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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31488— 2012

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

Методы определения ферментативной активности ксиланазы

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 41 от 23—24 мая 2012 г.)

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
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 октября 2012 г. № 476-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31488—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 53047—2008

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта публикуется в указателе «Национальные стандарты».

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе «Национальные стандарты», а текст изменений — в информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Национальные стандарты»

© Стандартинформ, 2012

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 Термины и определения . . . 2
4 Метод определения ферментативной активности ксиланазы с субстратом ксиланом . . . 2
4.1 Характеристика метода . . . 2
4.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы . . . 2
4.3 Подготовка к анализу . . . 3
4.4 Подготовка пробы . . . 5
4.5 Проведение анализа . . . 5
4.6 Обработка результатов . . . 6
4.7 Сходимость и воспроизводимость результатов . . . 6
5 Определение ферментативной активности ксиланазы с окрашенным субстратом . . . 6
5.1 Характеристика метода . . . 6
5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы . . . 6
5.3 Подготовка к анализу . . . 7
5.4 Подготовка пробы . . . 8
5.5 Проведение анализа . . . 8
5.6 Обработка результатов . . . 8
5.7 Сходимость и воспроизводимость результатов . . . 9
Библиография . . . 10

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

Методы определения ферментативной активности ксиланазы

Enzyme preparations.
Methods of xylanase enzyme activity determination

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы определения ферментативной активности ксиланазы (экзо- и эндоксиланазной активностей) ферментных препаратов и ферментсодержащих смесей с использованием окрашенного субстрата и ксилана.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 5962—67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 13867—68 Продукты химические. Обозначения чистоты

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

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 29227—91 (ИСО 8351-1:81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по указателю «Национальные стандарты», составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим 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.

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

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

3.2 **ферментативный гидролиз:** Гидролиз высокомолекулярных соединений под воздействием катализаторов белковой природы — гидролитических ферментов (гидролаз, класс 3 [1]).

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

3.4 **ксилан:** Высокомолекулярное соединение, полимер ксилозы с β-1,4 гликозидными связями, с водой образует коллоидные растворы.

3.5 **азо-ксилан:** Высокомолекулярное соединение ксилана, к которому привязан хромофор – азо-группа, имеющее желто-оранжевое окрашивание.

3.6 **экзоксиланаза (системное название: экзо-1,4-ксилозидаза или β-ксилозидаза, К.Ф.3.2.1.37 [1]):** Фермент, катализирующий гидролиз β-1,4 связи цепей ксиланов, ксилоолигосахаридов, ксилобиозы со стороны концов, содержащих нередуцирующие остатки ксилозы, с отщеплением свободной ксилозы.

3.7 **эндоксиланаза (эндо-1,4-β-D-ксилан ксиланогидролаза, К.Ф.3.2.1.8[1]):** Фермент, катализирующий гидролиз β-1,4 ксилозидных связей в цепи ксиланов с неупорядоченным расщеплением молекулы на крупные фрагменты (олигосахариды).

4 Метод определения ферментативной активности ксиланазы с субстратом ксиланом

4.1 Характеристика метода

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

Метод используется при возникновении разногласий в качестве арбитражного.

4.1.2 За единицу ферментативной активности ксиланазы (1 ед. КсА) принимают количество фермента, действующего на ксилан с высвобождением 1 мкмоля восстанавливающих сахаров (в пересчете на ксилозу) за 1 мин при стандартных условиях (температура — 50 °С, значение pH — 4,7, продолжительность гидролиза — 10 мин).

4.1.3 Содержание редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом с ДНС-реактивом при длине волны 540 нм и рассчитывают по градуировочному графику, построенному для ксилозы. Диапазон измерений контролируемого показателя от 180 до 5000 ед. КсА.

4.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы

4.2.1 Для определения ферментативной активности ксиланазы используют следующие средства измерений и оборудование:

- фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр (СФ) любого типа, которые обеспечивают измерения при длине волны 540 нм, с погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 % (не более 0,01 единицы оптической плотности);
- pH-метр любого типа для измерения в диапазоне от 0 до 14 pH, с пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 0,1 единиц pH;
- магнитную мешалку любой марки, которая обеспечивает скорость вращения до 800 мин$^{-1}$;
- ультратермостат или водяной термостат с точностью регулирования температуры ± 1 °С;
- весы лабораторные по ГОСТ 24104, высокого класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г, ценой поверочного деления 0,1 мг и пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 0,15 мг; а также с наибольшим пределом взвешивания 1 кг, ценой поверочного деления 20 мг и пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 30 мг;
- лабораторную центрифугу любого типа, которая обеспечивает скорость вращения не менее 7000 мин$^{-1}$;
- водяную баню любого типа, которая обеспечивает поддержание температуры (100 ± 1) °С;
- таймер любого типа с погрешностью ± 30 с;
- секундомер с емкостью шкалы счетчика 1 мин, ценой деления 1 с и погрешностью ± 1,5 с;

- механическую мельницу, обеспечивающую размалывание исследуемого образца ферментного препарата до полного прохода пробы через сито;
- сито с диаметром отверстий 1,0 мм, сделанное из металлического проволочного тканого материала.

4.2.2 Для определения ферментативной активности ксиланазы используют следующие лабораторную посуду и материалы:

- колбы мерные 1(2)-50, 100, 200, 500, 1000-2 по ГОСТ 1770;
- воронки ВФ — 1(2)-60-ПОР 500 ТХС по ГОСТ 25336;
- пробирки П1-14-120 ХС или П1-16-150 ХС по ГОСТ 25336;
- пипетки по ГОСТ 29227;
- пипетки автоматические вместимостью от 0,1 до 1,0 $см^3$ с наконечниками;
- колбы и стаканы (бюксы) СВ 19/9 и 24/10 по ГОСТ 25336;
- стаканы В-1-25, 50, 100, 150, 250, 600, 800, 1000 ТС по ГОСТ 25336;
- цилиндры 1(2,3,4)-50 (100) по ГОСТ 1770;
- эксикатор любого исполнения по ГОСТ 25336;
- ступку и пестик фарфоровые по ГОСТ 9147.

4.2.3 Для определения ферментативной активности ксиланазы используют следующие реактивы:

- кислоту уксусную ледяную по ГОСТ 61;
- натрий уксуснокислый трехводный по ГОСТ 199;
- калий-натрий виннокислый четырехводный по ГОСТ 5845;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- кислоту 3,5-динитросалициловую (ДНС) кристаллическую с содержанием основного вещества 98 %;
- D-ксилозу с содержанием основного вещества от 98 % до 99 %;
- ксилан из овса или березовый с содержанием остатков ксилозы.

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 указанных.

4.3 Подготовка к анализу

4.3.1 Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ с pH 4,7

Для определения ферментативной активности ксиланазы приготавливают ацетатный буферный раствор молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ с pH 4,7. Ацетатный буферный раствор готовят из растворов уксусной кислоты и уксуснокислого натрия молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ путем их смешивания.

4.3.1.1 Для приготовления раствора уксусной кислоты в мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ вносят 5,7 $см^3$ ледяной уксусной кислоты и разводят в дистиллированной воде объемом от 200 до 300 $см^3$. Затем доводят объем раствора дистиллированной водой до метки и снова перемешивают.

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

4.3.1.2 Для приготовления раствора уксуснокислого натрия в мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ помещают 13,6 г уксуснокислого натрия и растворяют в дистиллированной воде объемом от 200 до 300 $см^3$. Затем доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и перемешивают.

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

4.3.1.3 Для приготовления ацетатного буферного раствора смешивают равные объемы растворов уксусной кислоты и уксуснокислого натрия, полученных в соответствии с 4.3.1.1 и 4.3.1.2, измеряют pH и при необходимости доводят значение pH до 4,7 одним из исходных растворов.

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

4.3.2 Приготовление раствора натрия гидроокиси массовой доли 10,7 %

Для приготовления раствора натрия гидроокиси массовой доли 10,7 % растворяют 16,05 г гидроокиси натрия в 150 $см^3$ дистиллированной воды. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры.

4.3.3 Приготовление реактива динитросалициловой кислоты (ДНС) массовой доли 1,0 %

Для приготовления реактива динитросалициловой кислоты (ДНС) массовой доли 1,0 % в стакан вместимостью 1 $дм^3$ вносят 10,0 г ДНС, добавляют 400,0 $см^3$ дистиллированной воды и перемешивают на магнитной мешалке в течение от 25 до 30 мин при комнатной температуре. Затем постепенно, при

постоянном перемешивании, добавляют 150,0 см^3 раствора гидроокиси натрия по 4.3.2. При этом окраска раствора меняется от светло-желтой до ярко-желтой.

Стакан с полученным раствором помещают в водяную баню с температурой (47 ± 1) °С и постепенно, небольшими порциями добавляют 300 г виннокислого калия-натрия. Перемешивание продолжают при той же температуре до полного растворения реактива.

Раствор охлаждают холодной водой 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 раствора в темной бутыли при комнатной температуре — не более 6 мес.

4.3.4 Приготовление раствора субстрата ксилана массовой доли 1 %

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 вносят 0,5 г ксилана, добавляют от 20 до 30 см^3 ацетатного буферного раствора по 4.3.1, перемешивают и растворяют при нагревании на водяной бане с температурой от 60 °С до 70 °С. Затем колбу с раствором охлаждают, доливают буферным раствором до 50 г (по массе) и тщательно перемешивают.

При наличии осадка или опалесценции раствор осветляют центрифугированием при 7000 мин$^{-1}$ в течение от 10 до 15 мин или фильтрованием через фильтр со стекловолокном.

Субстрат готовят в день проведения анализа.

4.3.5 Приготовление рабочих стандартных растворов ксилозы

4.3.5.1 Приготовление основного стандартного раствора ксилозы молярной (массовой) концентрации 10 мкмоль/ см^3 (1500 мкг/ см^3)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 150 мг высушенной при температуре 105 °С в течение 1 ч и охлажденной в эксикаторе ксилозы, взвешенной с точностью до 0,0001 г, растворяют в небольшом количестве ацетатного буферного раствора по 4.3.1, тщательно перемешивают и доводят объем до метки.

4.3.5.2 Приготовление рабочих стандартных растворов ксилозы

Из основного стандартного раствора ксилозы по 4.3.5.1 готовят серию разведений в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Объем стандартного раствора с молярной (массовой) концентрацией ксилозы 10 мкмоль/см^3 (1500 мкг/см^3), см^3	Объем буферного раствора, см^3	Концентрация ксилозы в разведении	
		массовая, мкг/см^3	молярная, мкмоль/см^3
0,5	9,5	75	0,5
1,0	9,0	150	1,0
1,5	8,5	225	1,5
2,0	8,0	300	2,0
2,5	7,5	375	2,5
3,0	7,0	450	3,0
3,5	7,5	525	3,5
4,0	6,0	600	4,0
5,0	5,0	750	5,0
6,0	4,0	900	6,0

Рабочие стандартные растворы ксилозы готовят в день построения градуировочного графика, при этом берут по три параллельных разведения для приготовления каждой концентрации раствора ксилозы.

4.3.6 Построение градуировочного графика

В 10 пробирок вместимостью 10 см^3 вносят по 1,0 см^3 рабочих стандартных растворов ксилозы с молярной концентрацией от 0,5 до 6,0 мкмоль/см^3 в соответствии с таблицей 1, добавляют по 1,0 см^3 дистиллированной воды, 3,0 см^3 раствора ДНС по 4.3.3 и быстро перемешивают.

Одновременно готовят контрольную пробу на реактивы. Для этого в пробирку вносят 1 см^3 ацетатного буферного раствора по 4.3.1, добавляют 1 см^3 дистиллированной воды и 3 см^3 реактива ДНС по 4.3.3.

Все пробирки помещают в 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 ксилозы (мкмоль/см^3). Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,15 до 0,65 единиц оптической плотности (ед. ОП).

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

Градуировочный график строят для каждой новой партии реактивов, а также при замене прибора.

4.4 Отбор и подготовка проб

4.4.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 20264.0.

Анализируемые образцы в форме порошка или микрокапсулированные можно использовать без предварительной подготовки. Анализируемые образцы в форме гранул следует измельчать (например, в механической мельнице или фарфоровой ступке) и просеивать через сито с диаметром отверстий не более 1 мм.

4.4.2 Для приготовления основного раствора анализируемого образца в плоскодонную стеклянную колбу помещают навеску анализируемого образца массой от 0,1 до 10 г* с точностью до 0,2 мг и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды (до 50 см^3) на магнитной мешалке в течение 15 мин (порошок, микрогранулы, микрокапсулы) или 60 мин (корма, смеси кормовые). Суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 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.

4.4.3 Рабочий раствор анализируемого образца готовят из основного раствора по 4.4.2 путем разведения его в дистиллированной воде таким образом, чтобы при определении активности оптические плотности опытных и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика.

Рабочий раствор должен содержать от 0,5 до 5,0 единиц активности в 1 см^3.

Раствор готовят в день определения.

4.5 Проведение анализа

4.5.1 В три пробирки (две опытные и одну контрольную) вносят по 1 см^3 субстрата ксилана по 4.3.4. Пробирки закрывают пробками, помещают в ультратермостат с температурой (50 ± 1) °С и выдерживают в течение 5 мин.

4.5.2 В две опытные пробирки добавляют по 1 см^3 рабочего раствора анализируемого образца по 4.4.3, предварительно прогретого при температуре 50 °С, и тщательно перемешивают. Три пробирки (две опытные и одну контрольную) помещают в ультратермостат с температурой (50 ± 1) °С на 10 мин (с точностью, определяемой по секундомеру).

4.5.3 В контрольную пробирку вносят 1 см^3 рабочего раствора анализируемого образца по 4.4.3. В три пробирки (две опытные и одну контрольную) добавляют по 3 см^3 реактива ДНС по 4.3.3 и тщательно перемешивают.

4.5.4 Все три пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5 мин (с точностью, определяемой по секундомеру).

4.5.5 Пробирки (две опытные и одну контрольную) 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.

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

---

* В зависимости от предполагаемой активности.

4.6 Обработка результатов

4.6.1 Молярную концентрацию ксилозы (в мкмоль/см^3) в опытных и контрольном растворах определяют по градуировочному графику.

4.6.2 Ферментативную активность ксиланазы КсА , ед/г, в анализируемом образце рассчитывают по формуле

$$КсА = \frac{(C_0 - C_к)}{tc}, \quad (1)$$

где C_0 — молярная концентрация ксилозы в анализируемой пробе в соответствии с градуировочным графиком, мкмоль/см^3;

$C_к$ — молярная концентрация ксилозы в контрольной пробе в соответствии с градуировочным графиком, мкмоль/см^3;

t — продолжительность гидролиза, мин;

c — массовая концентрация ферментного препарата в 1 см^3 рабочего раствора анализируемого образца, г/см^3, рассчитывают по формуле

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

где m — масса навески ферментного препарата, г;

V — объем разведения навески при приготовлении основного раствора, см^3;

P — разведение основного раствора ферментного препарата для приготовления рабочего раствора по 4.4.3.

4.6.3 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 $\delta = \pm 7$ %.

4.7 Сходимость и воспроизводимость результатов

4.7.1 Результаты измерений, полученные в условиях повторяемости (сходимости), признаются удовлетворительными, если выполняется условие приемлемости:

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

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

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

$r = 5$ % — предел повторяемости (сходимости).

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

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

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

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

$R = 10$ % — предел воспроизводимости.

5 Определение ферментативной активности ксиланазы с окрашенным субстратом

5.1 Характеристика метода

5.1.1 Метод основан на количественном определении степени деградации (гидролиза) специфического субстрата — окрашенного производного ксилана (азоксилана) — в результате действия ксиланазы (эндоксиланазы) при определенных стандартных условиях (температура 40 °С, pH 4,7, продолжительность гидролиза — 20 мин). Диапазон измерений контролируемого показателя от 500 до 1000 ед. КсА.

5.1.2 В качестве субстрата используют азоксилан.

5.1.3 Продукты реакции — олигомеры с «пришитым» красителем определяют по увеличению поглощения при длине волны 490 нм.

5.1.4 Для определения активности ферментного препарата измеряют интенсивность окраски, освобожденной им из окрашенного субстрата, в сравнении с образцом ксиланазы, имеющим известную ферментативную активность.

5.1.5 Ферментативную активность исследуемого образца определяют по градуировочному графику, построенному для образца ксиланазы с известной ферментативной активностью, и выражают в единицах КсА по 4.1.2.

5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы

5.2.1 Для определения ферментативной активности ксиланазы с окрашенным субстратом используют средства измерений и оборудование по 4.2.1, а также:

- прибор типа вортекс или аналогичный, со скоростью встряхивания от 500 до 2500 мин$^{-1}$;
- фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр (СФ) любого типа, которые обеспечивают измерения при длине волны 490 нм, с погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 % (не более 0,01 единицы оптической плотности).

5.2.2 Для определения ферментативной активности ксиланазы с окрашенным субстратом используют лабораторную посуду и материалы по 4.2.2, реактивы по 4.2.3, а также:

- азоксилан;
- ксиланазу (внутренний стандарт) с известной ферментативной активностью, определенной в разделе 4;
- спирт этиловый 96 % по ГОСТ 5962.

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

5.2.4 Допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования с метрологическими характеристиками, а также реактивов, по качеству не ниже указанных.

5.3 Подготовка к анализу

5.3.1 Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/дм^3, pH 4,7 проводят в соответствии с 4.3.1.

5.3.2 Для приготовления раствора окрашенного субстрата в коническую колбу вместимостью 200 см^3 вносят 1,0 г азоксилана, добавляют 40 см^3 дистиллированной воды. Колбу помещают на магнитную мешалку с обогревом, доводят до кипения и кипятят 2 мин. Затем уменьшают температуру нагрева до 50 °С — 70 °С и раствор выдерживают на магнитной мешалке еще 10 мин.

Колбу с раствором охлаждают до комнатной температуры 20 °С — 25 °С. Затем раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3, доводят объем до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения при температуре 5 °С — 2 нед.

5.3.3 Для приготовления основного стандартного раствора ксиланазы в мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают навеску ксиланазы, взвешенную с точностью до 0,0001 г, с известной активностью (например, 1,0000 г ксиланазы с активностью 900 ед./г), растворяют в небольшом количестве ацетатного буферного раствора по 4.3.1, тщательно перемешивают и доводят объем до метки.

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 2 см^3 полученного раствора, доводят до метки ацетатным буферным раствором по 4.3.1 и перемешивают.

5.3.4 Для приготовления рабочих стандартных растворов ксиланазы из основного стандартного раствора ксиланазы по 5.3.3 готовят серию разведений в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Объем основного стандартного раствора ксиланазы, например с активностью 0,72 ед./см^3, см^3	Объем буферного раствора, см^3	Активность разведения стандартного раствора ксиланазы, ед./см^3
1,0	9,0	0,072
2,5	7,5	0,180
4,0	6,0	0,285
5,0	5,0	0,360
6,5	3,5	0,468
8,0	2,0	0,576
10,0	0,0	0,720

Рабочие стандартные растворы ксиланазы готовят в день построения градуировочного графика, при этом берут по три параллельных разведения для приготовления каждой концентрации раствора ксиланазы.

5.3.5 Для построения градуировочного графика в семь пробирок вместимостью 10 см^3 вносят по 0,5 см^3 окрашенного субстрата по 5.3.2, добавляют по 0,5 см^3 одного из разведений рабочего стандартного раствора ксиланазы в соответствии с таблицей 2 и перемешивают с помощью вортекса со скоростью встряхивания от 1000 до 1500 мин$^{-1}$.

Одновременно готовят контрольную пробу на реактивы, для чего в пробирку вносят 0,5 см^3 окрашенного субстрата по 5.3.2, добавляют 0,5 см^3 ацетатного буферного раствора по 5.3.1 и перемешивают с помощью вортекса со скоростью встряхивания от 1000 до 1500 мин$^{-1}$.

Все пробирки (семь опытных и одну контрольную) помещают в термостат (ультратермостат) с температурой (40 ± 1) °С на 20 мин (по секундомеру).

После извлечения пробирок из термостата во все пробирки добавляют по 2,5 см^3 96 %-ного этилового спирта (осадителя).

Все пробирки выдерживают 10 мин при комнатной температуре и затем центрифугируют при угловой скорости от 5000 до 7000 мин$^{-1}$.

Интенсивность окраски измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при 490 нм по сравнению с контрольной пробой на реактивы.

По полученным значениям строят градуировочный график: на оси абсцисс откладывают активности разведений стандартного раствора ксиланазы КсА, ед./см^3; на оси ординат — соответствующие им значения оптических плотностей в единицах ОП.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднеарифметическое значение оптической плотности трех параллельных измерений для каждой активности стандартного раствора ксиланазы.

Градуировочный график строят для каждой новой партии азоксилана, а также при замене прибора.

5.4 Подготовка пробы

5.4.1 Отбор проб проводят по 4.4.1.

5.4.2 Приготовление основного раствора анализируемого образца проводят по 4.4.2.

5.4.3 Рабочий раствор анализируемого образца готовят из основного раствора по 5.4.2 путем разведения его дистиллированной водой таким образом, чтобы при определении активности оптические плотности опытного и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика.

Рабочий раствор должен содержать от 0,15 до 0,75 единиц активности в 1 см^3.

5.5 Проведение анализа

5.5.1 В три опытные пробирки вместимостью 10 см^3 вносят по 0,5 см^3 раствора окрашенного субстрата по 5.3.2. Пробирки помещают в ультратермостат или водяную баню с температурой (40 ± 1) °С и выдерживают в течение 5 мин, затем вносят 0,5 см^3 рабочего раствора анализируемого образца, предварительно прогретого в ультратермостате или на водяной бане с температурой (40 ± 1) °С, и перемешивают с помощью вортекса со скоростью встряхивания от 1000 до 1500 мин$^{-1}$.

5.5.2 Одновременно готовят контрольную пробу: в пробирку вместимостью 10 см^3 вносят 0,5 см^3 раствора окрашенного субстрата по 5.3.2, 2,5 см^3 96 %-ного этилового спирта (осадителя) и перемешивают с помощью вортекса со скоростью встряхивания от 1000 до 1500 мин$^{-1}$, после чего добавляют 0,5 см^3 рабочего раствора анализируемого образца.

5.5.3 Все пробирки (три опытные и одну контрольную) закрывают пробками и помещают в ультратермостат с температурой (40 ± 1) °С и выдерживают в течение 20 мин (при анализе кормов — 1 ч).

5.5.4 В три опытные пробирки вносят по 2,5 см^3 96 %-ного этилового спирта (осадителя), перемешивают с помощью вортекса со скоростью встряхивания от 1000 до 1500 мин$^{-1}$ и выдерживают 10 мин при комнатной температуре.

5.5.5 Пробирки (три опытные и одну контрольную) центрифугируют 5 мин при угловой скорости от 5000 до 7000 мин$^{-1}$. Отбирают супернатант и проводят измерение оптической плотности на фотоколориметре или спектрофотометре при 490 нм против контрольной пробы.

5.6 Обработка результатов

5.6.1 Активность эндоксиланазы (эндо-КсА) в анализируемом образце, ед./г, рассчитывают по формуле

$$КсА = \frac{A}{c}, \quad (5)$$

где A — активность разведения рабочего раствора, определенная по градуировочному графику 5.3.5, ед./см^3;

c — массовая концентрация ферментного препарата в 1 см^3 рабочего раствора анализируемого образца, г/см^3, по формуле (2).

5.6.2 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 $\delta = \pm 7$ %.

5.7 Сходимость и воспроизводимость результатов

5.7.1 Результаты измерений, полученные в условиях повторяемости (сходимости), признаются удовлетворительными, если выполняется условие приемлемости:

$$|X_1 - X_2| \le r\,0{,}01\overline{X}, \qquad (6)$$

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

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

r = 5 % предел повторяемости (сходимости).

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

$$|X_1 - X_2| \le R\,0{,}01\,\overline{X}, \qquad (7)$$

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

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

R = 10 % предел воспроизводимости.

Библиография

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

УДК 619:615.355:636.087.8:006.354 МКС 07.100.30 65.120 С09

Ключевые слова: препараты ферментные, ферментативная активность ксиланазы, методы определения, субстрат ксилана, окрашенный субстрат

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 16.10.2012. Подписано в печать 22.11.2012. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,25. Тираж 110 экз. Зак. 1046.

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