NL), J.-C. Collin (FR), T. Sørhaug (NO), J.A. Jans (NL), M. Rampilli (IT), M. Harboe (DK), A. van Boven (NL), M. Stolz (FR), P. Molinari (IT) и A.-K. Levin (SE). Планирование эксперимента и статистический анализ результатов испытания были проведены в соответствии с [3] и [4].

### В.2 Пробы и результаты

Испытания проводились на четырех разных партиях жидкого ферментного препарата с высоким, средним и низким коэффициентами активности химозина и различными уровнями содержания химозина и говяжьего пепсина соответственно. Четыре партии были поделены на восемь слепых двойных проб (1/4, 2/3, 5/7 и 6/8).

Результаты испытания были повторно статистически проанализированы и обновлены в 2010 г. в соответствии с [3] и [4].Эти результаты приведены в таблицах В.1—В.3. Результаты, определяемые как выбросы (Кочран: слишком большая разница между дубликатами; Грабс: слишком большая разница между лабораториями), были исключены после статистического анализа. Межлабораторные испытания ферментных проб дали хорошие результаты повторяемости и воспроизводимости, особенно активность химозина в процентном отношении (см. таблицу В.1).

Т а б л и ц а В.1 — Статистическая оценка коэффициента активности химозина, %, из 10 лабораторий

| Проба | Среднее значение, % | $s_r$ | $C_{V,r}$, % | $r$ | $r_{rel}$, % | $s_R$ | $C_{V,R}$, % | $R$ | $R_{rel}$, % | Выбросы |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/4 | 90,40 | 0,69 | 0,76 | 1,93 | 2,13 | 0,73 | 0,81 | 2,05 | 2,27 | 0 |
| 2/3 | 54,36 | 0,69 | 1,28 | 1,94 | 3,57 | 1,34 | 2,46 | 3,75 | 6,89 | 0 |
| 5/7 | 20,33 | 0,28 | 1,40 | 0,79 | 3,91 | 1,16 | 5,69 | 3,24 | 15,92 | 1 Кохран |
| 6/8 | 72,55 | 0,94 | 1,29 | 2,62 | 3,61 | 1,41 | 1,94 | 3,94 | 5,43 | 1 Грабс |
| Среднее значение | — | 0,65 | 1,18 | 1,82 | 3,31 | 1,16 | 2,72 | 3,24 | 7,63 | — |

Т а б л и ц а В.2 — Статистическая оценка содержания химозина, мг/дм$^3$, из 10 лабораторий

| Проба | Среднее значение, % | $s_r$ | $C_{V,r}$, % | $r$ | $r_{rel}$, % | $s_R$ | $C_{V,R}$, % | $R$ | $R_{rel}$, % | Выбросы |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/4 | 599,00 | 24,11 | 4,02 | 67,50 | 11,27 | 40,93 | 6,83 | 114,59 | 19,13 | 0 |
| 2/3 | 456,15 | 12,73 | 2,79 | 35,64 | 7,81 | 29,47 | 6,46 | 82,51 | 18,09 | 0 |
| 5/7 | 216,94 | 7,68 | 3,54 | 21,50 | 9,91 | 16,92 | 7,80 | 47,36 | 21,83 | 1 Кохран |
| 6/8 | 513,78 | 21,47 | 4,18 | 60,10 | 11,70 | 32,60 | 6,35 | 91,29 | 17,77 | 1 Грабс |
| Среднее значение | — | 16,50 | 3,63 | 46,19 | 10,17 | 29,98 | 6,86 | 83,94 | 19,20 | — |

Т а б л и ц а В.3 — Статистическая оценка содержания пепсина, мг/дм$^3$, из 10 лабораторий

| Проба | Среднее значение, % | $s_r$ | $C_{V,r}$, % | $r$ | $r_{rel}$, % | $s_R$ | $C_{V,R}$, % | $R$ | $R_{rel}$, % | Выбросы |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/4 | 193,65 | 16,22 | 8,38 | 45,43 | 23,46 | 19,40 | 10,02 | 54,33 | 28,06 | 0 |
| 2/3 | 1169,90 | 43,98 | 3,76 | 123,15 | 10,53 | 107,72 | 9,21 | 301,63 | 25,78 | 0 |
| 5/7 | 2665,90 | 366,60 | 13,75 | 1026,47 | 38,50 | 468,92 | 17,59 | 1312,98 | 49,25 | 0 |
| 6/8 | 612,35 | 47,53 | 7,76 | 133,09 | 21,73 | 68,49 | 11,18 | 191,77 | 31,32 | 0 |
| Среднее значение | — | 118,58 | 8,41 | 332,03 | 23,56 | 166,13 | 12,00 | 465,18 | 33,60 | — |

**Приложение ДА**
**(справочное)**

## Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица ДА.1

| Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта | Степень соответствия | Обозначение и наименование межгосударственного стандарта |
|---|---|---|
| ISO 11815/IDF 157:2007 Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности | — | * |
| * Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. | | |

## Библиография


[1] ISO 707|IDF 50:2008 Milk and milk products — Guidance on sampling

[2] ISO 1042 Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks

[3] ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1. General principles and definitions

[4] ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

[5] Andrén, A., Rennets and coagulants. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P. editors. *Encyclopedia of dairy sciences*, 2nd edition, pp. 574—578. Elsevier, 2011

[6] Harboe, M., Broe, M.L., Qvist, K.B. The production, action and application of rennet and coagulants. In: Law, B.A., Tamine, A.Y., editors. *Technology of cheesemaking*, second edition, pp. 98—129. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010

[7] Andrén, A. Milk-clotting activity of various rennets and coagulants: Background and information regarding IDF Standards. In: *The use of enzymes in dairying,* Document No. 332, pp. 9—14. Brussels: International Dairy Federation, 1998

[8] Garnot, P., Thapon, J.L., Mathieu, C.M., Maubois, J.L., Ribadeau-Dumas, B. Determination of rennin and bovine pepsins in commercial rennets and abomasal juices. *J. Dairy Sci.* 1972, 55, pp. 1641—1650

[9] Collin, J.C., Martin, P., Garnot, P., Ribadeau-Dumas, B., Mocquot, G. Determination of chymosin and bovine pepsin A in commercial bovine rennets and pepsins. *Milchwissenschaft* 1981, 36, pp. 32—35

[10] Collin, J.C., Muset de Retta, G., Martin, P. Immunological identification of milk-clotting enzymes. *J. Dairy Res.* 1982, 49, pp. 221—230

[11] International Collaborative Study on Calf Rennet and Adult Bovine Rennet — Determination of Chymosin and Bovine Pepsin Contents — Bull. IDF

УДК 637.1:006.354 МКС 67.100.01 IDT

Ключевые слова: молоко и молочные продукты, сычужный фермент из желудка телят и взрослых коров, определение содержания химозина и говяжьего пепсина методом хроматографии, принцип, реактивы, аппаратура, отбор проб, методика, вычисление и представление результатов, прецизионность, протокол испытаний

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.М. Малахова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 17.03.2015. Подписано в печать 20.04.2015. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,35. Тираж 36 экз. Зак. 1746.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru