ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53974— 2010

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Методы определения протеолитической активности

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

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 Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом пищевой биотехнологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 176 «Спиртовая, дрожжевая и ликероводочная продукция»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 ноября 2010 г. № 543-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, 2011

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 Методы определения протеолитической активности в кислой и слабокислой, нейтральной и щелочной зонах pH 2
Библиография 9

Поправка к ГОСТ Р 53974—2010 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения протеолитической активности

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Наименование стандарта на английском языке	Enzyme preparations. Methods for determination of proteolitic activity	Enzyme preparations for food industry. Methods for determination of proteolitic activity

(ИУС № 9 2015 г.)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Методы определения протеолитической активности

Enzyme preparations.
Methods for determination of proteolitic activity

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы определения протеолитической активности в ферментных препаратах в кислой, слабокислой, нейтральной и щелочной зонах pH действия ферментов с использованием в качестве субстрата гемоглобина.

Установленные в настоящем стандарте методы могут быть использованы для определения протеолитической активности ферментных препаратов и ферментсодержащих смесей, используемых в пищевой промышленности.

Примечание — Протеолитическую активность исследуемых ферментных препаратов (ФП) обеспечивает комплекс протеаз, содержащий в основном сериновые, металлозависимые, карбоксильные протеиназы эндодействия, а также пептидазы экзодействия.

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 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 83—79 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия

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

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4109—79 Реактивы. Бром. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6691—77 Реактивы. Карбамид. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 9656—75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 10678—76 Кислота ортофосфорная термическая. Технические условия

ГОСТ 10931—74 Реактивы. Натрий молибденовокислый 2-водный. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13867—68 Продукты химические. Обозначение чистоты

ГОСТ 18289—78 Реактивы. Натрий вольфрамовокислый 2-водный. Технические условия

ГОСТ 18481—81 Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия

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

Издание официальное

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

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 следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **гидролиз:** Расщепление исходного соединения на более простые в присутствии молекулы воды.

3.2 **ферментативный гидролиз:** Расщепление высокомолекулярных соединений при участии катализаторов белковой природы — гидролитических ферментов (гидролаз, класс 3 [1]).

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

3.4 **белки:** Высокомолекулярные полипептидные соединения — полимеры аминокислот, соединенные пептидными связями.

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

Примечания

Системные названия ферментов

Протеазы подразделяют на **две основные группы**: пептидазы (КФ 3.4.11 — 3.4.15) и протеиназы (КФ 3.4.21 — 3.4.24) [1].

Пептидазы (КФ 3.4.11 — 3.4.15) экзодействия катализируют гидролиз пептидной связи с N- и (или) С-конца пептидной цепи;

- α-аминоацилпептидгидролазы (КФ 3.4.11) — аминопептидазы — расщепляют первую пептидную связь с N-конца полипептидной цепи;
- гидролазы пептидиламинокислот или ациламинокислот (КФ 3.4.12) — карбокси-пептидазы — расщепляют первую пептидную связь с С-конца полипептидной цепи с высвобождением отдельных аминокислот или дипептидов;
- дипептидгидролазы (КФ 3.4.13) — дипептидазы — гидролизуют дипептиды;
- дипептидилпептидгидролазы (КФ 3.4.14) и пептидилдипептидгидролазы (КФ 3.4.15) катализируют расщепление дипептидов с N-и С-конца пептидной связи до низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот.

Протеиназы (КФ 3.4.21-24) катализируют гидролиз пептидных связей полипептидной цепи с образованием пептидов с различной молекулярной массой:

- сериновые (КФ 3.4.21) — в каталитическом центре находится триада аминокислот: аспирагиновая, гистидин, серин;
- тиоловые (КФ 3.4.22) — в активном центре находится SH-группа цистеина;
- карбоксильные (КФ 3.4.23) — в их каталитическом акте участвуют остатки дикарбоновых аминокислот, имеют оптимальный pH ниже 5,0;
- металлосодержащие (КФ 3.4.24) — содержат в активном центре ионы металлов, ингибируются хилатными соединениями.

3.6 **комплекс протеаз:** Комплекс гидролитических ферментов, расщепляющих белки до конечных продуктов — свободных аминокислот и (или) пептидов.

4 Методы определения протеолитической активности в кислой и слабокислой, нейтральной и щелочной зонах pH

Определение протеолитической активности в ферментных препаратах – источниках кислых, слабокислых, нейтральных и щелочных протеаз осуществляют путем гидролиза животного белка гемоглобина в различных зонах pH:

- для кислых протеаз — pH 3,0;
- для слабокислых протеаз — pH 5,3;
- для нейтральных протеаз — pH 7,0;
- для щелочных протеаз — pH 9,0.

4.1 Характеристика методов

4.1.1 Методы определения протеолитической активности основаны на гидролизе гемоглобина — животного белка в кислой (pH 3,0), слабокислой (pH 5,3), нейтральной (pH 7,0) и щелочной (pH 9,0) зонах исследуемым ферментным препаратом, находящимся в растворе, до низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот с последующей инактивацией фермента путем осаждения непрогидролизованного белка трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и определением образовавших пептидов и свободных аминокислот.

4.1.2 За единицу общей протеолитической активности (ПС) принимают такое количество фермента, которое за 1 мин при 30 °С приводит гемоглобин в неосаждаемое состояние ТХУ в количестве, соответствующем 1 мкмолю тирозина (1 мкмоль тирозина равен 0,181 мг); активность выражается в ед.ПС/г или ед.ПС/см^3 испытуемого препарата.

4.1.3 Количество белка, превращенного в низкомолекулярные пептиды и аминокислоты, определяют по оптической плотности на спектрофотометре при длине волны λ = 275 нм или по реакции свободных аминокислот с реактивом Фолина и дальнейшим определением оптической плотности образующихся голубых растворов на фотоэлектроколориметре при длине световой волны λ = 670 нм.

Определение протеолитической активности кислых протеаз осуществляют при pH реакционной смеси 3,0 ± 0,2, слабокислых протеаз — при pH 5,3 ± 0,2, нейтральных протеаз — при pH 7,0 ± 0,2, щелочных протеаз — при pH 9,0 ± 0,2 и рассчитывают по градуировочному графику, построенному для тирозина [2].

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

4.2.1 Для определения протеолитической активности используют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, посуду, реактивы, материалы:

- весы лабораторные высокого класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г с пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 0,15 мг;
- фотоэлектроколориметр (КФК-3) или спектрофотометр (СФ) любого типа, которые обеспечивают измерение оптической плотности анализируемых растворов при длине световой волны λ = 670 и 275 нм, соответственно с погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 %;
- pH-метр любого типа для измерения в диапазоне от 0 до 14 pH с пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 0,1 единицы pH;
- холодильник бытовой;
- магнитную мешалку любой марки, которая обеспечивает скорость вращения до 800 мин$^{-1}$;
- ультратермостат или водяной термостат с точностью регулирования температуры ± 1 °С;
- лабораторную центрифугу любого типа, которая обеспечивает скорость вращения не менее 7000 мин$^{-1}$;
- водяную баню 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 V-3 типа Вортекс или аналогичный для перемешивания жидкости;
- 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;
- ареометры общего назначения по ГОСТ 18481;
- холодильник обратный по ГОСТ 25336;
- 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;
- 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;
- фарфоровую ступку по ГОСТ 9147;
- бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
- гемоглобин бычий лиофилизированный, содержание основного вещества не менее 95 %;

- тирозин, содержание основного вещества 98 %;
- трихлоруксусную кислоту;
- кислоту соляную по ГОСТ 3118;
- кислоту ортофосфорную по ГОСТ 10678;
- кислоту уксусную по ГОСТ 61;
- кислоту борную по ГОСТ 9656;
- карбамид по ГОСТ 6691;
- натрий углекислый по ГОСТ 83;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- натрий уксуснокислый по ГОСТ 199;
- натрий вольфрамовокислый 2-водный по ГОСТ 18289;
- натрий молибденовокислый по ГОСТ 10931;
- литий сернокислый;
- бром по ГОСТ 4109;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

4.2.2 Все реактивы должны относиться к подгруппе чистоты 2 (х.ч.) или 3 (ч.д.а.) по ГОСТ 13867, кроме ТХУ, которая используется марки ч.

4.2.3 Допускается использование других средств измерения и аппаратуры, которые по метрологическим характеристикам соответствуют указанным в 4.2.1, а также иной лабораторной посуды и реактивов, в том числе и импортного производства, которые аналогичны указанным в 4.2.2.

4.3 Подготовка к анализу

4.3.1 Приготовление универсального буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/дм^3

4.3.1.1 Приготовление раствора с (CH_3COOH) = 0,1 моль/дм^3 (раствор А)

5,7 см^3 ледяной уксусной кислоты растворяют дистиллированной водой при 20 °С в мерной колбе вместимостью 1 дм^3. Раствор уксусной кислоты хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение четырех недель.

4.3.1.2 Приготовление раствора с (H_3PO_4) = 0,1 моль/дм^3 (раствор В)

6,45 см^3 ортофосфорной кислоты растворяют дистиллированной водой при 20 °С в мерной колбе вместимостью 1 дм^3. Раствор ортофосфорной кислоты хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение четырех недель.

4.3.1.3 Приготовление раствора с (H_3BO_3) = 0,1 моль/дм^3 (раствор С)

Ортоборную кислоту массой (6,18 ± 0,02) г растворяют дистиллированной водой при 20 °С в мерной колбе вместимостью 1 дм^3. Раствор ортоборной кислоты хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение четырех недель.

4.3.1.4 Приготовление раствора с (NaOH) = 1,0 моль/дм^3

Гидроокись натрия массой (40,00 ± 0,01) г растворяют дистиллированной водой при 20 °С в мерной колбе вместимостью 1 дм^3. Раствор гидроокиси натрия хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение двух недель.

4.3.1.5 Приготовление универсального буферного раствора

При смешивании равных объемов растворов А, В и С получают универсальный буферный раствор с pH (2,0 ± 0,2), который используют для приготовления субстрата при определении ферментативной активности кислых протеаз; для слабокислых протеаз — к 100 см^3 универсального буферного раствора добавляют 6,0 см^3 раствора гидроокиси натрия молярной концентрации 1 моль/дм^3, получая буферный раствор с pH 4,7; для нейтральных протеаз — к 100 см^3 универсального буферного раствора добавляют 10 см^3 гидроокиси натрия, получая буферный раствор с pH 7,0; для щелочных протеаз — к 100 см^3 универсального буферного раствора добавляют 14 см^3 гидроокиси натрия, получая буферный раствор с pH 9,3.

Буферные растворы хранят в закрытой стеклянной посуде при 4 °С в течение четырех недель.

4.3.2 Приготовление раствора гемоглобина с массовой долей 2,0 % (субстрат)

Небольшое количество гемоглобина предварительно растирают в фарфоровой ступке. Навеску растертого гемоглобина массой (2,00 ± 0,01) г количественно переносят в стаканчик вместимостью 100 см^3 и растворяют в 50 см^3 буферного раствора с соответствующим значением pH по 4.3.1.5 (для этого навеску гемоглобина тщательно растирают в фарфоровой ступке в небольшом количестве необходимого буфера, затем добавляют остальное его количество). После этого для получения инкубационной смеси (ИС) к раствору гемоглобина добавляют (32,0 ± 0,1) г мочевины, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем ИС тем же буфером до метки и выдерживают в течение 1 ч при 30 °С для денатурации белка. Так как мочевина сдвигает значение pH буфера, особенно в кислой

и слабокислой зонах pH, для создания необходимого pH ИС раствор гемоглобина готовят на буфере с более низким значением pH в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

pH буфера	pH субстрата (ИС)
2,0	3,0
4,7	5,3
7,0	7,0
9,3	9,0

Раствор гемоглобина хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение трех дней.

4.3.3 Приготовление раствора с (Na_2CO_3) = 0,5 моль/дм^3

Навеску безводного углекислого натрия массой (53,00 ± 0,01) г растворяют в 500 см^3 дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1 дм^3. Объем доводят до метки дистиллированной водой при 20 °С и перемешивают. Раствор углекислого натрия хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение двух недель.

4.3.4 Приготовление раствора трихлоруксусной кислоты с массовой долей 5 %

Навеску ТХУ массой (50,00 ± 0,01) г растворяют в 500 см^3 дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1 дм^3. Объем доводят до метки дистиллированной водой при 20 °С и перемешивают. Раствор ТХУ хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение четырех недель.

4.3.5 Приготовление реактива Фолина

4.3.5.1 Приготовление основного раствора реактива Фолина

Для приготовления основного раствора реактива Фолина в круглодонную колбу с пришлифованным обратным холодильником вместимостью 1 дм^3 наливают 600 см^3 дистиллированной воды, добавляют (100,00 ± 0,01) г вольфрамовокислого натрия и (25,00 ± 0,01) г молибденовокислого натрия. Затем приливают 50 см^3 ортофосфорной кислоты с массовой долей 85 % и 100 см^3 концентрированной соляной кислоты и осторожно перемешивают. Смесь кипятят на слабом огне на асбестовой сетке в течение 10 ч. Кипячение допускается прерывать.

По окончании кипячения в охлажденную смесь добавляют (150,00 ± 0,01) г сернокислого лития, 50 см^3 дистиллированной воды и пять капель брома. Открытую колбу кипятят на слабом огне под тягой в течение 15—20 мин, чтобы удалить избыток паров брома. Раствор должен иметь желтую окраску. После охлаждения раствор доводят дистиллированной водой до 1 дм^3 (при необходимости фильтруют через трубку Аллина, заполненную стеклянной ватой).

Приготовленный основной раствор реактива Фолина хранят в склянке из темного стекла в холодильнике. Через 2—3 мес хранения следует добавить в него одну-две капли брома и снова прокипятить в течение 15—20 мин. Показателем непригодности раствора считается его помутнение и изменение окраски из желтой в зеленую.

Концентрацию реактива Фолина проверяют титрованием разбавленного 1:10 реактива Фолина раствором гидроокиси натрия концентрации 0,1 моль/дм^3 по фенолфталеину. Реактив Фолина должен быть концентрации 2,0 моль/дм^3 по кислоте. Если кислотность реактива Фолина больше 2,0 моль/дм^3, то его разбавляют дистиллированной водой, если меньше — реактив для работы не пригоден. Раствор реактива Фолина хранят в закрытой стеклянной посуде при температуре 20 °С в течение одной недели.

4.3.5.2 Приготовление рабочего раствора реактива Фолина

Рабочий раствор реактива Фолина готовят разведением основного раствора дистиллированной водой в соотношении 1:2 (одна часть реактива Фолина и две части дистиллированной воды). Рабочий раствор реактива Фолина хранят в закрытой стеклянной посуде при температуре 20 °С в течение одной недели.

4.3.6 Вычисление тирозинового эквивалента

Протеолитическую активность исследуемого образца вычисляют по тирозину. Для этого строят градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации тирозина и по нему вычисляют тирозиновый эквивалент (ТЭ), т.е. оптическую плотность, которую дает 1 мкмоль тирозина в 1 см^3 градуировочного раствора.

4.3.6.1 Приготовление основного градуировочного раствора тирозина концентрации 10^{-3} моль/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают навеску чистого тирозина массой (0,0181 ± 0,0001) мг и растворяют в растворе соляной кислоты молярной концентрации 0,2 моль/дм^3.

4.3.6.2 Приготовление рабочих градуировочных растворов тирозина

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят различные количества основного раствора тирозина в соответствии с таблицей 2 и доводят до метки раствором соляной кислоты молярной концентрации 0,2 моль/дм^3, получая различные концентрации тирозина в рабочих растворах.

Таблица 2

Объем раствора градуировочного раствора тирозина молярной концентрации 10^{-3} моль/см^3, см^3	Молярная концентрация тирозина в рабочем растворе, мкмоль/см^3
1,0	0,02
2,0	0,04
4,0	0,08
5,0	0,10
7,5	0,15
10,0	0,20

4.3.6.3 Построение градуировочного графика

В шесть пробирок (15 × 150 мм) вносят по 1 см^3 рабочего раствора тирозина различной концентрации и добавляют при перемешивании по 5 см^3 раствора реактива углекислого натрия концентрации 0,5 моль/дм^3 и по 1 см^3 рабочего раствора реактива Фолина. Контрольный опыт готовят так же, но вместо раствора тирозина используют 1 см^3 дистиллированной воды. Реакционную смесь выдерживают в течение 20 мин. Интенсивность окраски измеряют на фотоэлектроколориметре против контрольной пробы при длине волны λ = 670 нм в кюветах с толщиной слоя, поглощающего свет, 10 мм.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднеарифметическое значение оптической плотности трех параллельных измерений. По полученным значениям строят градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации тирозина (мкмоль/см^3) (рисунок 1).

На оси абсцисс X откладывают значения концентрации тирозина C в мкмоль/см^3, на оси ординат Y — соответствующие им значения оптической плотности D при λ = 670 нм.

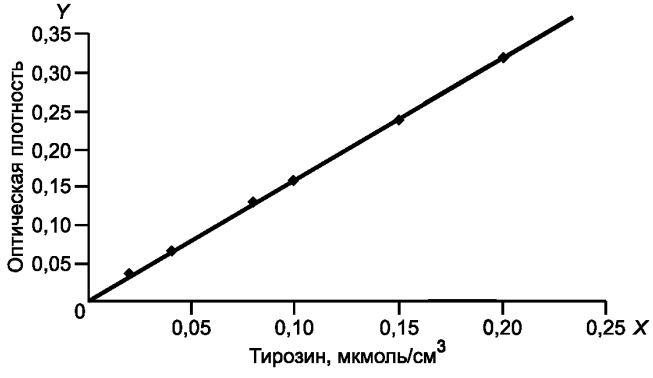

Рисунок 1

По градуировочному графику находят ТЭ, соответствующий оптической плотности 1 мкмоль тирозина в 1 см^3. В данном случае 0,1 мкмоль/см^3 соответствует значению оптической плотности 0,16, тогда 1 мкмоль/см^3 тирозина даст показание, равное 1,6. Следовательно, ТЭ равен 1,6.

ТЭ необходимо устанавливать для каждой новой партии приготовленного реактива Фолина и при смене прибора.

4.4 Подготовка пробы

4.4.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 20264.0.

Анализируемые образцы ферментных препаратов в форме порошка или ультраконцентрата можно использовать без предварительной подготовки.

4.4.2 Приготовление основного раствора анализируемого образца ферментного препарата

В стаканчик для взвешивания помещают сухой анализируемый образец ферментного препарата массой (0,1000 ± 0,0002) г или жидкий ферментный препарат массой (1,00 ± 0,02) г и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды. Суспензию 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 анализируемого образца.

4.4.3 Приготовление рабочего раствора анализируемого образца ферментного препарата

Рабочий раствор анализируемого образца ферментного препарата готовят из основного раствора по 4.4.2 путем разведения его в дистиллированной воде.

Количество фермента, взятого на анализ, должно быть рассчитано так, чтобы в реакционной смеси по 4.5.2 присутствовал избыток субстрата и чтобы измеряемые величины оптической плотности по 4.5.3 при колориметрировании в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм лежали в диапазоне значений 0,1—0,21.

При отклонении оптической плотности от указанных значений необходимо подобрать разведение препарата таким образом, чтобы оптическая плотность окрашенных растворов реакционной смеси *D* по 4.5.3 соответствовала указанным пределам диапазона.

Каждое разведение испытуемого раствора анализируют в двух повторностях. Для испытания берут две параллельные навески препарата.

Раствор ферментного препарата готовят непосредственно перед определением.

4.5 Проведение испытания

4.5.1 В две опытные пробирки (16 × 150 мм) вносят по 1 см^3 субстрата по 4.3.2, помещают их в ультратермостат при температуре (30,0 ± 1,0) °С и выдерживают в течение 5 мин.

4.5.2 В пробирки с субстратом добавляют по 1 см^3 рабочего раствора анализируемого образца ферментного препарата по 4.4.3, предварительно термостатированного при температуре (30,0 ± 1,0) °С 3 — 4 мин; пробирки встряхивают и оставляют на гидролиз ровно на 10 мин при температуре (30,0 ± 1,0) °С (с точностью, определяемой по секундомеру от начала ферментативной реакции).

4.5.3 По окончании реакции добавляют в обе пробирки по 2 см^3 раствора ТХУ по 4.3.4, чтобы прервать ферментативную реакцию и осадить непрогидролизовавшийся белок, а также высокомолекулярные продукты гидролиза.

4.5.4 Смесь перемешивают и для обеспечения полного осаждения белка выдерживают пробирки со смесью в течение 10 мин. Затем смесь фильтруют в сухие пробирки. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен. В чистые пробирки вносят по 1 см^3 фильтрата, добавляют по 5 см^3 раствора углекислого натрия по 4.3.3, перемешивают и приливают по 1 см^3 рабочего раствора реактива Фолина по 4.3.5.2. Реакционную смесь выдерживают ровно 20 мин (по секундомеру). В процессе реакции растворы приобретают голубую окраску, интенсивность которой определяют на фотоэлектроколориметре при длине световой волны λ = 670 нм в кюветах толщиной поглощающего свет слоя 10 мм в сравнении с контролем.

4.5.5 Контрольный образец готовят, прибавляя реактивы в обратной последовательности. Для этого в контрольную пробирку вносят 1 см^3 рабочего ферментного раствора того же разведения по 4.4.3, как и в опыте, добавляют 2 см^3 ТХУ по 4.3.4, вносят 1 см^3 субстрата по 4.3.2 и выдерживают в ультратермостате при температуре 30 °С в течение 10 мин. Дальнейшие операции осуществляют аналогично 4.5.2.

4.6 Обработка результатов

4.6.1 Протеолитическую активность, ед.ПС/г или ед.ПС/см^3 испытуемого препарата, рассчитывают по формуле

$$ПС = \frac{D \cdot 4}{ТЭ \cdot 10 \cdot m} \cdot d, \quad (1)$$

где *D* — оптическая плотность исследуемого раствора;

4 — отношение объемов реакционной смеси и раствора фермента после добавления ТХУ;

ТЭ — тирозиновый эквивалент, определяемый по 4.3.6;

10 — время гидролиза субстрата, мин;

m — масса ферментного препарата, взятая на гидролиз (расчет ведется на 1 см^3 рабочего раствора анализируемого образца ферментного препарата), г;

d — плотность ферментного препарата (для жидких препаратов), г/см^3.

4.6.2 За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости (2).

Границы относительной погрешности $\delta = \pm 7$ % (соответствуют значению относительной расширенной неопределенности $U_{0,95}$ при коэффициенте охвата $k = 2$).

Результат анализа представляют в виде

$$\overline{X} \pm \Delta \text{ при } P = 0,95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение двух параллельных измерений, признанных приемлемыми, ед.ПС/г (ед.ПС/см^3);

Δ — границы абсолютной погрешности измерений, ед.ПС/г (ед.ПС/см^3), вычисляют по формуле

$$\Delta = \overline{X} \cdot \delta \cdot 0,01 \text{ или } \Delta = 0,07 \cdot \overline{X}.$$

Наименьшие разряды числовых значений результата измерения и числовых показателей точности должны быть одинаковы.

Значащих цифр числовых показателей точности измерений должно быть не более двух.

4.7 Сходимость и воспроизводимость результатов

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

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot r \cdot X, \quad (2)$$

где X_1 и X_2 — результаты двух параллельных определений, полученные в условиях повторяемости, ед.ПС/г или ед.ПС/см^3 испытуемого препарата;

0,01 — коэффициент для пересчета процентов в абсолютные значения;

r — предел повторяемости (сходимости), равный 8 %;

X — среднеарифметическое значение двух параллельных определений, ед.ПС/г или ед.ПС/см^3 испытуемого препарата.

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

$$CD_{0,95} \le \frac{|X_3 - X_4|}{X} \cdot 100, \quad (3)$$

где X_3 и X_4 — результаты двух определений, полученные в условиях воспроизводимости, ед.ПС/г или ед.ПС/см^3 испытуемого препарата;

X — среднеарифметическое значение двух определений, выполненных в разных лабораториях в условиях воспроизводимости, ед.ПС/г или ед.ПС/см^3 испытуемого препарата;

100 — коэффициент для пересчета в проценты;

$CD_{0,95}$ — критическая разность, равная 10 %.

Библиография

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

[2] Полыгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов: Справочник. М.: ДеЛи принт, 2003. 372 с.

УДК 577.15:543.06:006.354 ОКС 07.100.30 Н09 ОКСТУ 9291

Ключевые слова: препараты ферментные, протеолитическая активность в ферментсодержащих средах в кислой, слабокислой, нейтральной и щелочной зонах pH, методы определения с использованием субстрата гемоглобина, гидролиза его при 30 °С и индикации образующихся аминокислот и коротких пептидов с реактивом Фолина

Редактор *А.Д. Чайка*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 16.09.2011. Подписано в печать 05.10.2011. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,40. Тираж 201 экз. Зак. 925.

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»,
117418 Москва, Нахимовский проспект, 31, к. 2.

Изменение № 1 ГОСТ Р 53974—2010 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения протеолитической активности

Утверждено и введено в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29.09.2015 № 1401-ст

Дата введения — 2016—01—01

Титульный лист, содержание, первая страница, раздел 1, наименование раздела 4 и подраздела 4.1, пункт 4.1.1. Заменить слово: «Методы» на «Метод».

Первая страница. Наименование стандарта на английском языке. Заменить слово: «Methods» на «Method».

Раздел 2 дополнить ссылкой:

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

Пункт 4.1.3. Первый абзац. Исключить слова: «по оптической плотности на спектрофотометре при длине волны λ = 275 нм или»;

второй абзац. Исключить ссылку: [2].

Пункт 4.2.1. Второй абзац изложить в новой редакции:

«весы неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228, с пределами абсолютной допускаемой погрешности ± 0,5 мг».

Пункт 4.3.2. Второй абзац. Заменить слова: «при 20°С» на «при температуре 4 °С».

Подпункт 4.3.6.1. Первый абзац. Заменить единицу измерения: «10^{-3} моль/см^3» на «10^{-3} моль/дм^3»;

второй абзац. Заменить значение: «(0,0181 ± 0,0001) мг» на «(18,1±0,5)мг».

Подпункт 4.3.6.2. Таблица 2. Наименование графы «Объем раствора градуировочного раствора тирозина молярной концентрации 10^{-3} моль/см^3, см^3» заменить на: «Объем градуировочного раствора тирозина молярной концентрации 10^{-3} моль/дм^3, см^3».

Пункт 4.4.2. Заменить значение: «(0,1000 ± 0,0002) г» на «(0,1000 ±0,0005) г».

Пункт 4.7.2. Экспликация к формуле (3). Символ «*X*». Заменить слова: «двух определений» на «двух окончательных результатов определений».

Библиография. Исключить ссылку: [2].

(ИУС № 1 2016 г.)

gost.e-ecolog.ru