ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ГОСТ Р 55979— 2014**

# ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

## Методы определения пектат- и пектин-лиазной активностей

**Издание официальное**

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всерос-сийским научно-исследовательским институтом пищевой биотехнологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 176 «Спир-товая, дрожжевая и ликероводочная продукция»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 марта 2014 г. № 222-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). 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 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.ru)*

© Стандартинформ, 2014

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

## Методы определения пектат-и пектин-лиазной активностей

**Enzyme preparations. Methods for the determination ofpectat- i pectin-lyazactivity**

Дата введения — 2015–07–01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты и ферментсодержащие смеси — источники ферментов, разрушающие пектиновые вещества по трансэлиминазному механизму действия, применяемые в пищевой промышленности, и устанавливает методы определения пектат- и пектин-лиазной активности.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ИСО 5725-2–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ Р 53228–2008 Весы неавтоматического действия. Часть I. Метрологические технические требования. Испытания

ГОСТ Р 55298–2012 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения пектолитической активности.

ГОСТ 12.0.004–90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

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

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

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

ГОСТ 12.2.007.0–75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

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

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

ГОСТ 12.4.103–83 Система стандартов безопасности труда. Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация

ГОСТ 61–75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

ГОСТ 199–78 Реактивы. Натрий уксуснокислый 3-х водный. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 450–77 Реактивы. Кальций хлористый. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9412–93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 10652–73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N, N, N', N'- тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б). Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13867–68 Продукты химические. Обозначения чистоты

ГОСТ 18481–81 Цилиндры стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 20264.0–74 Препараты ферментные. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 20903–75 Кюветы прямоугольные кварцевые для спектрофотометров. Основные размеры. Технические требования

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

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

ГОСТ 29186–91 Пектин. Технические условия

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

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 применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **трансэлиминазы:** Ферменты, осуществляющие негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойной связи в продуктах расщепления.

3.2 **субстрат:** Соединение или вещество, на которое воздействует данный фермент.

3.3 **пектин:** Высокомолекулярный полисахарид, состоящий из водорастворимых полигалактуроновых кислот, карбоксильные группы которых в различной степени этерифицированы метанолом.

3.4 **системные названия ферментов:** Названия, указывающие на природу химической реакции, катализируемой данным ферментом, в соответствии с современной классификацией (КФ), принятой Международной комиссией по ферментам.

Примечание — По субстратной специфичности действия пектин-трансэлиминазы подразделяют на две основные группы (см. [1]):

1 полигалактуронатлиаза (КФ 4.2.2.2) — пектат-лиаза — катализирует неупорядоченное расщепление пектатов с образованием ненасыщенных продуктов гидролиза;

2 полиметилгалактуронатлиаза (КФ 4.2.2.10) — пектин-лиаза — катализирует расщепление высокоэтерифицированного пектина без предварительной деэтерификации.

3.5 **ферментативная активность:** Количество фермента, катализирующее гидролиз 1 мкмоля субстрата в определенных условиях.

## 4 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:

- температура окружающего воздуха .....(20 ± 1) °С;

- относительная влажность воздуха .....(60 ± 20) %;
- атмосферное давление .....(84,0÷106,7) кПа;
- напряжение в сети.....(220 ± 10) В.

## 5 Метод определения пектат-лиазной активности (пектат-лС)

### 5.1 Сущность метода

5.1.1 Метод определения пектат-лиазной активности основан на расщеплении низкометоксилированного пектина анализируемым ферментным препаратом до ненасыщенных продуктов гидролиза, увеличивающих оптическую плотность на 0,1.

5.1.2 За единицу пектат-лиазной активности Пектат-лС принято такое количество фермента, которое вызывает образование ненасыщенных продуктов гидролиза пектина при температуре 40 °С, детектируемых при длине волны 235 нм.

Активность выражается ед. Пектат-лС/г (для сухого) или ед. Пектат-лС/см$^3$ (для жидкого) анализируемого ферментного препарата.

Диапазон измерений составляет от 30 до 100 единиц пектат-лиазной (пектат-лС) активности.

### 5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы, материалы

5.2.1 Для определения пектат-лиазной активности используют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, посуду, реактивы, материалы:

- весы неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность взвешивания с пределами допускаемой погрешности ± 0,01 г;
- спектрофотометр с дейтериевой и галогенной лампами, со спектральным диапазоном измерений от 190 до 1100 нм, пределами допускаемой абсолютной погрешности при измерении оптической плотности ± 0,003;
- pH-метр любого типа для измерения в диапазоне от 0 до 14 ед. pH с пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 0,1 ед. pH;
- холодильник бытовой любой марки;
- мешалку магнитную любой марки, которая обеспечивает скорость вращения до 800 об/мин$^{-1}$;
- ультратермостат или водяной термостат с точностью регулирования температуры ± 1 °С;
- центрифугу лабораторную любого типа, которая обеспечивает скорость вращения не менее 7000 об/мин $^{-1}$;
- баню водяную любого типа, которая обеспечивает поддержание температуры (100 ± 1) °С;
- секундомер с емкостью шкалы счетчика 1 мин, ценой деления 1 с и погрешностью ± 1,5 с;
- пипетки автоматические вместимостью от 0,1 до 1,0 см$^3$, 1,0 см$^3$ и от 0,2 до 5,0 см$^3$ с наконечниками;
- встряхиватель для перемешивания жидкости со скоростью вращения от 50 до 3400 об/мин.;
- термометры ртутные стеклянные лабораторные от 0 °С до 50 °С и от 0 °С до 100 °С с ценой деления 0,1 °С или 0,5 °С по ГОСТ 28498;
- стаканы и колбы стеклянные лабораторные В-1-150 ТС, В-1-800 ТС, Кн-1-100-14/23 ТС по ГОСТ 25336;
- стаканчики для взвешивания (бюксы) СВ-19/9 по ГОСТ 25336;
- стаканы В-1 вместимостью от 100 до 2000 см$^3$ по ГОСТ 25336;
- воронки В-75-140 ХС по ГОСТ 25336;
- пробирки П1-14-120 ХС или П1-16-150 ХС по ГОСТ 25336;
- колбы мерные 1-25-2, 1-50-2, 1-100-2, 1-200-2, 1-250-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770;
- цилиндры 1-25-2, 1-50-2, 1-100-2, 1-250-2 по ГОСТ 1770;
- пипетки стеклянные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5, 1-2-2-10 по ГОСТ 29227;
- кюветы кварцевые термостатируемые по ГОСТ 20903;
- бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
- марля медицинская по ГОСТ 9412;
- пектин яблочный со степенью метоксилирования не более 35 % и массовой долей основного вещества не менее 70 % по ГОСТ 29186;
- трис (оксиметиламинометан) с массовой долей основного вещества 99 %;
- кислоту соляную по ГОСТ 3118;

- кальций хлористый по ГОСТ 450;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Примечание — Для приготовления растворов (см. 4.3) используют дистиллированную воду температурой 20 °С.

5.2.2 Все реактивы должны относиться к подгруппе чистоты 2 (х. ч.) или 3 (ч. д. а.) по ГОСТ 13867.

5.2.3 Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам, а также посуды, реактивов и материалов, по качеству не хуже вышеуказанных.

**5.3 Подготовка к анализу**

5.3.1 Отбор проб — по ГОСТ 20264.0.

**5.3.2 Приготовление трис-HCL-буферного раствора молярной концентрацией 0,2 моль/дм3 с 8,4 ед. pH из растворов трис (оксиметиламинометана) и соляной кислоты**

5.3.2.1 Приготовление раствора трис (оксиметиламинометана) молярной концентрации 0,2 моль/дм$^3$ (раствор А)

В мерную колбу вместимостью 1 дм$^3$ помещают (24,23 ± 0,01) г трис (оксиметиламинометана) и растворяют приблизительно в 300 см$^3$ дистиллированной воды. Затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора трис (оксиметиламинометана) в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С — не более 1 мес.

5.3.2.2 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм$^3$ (раствор В)

8,57 см$^3$ концентрированной соляной кислоты растворяют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 1 дм$^3$.

Срок хранения раствора соляной кислоты в закрытой стеклянной посуде при температуре 20 °С — не более 1 мес.

5.3.2.3 Для приготовления трис-HCL-буферного раствора в колбе смешивают 25 см$^3$ раствора А с 18 см$^3$ раствора В и добавляют дистиллированной воды до объема 85–90 см$^3$ до получения кислотности буферного раствора, равной 8,4 ед. pH. При необходимости кислотность раствора доводят до 8,4 ед. pH одним из исходных растворов.

Срок хранения буферного раствора в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С — не более 1 мес.

**5.3.3 Приготовление раствора хлористого кальция молярной концентрации 0,01 моль/дм$^3$**

В мерную колбу вместимостью 100 см$^3$ помещают (0,11 ± 0,01) г безводного хлористого кальция и растворяют приблизительно в 25 см$^3$ дистиллированной воды. Затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора хлористого кальция в закрытой стеклянной посуде при температуре 20 °С — не более 1 мес.

**5.3.4 Приготовление 0,8 %-ного раствора пектина**

Пектин, взятый с расчетом, чтобы 100 см$^3$ раствора содержало 0,8 г чистого пектина в соответствии с ГОСТ Р 55298 (приложение А), всыпают тонкой струей при непрерывном перемешивании в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, в которую предварительно наливают 25 см$^3$ дистиллированной воды и 5–6 см$^3$ трис-HCL-буферногораствора, приготовленного по 4.3.1. Раствор непрерывно перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 ч до полного растворения пектина и корректируют водородный показатель до значения 8,4 ед. pH раствором трис (оксиметиламинометана) — раствор А, приготовленный по 4.3.1.1. По истечении этого времени объем раствора доводят до 100 см$^3$ дистиллированной водой, тщательно перемешивают и фильтруют через четыре слоя марли.

Срок хранения раствора пектина в холодильнике при температуре 4 °С — не более двух суток.

**5.4 Подготовка пробы**

Анализируемые пробы ферментных препаратов в сухом или жидком виде используют без предварительной подготовки.

**5.4.1 Приготовление основного раствора анализируемой пробы ферментного препарата**

В стаканчик для взвешивания шпателем помещают (0,1000 ± 0,0002) г сухого ферментного препарата для получения анализируемой пробы или (1,00 ± 0,02) $см^3$ жидкого ферментного препарата вносят в другой стаканчик пипеткой. Полученную пробу ферментного препарата суспендируют в стеклянном бюксе с небольшим количеством дистиллированной воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и тщательно перемешивают. Приготовленный раствор ферментного препарата является основным раствором анализируемой пробы.

Срок хранения основного раствора ферментного препарата при температуре 20 °С — не более 1 мес.

**5.4.2 Приготовление рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата**

Рабочий раствор анализируемого ферментного препарата готовят из основного раствора по 4.4.2 путем дальнейшего разведения его дистиллированной водой в зависимости от предполагаемой активности таким образом, чтобы при ее определении показания оптической плотности спектрофотометра были в пределах от 0,100 до 0,350 нм.

С учетом разведения рассчитывают количество препарата, взятого на анализ.

Каждую пробу анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии в требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-2.

Раствор готовят в день определения. Длительность использования рабочего раствора ферментного препарата не должна превышать 1 ч с момента приготовления во избежание потерь его ферментативной активности.

**5.5 Проведение определений**

Перед началом определения активности готовят реакционную смесь путем смешивания в строгой последовательности трех растворов: 0,8 %-ный раствор пектина + раствор трис-HCL-буфера молярной концентрации 0,2 моль/$дм^3$ + раствор хлористого кальция молярной концентрации 0,01 моль/$дм^3$ в соотношении 5:2:1 по объему.

Срок хранения реакционной смеси в закрытой стеклянной посуде при температуре 20 °С — не более 12 ч.

В опытную пробирку наливают 9 $см^3$ реакционной смеси и прогревают на водяной бане в течение 5 мин при температуре 40 °С. В прогретую реакционную смесь добавляют 1 $см^3$ раствора ферментного препарата и инкубируют на водяной бане 15 мин строго по секундомеру при температуре 40 °С. Затем отбирают 1 $см^3$ смеси и переносят в пробирку, содержащую 9 $см^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ для прекращения реакции.

В контрольную пробирку, содержащую 9 $см^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$, приливают 1 $см^3$ раствора ферментного препарата, содержимое тщательно перемешивают и добавляют 9 $см^3$ реакционной смеси.

Оптическую плотность анализируемого раствора измеряют против контрольного раствора на спектрофотометре в термостатируемых кварцевых кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 1 см при длине волны 235 нм.

**5.6 Обработка результатов**

Пектат-лиазную активность (пектат-лС) в анализируемой пробе ферментного препарата вычисляют по формулам:

- для сухого препарата в ед.пектат-лС/г:

$$\text{Пектат-лС} = \frac{D_0 \cdot 10}{T \cdot m \cdot 0{,}1}$$

где $D_0$ — оптическая плотность анализируемого раствора;

10 — разведение реакционной смеси;

$T$ — время реакции, 0,25 ч;

$m$ — масса ферментного препарата, взятая на анализ, г;

0,1 — условное увеличение оптической плотности в течение часа;

- для жидкого препарата в ед.пектат-лС/см$^3$:

$$\text{Пектат-лС} = \frac{D_0 \cdot 10}{T \cdot m \cdot 0{,}1} d$$

где $d$ — плотность для концентрированных жидких ферментных препаратов (см. ГОСТ 18481), г/см$^3$.

Оптическая плотность должна быть в пределах от 0,10 до 0,35 нм.

Если полученный результат определений выше верхнего предела диапазона измерений, то результат измерений представляют в виде: пектат-лиазная активность выше 100 ед. пектат-лС/г (100 ед. пектат-лС/см$^3$), допускается разведение дистиллированной водой при температуре 20 °С до значений, находящихся в пределах допустимых показаний прибора.

**5.6.1 Оформление результатов определений**

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\pm\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \quad (3)$$

где $\pm\Delta$ — значение границ абсолютной погрешности определений (расширенная неопределенность $U_p$ с коэффициентом охвата $\kappa$ =2), ед. пектат-лС/г (для сухого препарата) или ед. пектат-лС/см$^3$ (для жидкого препарата);

$\delta$ — границы относительной погрешности результата определений пектатлиазной активности в анализируемой пробе при Р = 0,95 составляют ± 7 %;

$\overline{X}$ – среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, признанных приемлемыми (см. 4.7.1), ед. пектат-лС/г (для сухого препарата) или ед. пектат-лС/см$^3$ (для жидкого препарата).

Результат определений при доверительной вероятности $P$ = 0,95 представляют в виде

$$\overline{X} \pm \Delta .$$

Результаты определений выражают с точностью до первого десятичного знака ед. пектат-лС/г (для сухого препарата) или ед. пектат-лС/см$^3$ (для жидкого препарата).

**5.7 Сходимость и воспроизводимость результатов**

5.7.1 Результаты определений, полученные в условиях повторяемости (сходимости), признают удовлетворительными, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{|X_1 - X_2|}{\overline{X}} \cdot 100 \le r, \quad (4)$$

где $X_1$ и $X_2$ — результаты двух параллельных определений, полученные в условиях повторяемости при $P$ = 0,95, ед. пектат-лС/г (для сухого препарата) или ед. пектат-лС/см$^3$ (для жидкого препарата);

$\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, ед. пектат-лС/г (для сухого препарата) или ед. пектат-лС/см$^3$ (для жидкого препарата);

$r$ — предел повторяемости (сходимости) при $P$ = 0,95, равный 5 %.

5.7.2 Результаты определений, полученные в условиях воспроизводимости по ГОСТ Р ИСО 5725-2, признают удовлетворительными, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{|X_1 - X_2|}{\overline{X}} \cdot 100 \le CD_{0,95} \quad (5)$$

где $X_1$ и $X_2$ — окончательные результаты определений, полученные в двух лабораториях в условиях воспроизводимости в точном соответствии с методом, ед. пектат-ЛС/г (для сухого препарата) или ед. пектат-лС/см$^3$ (для жидкого препарата);

$\bar{X}$ — среднеарифметическое значение двух окончательных результатов определений, полученных в условиях воспроизводимости, ед. пектат-лС/г (для сухого препарата) или ед. пектат-лС/см$^3$ (для жидкого препарата);

$CD_{0,95}$ — критическая разность, равная 10 % при доверительной вероятности $P$ = 0,95.

## 6 Метод определения пектин-лиазной активности (пектин-лС)

### 6.1 Сущность метода

6.1.1 Метод определения пектин-лиазной активности основан на расщеплении высокометоксилированного пектина анализируемого ферментным препаратом до ненасыщенных продуктов гидролиза, увеличивающих оптическую плотность на 0,1.

6.1.2 За единицу пектин-лиазной активности принято такое количество фермента, которое при действии на пектин за 1 мин при температуре 40 °С образует 1 мкмоль 4,5-ненасыщенных продуктов реакции.

Активность выражается ед. Пектин-лС/г (для сухого) или ед. Пектин-лС/см$^3$ (для жидкого) анализируемого ферментного препарата.

Диапазон измерений составляет от 30 до 100 ед. пектин-лиазной (пектин-лС) активности.

### 6.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы, материалы

6.2.1 Для определения пектин-лиазной активности применяют средства измерений, вспомогательное оборудование, лабораторную посуду, материалы, реактивы, указанные в 5.2.1, со следующим дополнением:

- пектин цитрусовый со степенью метоксилирования не менее 60 % и массовой долей основного вещества не менее 70 % по ГОСТ 29186;
- натрий уксуснокислый по ГОСТ 199;
- соль дигидратдинатриевая этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) по ГОСТ 10652;
- кислота уксусная по ГОСТ 61.

6.2.2.Все реактивы должны относиться к подгруппе чистоты 2 (х. ч.) или 3 (ч. д. а.) по ГОСТ 13867.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам, а также посуды, реактивов и материалов, по качеству не хуже вышеуказанных.

### 6.3 Подготовка к анализу

6.3.1 Отбор проб — по ГОСТ 20264.0.

**6.3.2 Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,05 моль/дм$^3$ с 5,0 ед. pH из растворов уксуснокислого натрия и уксусной кислоты (ледяной)**

6.3.2.1 Приготовление раствора уксуснокислого натрия ($CH_3COONa$) молярной концентрации 0,05 моль/дм$^3$ (раствор А)

В мерную колбу вместимостью 1 дм$^3$ помещают (4,10 ± 0,01) г безводного уксуснокислого натрия или (6,80 ± 0,01) г $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ и растворяют приблизительно в 300 см$^3$ дистиллированной воды. Затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора А в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С — не более 1 мес.

6.3.2.2 Приготовление раствора ледяной уксусной кислоты ($CH_3COOH$) молярной концентрации 0,05 моль/дм$^3$ (раствор Б)

В мерную колбу вместимостью 1 дм$^3$ вносят 2,86 см$^3$ ледяной уксусной кислоты, приливают около 300 см$^3$ дистиллированной воды, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора Б в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С — не более 1 мес.

6.3.2.3 Для приготовления ацетатного буферного раствора в колбе смешивают растворы уксуснокислого натрия (раствор А) и уксусной кислоты (раствор Б) в соотношении 2:1 для получения кислотности буферного раствора, равной 5,0 ед. pH. При необходимости кислотность раствора доводят до 5,0 ед. pH одним из исходных растворов.

Срок хранения буферного раствора в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С — не более 1 мес.

**6.3.3 Приготовление раствора ди-Na-ЭДТА молярной концентрации 0,1моль/дм$^3$**

В мерную колбу вместимостью 1 дм$^3$ вносят (37,0 ± 0,1) г ди-Na-ЭДТА, приливают 400–500 см$^3$ дистиллированной воды, доводят объем до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора ди-Na-ЭДТА в закрытой стеклянной посуде при температуре 20 °С — не более 1 мес.

**6.3.4 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации 1,0 моль/дм$^3$**

В мерную колбу вместимостью 1 дм$^3$ вносят 85,7 см$^3$ концентрированной соляной кислоты, приливают около 300 см$^3$ дистиллированной воды, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора соляной кислоты в закрытой стеклянной посуде при температуре 20 °С — не более 1 мес.

**6.3.5 Приготовление 0,8 %-ного раствора пектина**

Пектин, взятый с расчетом, чтобы 100 см$^3$ раствора содержало 0,8 г чистого пектина в соответствии с ГОСТ Р 55298 (приложение А), всыпают тонкой струей при непрерывном перемешивании в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, в которую предварительно наливают 25 см$^3$ раствора ацетатного буфера молярной концентрации 0,05 моль/дм$^3$.

Раствор непрерывно перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин до полного растворения пектина.

По истечении этого времени объем раствора доводят до 100 см$^3$ раствором ацетатного буфера молярной концентрации 0,05 моль/дм$^3$, тщательно перемешивают и фильтруют через четыре слоя марли.

Срок хранения раствора пектина в холодильнике при температуре 4 °С — не более двух суток.

**6.4 Подготовка пробы**

Анализируемые пробы ферментных препаратов в сухом или жидком виде используют без предварительной подготовки.

**6.4.1 Приготовление основного раствора анализируемой пробы ферментного препарата**

В стаканчик для взвешивания шпателем помещают (0,1000 ± 0,0002) г сухого ферментного препарата для получения анализируемой пробы. (1,00 ± 0,02) см$^3$ жидкого ферментного препарата вносят в другой стаканчик пипеткой. Полученную пробу ферментного препарата суспендируют в стеклянном бюксе с небольшим количеством дистиллированной воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и тщательно перемешивают. Приготовленный раствор ферментного препарата является основным раствором анализируемой пробы.

Срок хранения основного раствора ферментного препарата при температуре 20 °С — не более 1 ч.

**6.4.2 Приготовление рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата**

Рабочий раствор анализируемого ферментного препарата готовят из основного раствора по 6.4.2 путем дальнейшего разведения его дистиллированной водой в зависимости от предполагаемой активности таким образом, чтобы при ее определении показания оптической плотности спектрофотометра были в пределах от 0,10 до 0,35 нм.

С учетом разведения рассчитывают количество препарата взятого на анализ.

Каждую пробу анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии в требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-2.

Раствор готовят в день определения. Срок хранения рабочего раствора ферментного препарата — не более 1 ч с момента приготовления во избежание потерьего ферментативной активности.

**6.5 Проведение определений**

Перед началом определения активности готовят реакционную смесь путем смешивания в строгой последовательности трех растворов:

0,8 %-ный раствор пектина + раствор ацетатного буфера молярной концентрацией 0,05 моль/дм$^3$ + раствор ди-Na-ЭДТА молярной концентрацией 0,1 моль/дм$^3$ в соотношении 5:2:1 по объему.

В опытную пробирку наливают 9 см$^3$ реакционной смеси и прогревают на водяной бане в течение 5 мин при температуре 40 °С. В прогретую реакционную смесь добавляют 1 см$^3$ раствора ферментного препарата и инкубируют 10 мин на водяной бане строго по секундомеру при температуре 40 °С. Через 10 мин останавливают реакцию добавлением 0,1 см$^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрации 1,0 моль/дм$^3$.

В контрольную пробирку, содержащую 0,1 см$^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрации 1,0 моль/дм$^3$, приливают 1 см$^3$ раствора ферментного препарата и 9 см$^3$ реакционной смеси, содержимое тщательно перемешивают.

Оптическую плотность опытного раствора измеряют против контрольного раствора на спектрофотометре в термостатируемых кварцевых кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 1 см при длине волны 232 нм.

### 6.6 Обработка результатов

Пектин-лиазную активность (пектин-лС) в анализируемой пробе ферментного препарата вычисляют по формулам:

- для сухого препарата в ед. пектин-лС/г:

$$\text{Пектин-лС} = \frac{D_0 \cdot 10}{T \cdot C \cdot 0{,}1}, \qquad (6)$$

где $D_0$ — оптическая плотность опытного раствора;

10 — разведение реакционной смеси;

$T$ — время реакции, 0,25 ч;

С — концентрация препарата в реакционной смеси, %;

0,1 — условное увеличение оптической плотности в течение часа;

- для жидкого препарата в ед. пектин-лС/см$^3$:

$$\text{Пектин-лС} = \frac{D_0 \cdot 10}{T \cdot C \cdot 0{,}1} d, \qquad (7)$$

где $d$ — плотность для концентрированных жидких ферментных препаратов по ГОСТ 18481, г/см$^3$.

Оптическая плотность должна быть в пределах от 0,10 до 0,35 нм.

Если полученный результат определения выше верхнего предела диапазона измерений, то результат измерений представляют в виде: пектин-лиазная активность выше 100 ед. пектин-лС/г (100 ед. пектин-лС/см$^3$), допускается разведение дистиллированной водой при температуре 20 °С до значений, находящихся в пределах допустимых показаний прибора.

6.6.1 Оформление результатов определений — по 5.6.1.

6.7 Сходимость и воспроизводимость результатов — по 5.7 (только для пектин-лиазной активности).

## 7 Требования безопасности

### 7.1 Условия безопасности проведения работ

При выполнении определений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007 и ГОСТ 12.4.103.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть оснащено приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021.

Электробезопасность при работе с электроустановками — по ГОСТ 12.2.007.0 и ГОСТ Р 12.1.019.

Организация обучения работающих безопасности труда — по ГОСТ 12.0.004.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

### 7.2 Требования к квалификации операторов

К проведению определений допускают лица, имеющие квалификацию не ниже среднего технического образования, владеющие навыками работы в лаборатории, проведения определений и изучившие инструкции по эксплуатации используемой аппаратуры.

## Библиография

[1] Номенклатура ферментов, рекомендации Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций // Нью-Йорк, Академик Пресс, 1984

УДК 577.15:543.06:006.354 ОКС 65.120

Ключевые слова: препараты ферментные, активность пектин-лиазы, пектат-лиазы, субстрат, пектин различных источников получения и различной степени метоксилирования, трансэлиминазы, системные названия ферментов гидролиз, трис-HCL-буферный раствор

Подписано в печать 02.10.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1,40. Тираж 35 экз. Зак. 4196

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,
123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru