ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54905— 2012

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

Методы определения ферментативной активности β-глюканазы

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Научно-техническим центром «Лекарства и биотехнология» (НТЦ «Лекбиотех»)

2 ВНЕСЕН техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни, здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 17 мая 2012 г. № 72-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом 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, 2013

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Метод определения ферментативной активности β-глюканазы с ДНС-реактивом 2
5 Метод определения ферментативной активности β-глюканазы по Шомоди-Нельсону 6
6 Обработка результатов 8
7 Сходимость и воспроизводимость результатов 9
Библиография 10

ПОПРАВКИ, ВНЕСЕННЫЕ В НАЦИОНАЛЬНЫЕ СТАНДАРТЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

07 МАТЕМАТИКА. ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ

ОКС 07.100.30, 65.120

Поправка к ГОСТ Р 54905—2012 Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности β-глюканазы

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 4.2.1, второе перечисление	обеспечивающие точность взвешивания с пределом абсолютной допускаемой погрешности однократного взвешивания ± 0,01 мг;	с действительной ценой деления шкалы не более 0,1 мг;

(ИУС № 12 2019 г.)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

Методы определения ферментативной активности β-глюканазы

Enzyme preparations.
Methods of β-glucanase enzyme activity determination

Дата введения — 2013—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты и устанавливает:

- метод определения ферментативной активности β-глюканазы с использованием в качестве субстрата β-глюкана с ДНС-реактивом;
- метод определения ферментативной активности β-глюканазы по Шомоди-Нельсону.

Установленные в настоящем стандарте методы могут быть также использованы для определения активности β-глюканазы в ферментсодержащих смесях, в т. ч. кормовых смесях, и кормах.

Примечание — β-глюканазную активность исследуемых ферментных препаратов обеспечивают ферменты β-глюканазы эндо- и экзо-действия.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 53046—2008 Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 53973—2010 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения Бета-глюканазной активности

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

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

ГОСТ 2156—76 Натрий двууглекислый. Технические условия

ГОСТ 3765—78 Реактивы. Аммоний молибденовокислый. Технические условия

ГОСТ 4165—78 Реактивы. Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5845—79 Реактивы. Калий-натрий виннокислый 4-водный. Технические условия

ГОСТ 6038—79 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 13867—68 Продукты химические. Обозначение чистоты

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

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

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 ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 53046, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **β-глюкан:** Высокомолекулярное соединение, полимер глюкозы, в котором остатки глюкозы соединены 1,4-β-гликозидными связями; с водой образует коллоидные растворы.

3.2 **β-глюканаза:** Фермент, катализирующий гидролитическое расщепление цепей полимеров глюкозы — целлюлоз и гемицеллюлоз (β-глюканов) с образованием свободных остатков глюкозы и олигосахаридов.

Примечание — К β-глюканазам экзо-действия относят экзо-1,4-глюкан-4-глюкогидролазу, КФ 3.2.1.74 [1], катализирующую гидролитическое расщепление β-1,4 связи цепей целлюлоз и гемицеллюлоз (β-глюканов) со стороны концов, содержащих нередуцирующие остатки глюкозы, с отщеплением свободной глюкозы.

4 Метод определения ферментативной активности β-глюканазы с ДНС-реактивом

4.1 Сущность метода

4.1.1 Метод основан на количественном определении редуцирующих (восстанавливающих) сахаров, образующихся при действии β-глюканазы на β-1,4 связи β-глюкана при определении в стандартных условиях.

4.1.2 Сущность метода заключается в восстановлении 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС) до 3-амино-5-нитросалициловой кислоты, обладающей красно-оранжевой окраской, интенсивность которой определяют колориметрически при длине волны 540 нм.

4.1.3 За единицу β-глюканазной активности (1 ед. β-ГлА) принимают количество фермента, действующее на β-глюкан с высвобождением 1 мкмоля восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу), образующихся за одну минуту при стандартных условиях: температуре 50 °С; 4,7 ед. pH; продолжительности гидролиза 10 мин.

4.1.4 Содержание редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом с ДНС-реактивом и рассчитывают по градуировочному графику, построенному для глюкозы [2]—[3].

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

4.2.1 При определении ферментативной активности β-глюканазы применяют следующие средства измерений и вспомогательное оборудование:

- фотоэлектроколориметр или спектрофотометр любого типа, который обеспечивает измерения при длине световой волны 540 нм с погрешностью измерения коэффициента пропускания не более ± 1 % (не более 0,01 единицы оптической плотности);
- весы по ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность взвешивания с пределом абсолютной допускаемой погрешности однократного взвешивания ± 0,01 мг;

- pH-метр любого типа для измерения в диапазоне от 0 до 14 ед. pH с пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 0,1 ед. pH;
- измельчитель-гомогенизатор лабораторный или механическую мельницу, обеспечивающую размалывание анализируемой пробы ферментного препарата до полного ее прохода через сито;
- магнитную мешалку любой марки, которая обеспечивает скорость вращения до 800 мин$^{-1}$;
- ультратермостат с точностью регулирования температуры ± 1 °С;
- центрифугу лабораторную любого типа, которая обеспечивает скорость вращения не менее 7000 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;
- сито с размером диаметра ячеек 150 мкм.

4.2.2 При определении ферментативной активности β-глюканазы используют следующие лабораторную посуду и материалы:
- колбы мерные стеклянные 1(2)-100-2, 1(2)-500-2, 1(2)-1000-2, 1(2)-2000-2 по ГОСТ 1770;
- цилиндры 1-50-1, 1-100 -1, 1-500-1 по ГОСТ 1770;
- посуду лабораторную по ГОСТ 25336:
  воронки ВФ 1(2)-75-ПОР 500 ТХС,
  пробирки П 1-14-120 ХС или П 1-16-150 ХС,
  колбы П-1-100-29/32 ТС или Кн-1-100-14/23 ТС,
  стаканчики для взвешивания (бюксы) СВ 19/9 и 24/10,
  стаканы В-1-1000 ТС;
- пипетки стеклянные градуированные по ГОСТ 29227;
- пипетки автоматические вместимостью от 1,0 до 5,0 см^3 с наконечниками;
- ступку и пестик по ГОСТ 9147.

4.2.3 При определении ферментативной активности β-глюканазы применяют следующие реактивы:
- β-глюкан из ячменя с содержанием основного вещества не менее 95 %;
- натрий уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 199;
- кислоту уксусную ледяную по ГОСТ 61;
- калий-натрий виннокислый 4-водный по ГОСТ 5845;
- D-глюкозу по ГОСТ 6038;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- спирт этиловый пищевой по ГОСТ Р 51652;
- кислоту 3,5-динитросалициловую (ДНС);
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

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

4.2.5 Допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов с показателями качества не ниже вышеуказанных.

4.3 Подготовка к анализу

4.3.1 Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 4,7 ед. pH из растворов уксусной кислоты и уксуснокислого натрия

4.3.1.1 Приготовление раствора уксусной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1 дм^3 вносят 5,7 см^3 ледяной уксусной кислоты и разводят приблизительно в 300 см^3 дистиллированной воды. Доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

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

4.3.1.2 Приготовление раствора уксуснокислого натрия

В мерную колбу вместимостью 1 дм^3 вносят 13,6 г уксуснокислого натрия и растворяют приблизительно в 300 см^3 дистиллированной воды. Затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 мес.

4.3.1.3 Для приготовления ацетатного буферного раствора смешивают равные объемы растворов уксусной кислоты (4.3.1.1) и уксуснокислого натрия (4.3.1.2). При необходимости доводят значение pH раствора до 4,7 ед. pH одним из исходных растворов.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 мес.

4.3.2 Приготовление раствора натрия гидроокиси массовой долей 9,7 %

Растворяют 16,05 г натрия гидроокиси в 150 $см^3$ дистиллированной воды. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 6 мес.

4.3.3 Приготовление реактива 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС) массовой долей 1,0 %

В стакан вместимостью 1 $дм^3$ вносят 10,0 г ДНС, добавляют 400 $см^3$ дистиллированной воды и перемешивают на магнитной мешалке в течение 25—30 мин при комнатной температуре. Затем при постоянном перемешивании постепенно добавляют 150 $см^3$ раствора натрия гидроокиси (4.3.2). При этом окраска раствора меняется от светло-желтой до ярко-желтой.

Стакан с полученным раствором помещают на водяную баню с температурой (47 ± 1) °С, постепенно небольшими порциями добавляют 300 г калия-натрия виннокислого 4-водного и перемешивают до полного растворения реактива.

Раствор охлаждают до комнатной температуры, переносят в мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Приготовленный реактив должен иметь ярко-желтое окрашивание (без красного оттенка).

При необходимости (в случае образования осадка) раствор фильтруют через воронку со стеклянным фильтром.

Срок хранения реактива в темной бутыли при комнатной температуре — не более 6 мес.

4.3.4 Приготовление субстрата — раствора β-глюкана массовой долей 0,5 %

В коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 0,25 г β-глюкана, добавляют 3 $см^3$ этилового спирта. К суспензии добавляют приблизительно 30 $см^3$ буферного раствора (4.3.1). Смесь нагревают в водяной бане при температуре от 60 °С до 70 °С при энергичном перемешивании до полного растворения β-глюкана. При этом образуется мутный раствор. Колбу с раствором охлаждают до комнатной температуры, доводят буферным раствором (4.3.1) до 50 г (по массе) и тщательно перемешивают. При необходимости раствор осветляют центрифугированием при 7000 $мин^{-1}$ в течение 10—15 мин или фильтрованием через воронку со стеклянным фильтром.

Субстрат готовят перед проведением анализа.

4.3.5 Приготовление градуировочных растворов глюкозы

4.3.5.1 Приготовление основного градуировочного раствора глюкозы молярной (массовой) концентрации 5 мкмоль/$см^3$ (900 мкг/ $см^3$)

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 90 мг безводной глюкозы, взвешенной с точностью до 0,2 мг, растворяют в небольшом количестве буферного раствора (4.3.1), доводят до метки буферным раствором и тщательно перемешивают.

4.3.5.2 Приготовление рабочих градуировочных растворов глюкозы

Из основного градуировочного раствора глюкозы (4.3.5.1) готовят серию разведений в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Приготовление рабочих градуировочных растворов глюкозы различной концентрации

Объем градуировочного раствора глюкозы молярной (массовой) концентрации 5 мкмоль/$см^3$ (900 мкг/$см^3$), $см^3$	Объем буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$, $см^3$	Концентрация глюкозы в рабочем растворе	
		массовая, мкг/$см^3$	молярная, мкмоль/$см^3$
1	9	90	0,5
2	8	180	1,0
3	7	270	1,5
4	6	360	2,0
5	5	450	2,5
6	4	540	3,0
7	3	630	3,5
8	2	720	4,0
9	1	810	4,5
10	0	900	5,0

Рабочие градуировочные растворы глюкозы готовят перед построением градуировочного графика, при этом берут по три параллельных разведения для приготовления каждой концентрации раствора глюкозы.

4.4 Построение градуировочного графика

В 10 пробирок вместимостью 10 $см^3$ вносят по 1 $см^3$ рабочих градуировочных растворов глюкозы молярной концентрации от 0,5 до 5,0 мкмоль/$см^3$ в соответствии с таблицей 1, добавляют по 1 $см^3$ дистиллированной воды, 3 $см^3$ реактива ДНС (4.3.3) и быстро перемешивают.

Одновременно готовят контрольную пробу на реактивы, для чего в пробирку вносят 1 $см^3$ буферного раствора (4.3.1), добавляют 1 $см^3$ дистиллированной воды и 3 $см^3$ реактива ДНС (4.3.3).

Все пробирки помещают на кипящую водяную баню и кипятят в течение 5 мин с точностью, измеряемой по секундомеру. Пробирки охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптические плотности растворов на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм против контрольной пробы на реактивы.

По полученным значениям строят градуировочный график оптической плотности (поглощения) как функции от молярной концентрации глюкозы (мкмоль/$см^3$): на оси абсцисс откладывают молярные концентрации глюкозы в мкмоль/$см^3$, на оси ординат — соответствующие этим растворам оптические плотности при 540 нм.

Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,10 до 0,90 единиц оптической плотности (ед. ОП).

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднеарифметическое значение результатов оптической плотности трех параллельных измерений.

Градуировочный график строят для каждой новой партии реактива ДНС, а также при замене оборудования.

4.5 Отбор и подготовка проб

4.5.1 Отбор проб — по ГОСТ 20264.0.

4.5.2 Порошкообразные или микрокапсулированные анализируемые пробы используют без предварительной подготовки. Гранулированные анализируемые пробы измельчают (например, в механической мельнице или фарфоровой ступке) и просеивают через сито с размером диаметра отверстий не более 1 мм.

4.5.3 Для приготовления основного раствора анализируемой пробы в плоскодонную стеклянную колбу помещают от 0,1 до 10 г* анализируемой пробы, взвешенной с точностью до 0,2 мг, и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды (около 50 $см^3$) на магнитной мешалке в течение 15 мин (для порошка, микрогранулятов, микрокапсул) или 60 мин (для кормов, кормовых смесей). Суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью от 100 до 500 $см^3$ (в зависимости от предполагаемой активности) и доводят объем дистиллированной водой до метки. Полученную суспензию центрифугируют при частоте вращения 7000 $мин^{-1}$ в течение 15 мин. Для анализа используют надосадочную жидкость.

4.5.4 Рабочий раствор анализируемой пробы готовят из основного раствора (4.5.3) путем разведения его дистиллированной водой таким образом, чтобы при определении активности оптические плотности опытных и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика. Рабочий раствор должен содержать от 0,05 до 0,5 ед. β-ГлА в 1 $см^3$.

Раствор готовят в день определения.

4.6 Проведение анализа

4.6.1 В три пробирки (две опытные и одну контрольную) вносят по 1 $см^3$ субстрата β-глюкана (4.3.4). Пробирки закрывают пробками, помещают в ультратермостат или на водяную баню с температурой (50 ± 1) °С и выдерживают в течение 5 мин.

4.6.2 В две опытные пробирки добавляют по 1 $см^3$ рабочего раствора анализируемой пробы (4.5.3), также предварительно прогретой при температуре 50 °С, и тщательно перемешивают. Три пробирки (две опытные и одну контрольную) помещают в ультратермостат или на водяную баню с температурой (50 ± 1) °С на 10 мин (с точностью, определяемой по секундомеру).

---

* В зависимости от предполагаемой активности.

4.6.3 В контрольную пробирку вносят 1 $см^3$ рабочего раствора анализируемой пробы (4.5.3).

4.6.4 В три пробирки (две опытные и одну контрольную) добавляют по 3 $см^3$ реактива ДНС (4.3.3) и тщательно перемешивают. Пробирки помещают на кипящую водяную баню на 5 мин (с точностью, определяемой по секундомеру).

4.6.5 Пробирки охлаждают до комнатной температуры и колориметрируют содержимое на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм против контрольной пробы на реактивы (4.4).

Если значения оптических плотностей в опытных пробирках находятся за пределами рабочей зоны градуировочного графика, определение активности следует повторить с раствором, имеющим большее или меньшее содержание фермента.

5 Метод определения ферментативной активности β-глюканазы по Шомоди-Нельсону

5.1 Сущность метода

5.1.1 Метод основан на количественном определении редуцирующих (восстанавливающих) сахаров, образующихся при действии β-глюканазы на β-1,4 связи β-глюкана при определении в стандартных условиях.

5.1.2 Сущность метода Шомоди-Нельсона заключается во взаимодействии карбонильных групп редуцирующих сахаров с двухвалентными ионами меди и арсено-молибденовым реактивом с образованием голубого цвета, интенсивность которого определяют колориметрически при длине волны 660 нм.

5.1.3 За единицу β-глюканазной активности (1 ед. β-ГлА) принимают количество фермента, действующее на β-глюкан с высвобождением 1 мкмоля восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу), образующихся за одну мин при стандартных условиях: температуре 50 °С; 4,7 ед. pH; продолжительности гидролиза 10 мин.

5.1.4 Содержание редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом по Шомоди-Нельсону и рассчитывают по градуировочному графику, построенному для глюкозы.

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

5.2.1 Для определения ферментативной активности β-глюканазы применяют средства измерений, вспомогательное оборудование, посуду и материалы, которые указаны в 4.2.1 и 4.2.2, при этом фотоэлектроколориметр или спектрофотометр должен обеспечивать измерения при длине световой волны 660 нм. А также применяют:

- встряхиватель V-3 типа вортекс или аналогичный.

5.2.2 При определении ферментативной активности β-глюканазы применяют реактивы по 4.2.3, за исключением натрия гидроокиси, этилового спирта и ДНС, вместо которых применяют:

- натрий углекислый безводный с содержанием основного вещества не менее 99,8 %, х. ч.;
- натрий двууглекислый (бикарбонат) по ГОСТ 2156;
- натрий сернокислый по ГОСТ 4166;
- медь (II) сернокислую 5-водную по ГОСТ 4165;
- кислоту серную концентрированную по ГОСТ 4204;
- аммоний молибденовокислый по ГОСТ 3765;
- натрий арсенат 7-водный массовой долей основного вещества 98 %.

5.3 Подготовка к анализу

5.3.1 Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ 4,7 ед. pH из растворов уксусной кислоты и уксуснокислого натрия проводят по 4.3.1.

5.3.2 Приготовление субстрата — раствора β-глюкана массовой долей 0,5 % — по 4.3.4.

5.3.3 Приготовление реактива Шомоди

5.3.3.1 Приготовление реактива А

В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ вносят (12,5 ± 0,01) г натрия углекислого безводного, (12,5 ± 0,01) г калий-натрия виннокислого 4-водного, (10 ± 0,01) г натрия двууглекислого и (100 ± 0,01) г натрия сернокислого, растворяют приблизительно в 300 $см^3$ дистиллированной воды. Натрий сернокис-

лый вносят небольшими порциями. После полного растворения раствор доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения реактива А при комнатной температуре — 3 мес.

5.3.3.2 Приготовление реактива Б

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 вносят (7,5 ± 0,01) г меди (II) сернокислой 5-водной и растворяют в 42,5 см^3 дистиллированной воды. Добавляют одну каплю концентрированной серной кислоты и перемешивают.

Срок хранения реактива Б при комнатной температуре — 3 мес.

5.3.3.3 Для приготовления реактива Шомоди смешивают 25 см^3 реактива А и 1 см^3 реактива Б.

Реактив Шомоди готовят в день применения.

5.3.4 Приготовление реактива Нельсона — по ГОСТ Р 53973.

5.3.5 Приготовление градуировочных растворов глюкозы

5.3.5.1 Приготовление основного градуировочного раствора глюкозы молярной (массовой) концентрации 5 мкмоль/см^3 (900 мкг/ см^3) проводят по 4.3.5.1.

5.3.5.2 Приготовление рабочих градуировочных растворов глюкозы

Из основного градуировочного раствора глюкозы (4.3.5.1) готовят серию разведений в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Приготовление рабочих градуировочных растворов глюкозы различной концентрации

Объем градуировочного раствора глюкозы молярной (массовой) концентрации 5 мкмоль/ см^3 (900 мкг/см^3), см^3	Объем буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/дм^3, см^3	Концентрация глюкозы в рабочем растворе	
		массовая, мкг/см^3	молярная, мкмоль/см^3
0,1	4,9	18	0,1
0,2	4,8	36	0,2
0,3	4,7	54	0,3
0,4	4,6	72	0,4
0,5	4,9	90	0,5

Рабочие градуировочные растворы готовят перед построением градуировочного графика, при этом берут по три параллельных разведения для приготовления каждой концентрации раствора глюкозы.

5.4 Построение градуировочного графика

5.4.1 В пять пробирок вместимостью 10 см^3 вносят по 1 см^3 рабочих градуировочных растворов глюкозы молярной концентрации от 0,05 до 0,5 мкмоль/см^3 в соответствии с таблицей 2, добавляют по 1 см^3 буферного раствора по 4.3.1 и 1 см^3 реактива Шомоди (5.3.3). Пробирки выдерживают 20 мин на кипящей водяной бане, затем охлаждают в холодной воде до комнатной температуры. Добавляют 1 см^3 реактива Нельсона (5.3.4), перемешивают на вортексе 5 мин. Добавляют в пробирки по 5 см^3 дистиллированной воды и снова перемешивают.

5.4.2 Одновременно готовят контрольную пробу на реактивы, для чего в пробирку вместимостью 10 см^3 вносят 2 см^3 буферного раствора (4.3.1), добавляют 1 см^3 реактива Шомоди (5.3.3), 1 см^3 реактива Нельсона (5.3.4), перемешивают, добавляют 5 см^3 дистиллированной воды и снова перемешивают.

5.4.3 Оптическую плотность измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 660 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм против контрольной пробы на реактивы.

5.4.4 Строят градуировочный график оптической плотности (поглощения) как функции от молярной концентрации глюкозы (мкмоль/см^3): на оси абсцисс откладывают концентрации глюкозы в мкмоль/см^3, на оси ординат — соответствующие им оптические плотности при 660 нм.

Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,10 до 0,90 ед. ОП.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднеарифметическое значение результатов оптической плотности трех параллельных измерений.

Градуировочный график строят для каждой новой партии реактивов Шомоди и Нельсона, а также при замене оборудования.

5.5 Подготовка проб

Отбор проб — по 4.5.1. Приготовление основного раствора анализируемой пробы проводят по 4.5.2.

5.5.1 Приготовление рабочего раствора анализируемой пробы

Рабочий раствор анализируемой пробы готовят из основного раствора (4.5.2) путем разведения его дистиллированной водой таким образом, чтобы при определении активности оптические плотности опытных и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика. Рабочий раствор должен содержать от 0,01 до 0,05 ед. β-ГлА в 1 $см^3$.

Раствор готовят в день определения.

5.6 Проведение анализа

5.6.1 В три пробирки (две опытные и одну контрольную) вносят по 1 $см^3$ субстрата β-глюкана (4.3.4). Пробирки закрывают пробками, помещают в ультратермостат или на водяную баню с температурой (50 ± 1) °С и выдерживают в течение 5 мин.

5.6.2 В две опытные пробирки добавляют по 1 $см^3$ рабочего раствора анализируемой пробы (5.5.2), предварительно прогретой при температуре 50 °С, и тщательно перемешивают. Три пробирки (две опытные и одну контрольную) помещают в ультратермостат или на водяную баню с температурой (50 ± 1) °С на 10 мин (с точностью, определяемой по секундомеру).

5.6.3 В контрольную пробирку вносят 1 $см^3$ рабочего раствора анализируемой пробы (5.5.2).

5.6.4 Во все пробирки добавляют 1 $см^3$ реактива Шомоди (5.3.3). Пробирки выдерживают 20 мин в кипящей водяной бане, затем охлаждают до комнатной температуры. Добавляют 1 $см^3$ реактива Нельсона (5.3.4), перемешивают на вортексе в течение 5 мин. В пробирки добавляют по 5 $см^3$ дистиллированной воды и центрифугируют при 3000 $мин^{-1}$ в течение 5 мин или фильтруют через воронку со стеклянным фильтром.

5.6.5 Осветленные растворы (центрифугаты или фильтраты) колориметрируют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 660 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм против контрольной пробы на реактивы (5.4.2).

Если значения оптических плотностей в опытных пробирках находятся за пределами рабочей зоны градуировочного графика, определение активности следует повторить с раствором, имеющим большее или меньшее содержание фермента.

6 Обработка результатов

6.1 Молярную концентрацию глюкозы (мкмоль/$см^3$) в опытных и контрольном растворах определяют по градуировочному графику.

6.2 Ферментативную активность β-глюканазы в анализируемой пробе β-ГлА, ед./г, рассчитывают по формуле

$$\beta\text{-ГлА} = \frac{(C_о - C_к)}{tc}, \quad (1)$$

где $C_о$ — молярная концентрация глюкозы в опытной пробе, найденная по градуировочному графику, мкмоль/$см^3$;

$C_к$ — молярная концентрация глюкозы в контрольной пробе, найденная по градуировочному графику, мкмоль/$см^3$;

t — продолжительность гидролиза, мин;

c — массовая концентрация ферментного препарата в 1 $см^3$ рабочего раствора анализируемой пробы, г/$см^3$, которую рассчитывают по формуле

$$c = \frac{m}{VP}, \quad (2)$$

где m — масса пробы ферментного препарата, г;

V — объем разведения пробы при приготовлении основного раствора по 4.3.5.1, $см^3$;

P — разведение основного раствора ферментного препарата для приготовления рабочего раствора по 4.5.4 или 5.5.2.

6.3 Для унификации результатов колориметрических методов, полученных в разделах 4 и 5, рассчитанную по методу Шомоди-Нельсона ферментативную активность β-глюканазы умножают на коэффициент 5,6.

6.4 За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до первого десятичного знака ($\overline{X} \pm \Delta$), ед./г, при доверительной вероятности P = 0,95, где $\Delta = 0{,}01\,\delta\overline{X}$. Границы погрешности δ = ± 7 %.

7 Сходимость и воспроизводимость результатов

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

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 r \overline{X}, \qquad (3)$$

где X_1 и X_2 — результаты двух параллельных определений, полученные в условиях повторяемости при P = 0,95, ед./г;

$\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений анализируемой пробы, ед./г;

r — предел повторяемости (сходимости), равный 5 %.

Результаты измерений, полученные в условиях воспроизводимости по ГОСТ Р ИСО 5725-1, признают удовлетворительными, если выполняется условие приемлемости

$$|X_1 - X_2| \le R\ 0{,}01\overline{X},$$

где X_1 и X_2 — результаты двух определений, выполненных в двух разных лабораториях, ед./г;

$\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов двух определений, выполненных в двух разных лабораториях, ед./г;

R = 10 % — предел воспроизводимости.

Библиография

[1] Enzyme Nomenclature, recommendations of thenomenclature Committee of the IUB, N.Y., Academic Press, 1984

[2] Miller G.L. (1959), Anal. Chem. 31, 426—428

[3] Bathgate G.N. (1979), J. Inst. Brew, 85, 92—94

УДК 619:615.355:636.087.8 ОКС 07.100.30, 65.120 С09

Ключевые слова: препараты ферментные, ферментативная активность β-глюканазы, методы определения с использованием субстрата β-глюкана, реактив ДНС, реактив Шомоди-Нельсона, обработка результатов, сходимость и воспроизводимость результатов

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *А.В. Бестужевой*

Сдано в набор 28.11.2012. Подписано в печать 25.02.2013. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,45. Тираж 130 экз. Зак. 201.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru