ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ГОСТ Р 53360— 2009**

# ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

## Методы определения ферментативной активности фитазы

Издание официальное

БЗ 11—2008/424

Москва
Стандартинформ
2009

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

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 июля 2009 г. № 237-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, 2009

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

## Методы определения ферментативной активности фитазы

Enzyme preparation.
Methods of detection of phytase activity

**Дата введения — 2010—01—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы определения ферментативной активности фитазы ферментных препаратов и ферментсодержащих смесей с использованием в качестве субстрата фитата натрия.

Примечание — Фермент фитаза — мио-инозит-гексафосфат 3-фосфогидролаза (3.1.3.8) [1], катализирует гидролитическое расщепление эфиров инозита и фосфорной кислоты (фитина), начиная с положения $C_3$, с высвобождением фосфатов.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие 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 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3765—78 Реактивы. Аммоний молибденовокислый. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4461—77 Реактивы. Кислота азотная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 9336—75 Реактивы. Аммоний ванадиевокислый мета. Технические условия

ГОСТ 10931—74 Реактивы. Натрий молибденовокислый 2-водный. 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 24147—80 Аммиак водный особой чистоты. Технические условия

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.

**Издание официальное**

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 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.

## 4 Метод определения ферментативной активности фитазы с образованием молибденовой сини

### 4.1 Характеристика метода

4.1.1 Метод основан на количественном определении содержания неорганических фосфатов ($PO_4$), образующихся в результате действия фермента фитазы на субстрат — фитат натрия (натриевую соль фитиновой кислоты) при определенных стандартных условиях, путем их связывания молибдатом натрия и восстановлением двухлористым оловом с образованием окрашенного в синий цвет комплекса — молибденовой сини.

Метод используется при возникновении разногласий в качестве арбитражного.

4.1.2 За единицу фитазной активности (1 ед. ФА) принимают количество фермента, катализирующее гидролиз фитата натрия с образованием 1 мкмоля неорганического фосфата за одну минуту в стандартных условиях (температура 37 °С, значение pH 5,5, продолжительность гидролиза 15 мин).

4.1.3 Интенсивность окраски измеряют фотоколориметрическим методом при длине волны от 650 до 700 нм.

4.1.4 Количество выделенных неорганических фосфатов определяют по градуировочному графику, построенному как функция оптической плотности от молярной концентрации фосфатов, мкмоль/ $см^3$.

Метод позволяет определять от 0,05 до 0,40 мкмоль/ $см^3$ фосфатов. Диапазон измерений контролируемого показателя 500—8000 ед. ФА.

### 4.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы

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

- фотоэлектроколориметр (ФЭК) любого типа, который обеспечивает измерения при длине волны от 650 до 700 нм, с погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 % (не более 0,01 единицы оптической плотности);
- pH-метр с набором электродов для измерения в диапазоне от 0 до 14 pH, с пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 0,1 pH;
- 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 $мин^{-1}$;
- 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; с наибольшим пределом взвешивания 1 кг, ценой поверочного деления 20 мг и пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 30 мг;
- водяную баню любого типа, которая обеспечивает поддержание температуры (100 ± 1) °С;
- таймер любого типа с погрешностью ± 30 с;
- шкаф сушильный, обеспечивающий температуру нагрева (120 ± 5) °С;
- вытяжной шкаф любого типа;
- механическую мельницу, обеспечивающую размалывание исследуемого образца ферментного препарата до полного прохода пробы через сито;
- сито с размером отверстий 1,0 мм, сделанное из металлического проволочного тканого материала.

4.2.2 Для определения ферментативной активности фитазы 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 П 1-14-120 ХС или П 1-16-150 ХС по ГОСТ 25336;
- пипетки по ГОСТ 29227;
- пипетки автоматические с емкостью 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, 200, 600, 1000 ТС по ГОСТ 25336;
- цилиндры 1(2,3,4)-50,100-1 по ГОСТ 1770;
- ступку и пестик фарфоровые по ГОСТ 9147;
- эксикатор любого исполнения по ГОСТ 25336.

4.2.3 Для определения ферментативной активности фитазы используют следующие реактивы:

- воду бидистиллированную, дистиллированную дважды перегнанную или деионизированную, свободную от фосфатов по [2];
- калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198;
- кислоту уксусную ледяную по ГОСТ 61;
- натрий уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 199;
- натрия фитат с содержанием примеси кальция не более 2 %;
- натрий молибденовокислый 2-водный (натрия молибдат) по ГОСТ 10931;
- кислоту серную по ГОСТ 4204, концентрированную;
- кислоту соляную по ГОСТ 3118, концентрированную;
- олово(II) хлорид 2-водное (олово двухлористое), [3].

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 измерения и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов по качеству не ниже указанных.

**4.3 Подготовка к анализу**

**4.3.1 Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ с pH 5,5 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, разводят приблизительно 300,0 $см^3$ бидистиллированной воды. Доводят до метки бидистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 мес.

4.3.1.2 Приготовление раствора уксуснокислого натрия

В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ помещают 13,6 г уксуснокислого натрия и растворяют приблизительно в 300,0 $см^3$ бидистиллированной воды. Затем доводят до метки бидистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 мес.

4.3.1.3 Для приготовления ацетатного буферного раствора в колбе вместимостью 2 $дм^3$ смешивают объемы растворов уксусной кислоты по 4.3.1.1 и уксуснокислого натрия по 4.3.1.2, в следующем соотношении: к 885 $см^3$ раствора уксуснокислого натрия добавляют при энергичном размешивании 115 $см^3$ раствора уксусной кислоты. При необходимости доводят pH раствора до 5,5 одним из исходных растворов.

Срок хранения при комнатной температуре не более 1 мес.

**4.3.2 Приготовление раствора натрия молибдата в серной кислоте**

4.3.2.1 Приготовление раствора серной кислоты концентрации 1,25 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ вносят примерно 700,0 $см^3$ бидистиллированной воды и постепенно добавляют 69,6 $см^3$ концентрированной серной кислоты плотностью 1,83 г/$см^3$, тщательно перемешивают и доводят до метки бидистиллированной водой.

4.3.2.2 Для приготовления раствора натрия молибдата в колбу вместимостью 2 $дм^3$ помещают 18,75 г натрия молибденовокислого и растворяют в 1,00 $дм^3$ серной кислоты по 4.3.2.1.

Срок хранения в посуде темного стекла с притертой пробкой, в защищенном от света месте, при комнатной температуре — один год.

**4.3.3 Приготовление рабочего раствора двухлористого олова**

4.3.3.1 Приготовление основного раствора двухлористого олова

В плоскодонную стеклянную колбу вместимостью 50 $см^3$ вносят 10,0 г двухлористого олова, добавляют 25,0 $см^3$ концентрированной соляной кислоты и нагревают в водяной бане при температуре 100 °С (в вытяжном шкафу) до полного растворения.

Срок хранения в посуде темного стекла с притертой пробкой, в вытяжном шкафу — один год. Раствор должен быть прозрачным и бесцветным.

4.3.3.2 Для приготовления рабочего раствора двухлористого олова в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 0,5 $см^3$ основного раствора двухлористого олова по 4.3.3.1, доводят до метки бидистиллированной водой и перемешивают. Раствор должен быть бесцветным.

Рабочий раствор готовят в день проведения анализа.

**4.3.4 Приготовление раствора субстрата фитата натрия молярной концентрации 5 мкмоль/$см^3$**

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 461,9 мг фитата натрия, растворяют приблизительно в 70,0 $см^3$ ацетатного буферного раствора по 4.3.1, доводят до метки буферным раствором и перемешивают. Раствор готовят в день проведения анализа.

**4.3.5 Приготовление рабочих стандартных растворов фосфатов ($PO_4$) для построения градуировочного графика**

4.3.5.1 Приготовление основного стандартного раствора фосфатов

В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ помещают 680 мг высушенного при температуре 100 °С — 105 °С и охлажденного в эксикаторе фосфорнокислого калия, растворяют приблизительно в 300 $см^3$ ацетатного буферного раствора по 4.3.1, доводят до метки ацетатным буферным раствором и перемешивают.

Молярная концентрация фосфатов в стандартном растворе составляет 5 мкмоль/$см^3$.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 мес.

4.3.5.2 Приготовление серии разведений — рабочих стандартных растворов фосфатов

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

Таблица 1

| Объем стандартного раствора фосфорнокислого калия молярной концентрации 5 мкмоль/$см^3$, $см^3$ | Объем ацетатного буферного раствора, $см^3$ | Молярная концентрация фосфатов в растворе, мкмоль/$см^3$ |
|---|---|---|
| 1 | 99 | 0,05 |
| 2 | 98 | 0,10 |
| 3 | 97 | 0,15 |
| 4 | 96 | 0,20 |
| 5 | 95 | 0,25 |
| 6 | 94 | 0,30 |
| 7 | 93 | 0,35 |
| 8 | 92 | 0,40 |

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

**4.3.6 Построение градуировочного графика**

В восемь пробирок вместимостью 10 $см^3$ вносят по 2,0 $см^3$ рабочих стандартных растворов фосфорнокислого калия различных молярных концентраций в соответствии с таблицей 1, добавляют по 2,0 $см^3$ раствора натрия молибдата по 4.3.2 и 0,5 $см^3$ рабочего раствора олова двухлористого по 4.3.3, тщательно перемешивают.

Одновременно готовят контрольную пробу на реактивы, для чего в пробирку вносят 2,0 $см^3$ ацетатного буферного раствора по 4.3.1, 2,0 $см^3$ раствора натрия молибдата по 4.3.2 и 0,5 $см^3$ рабочего раствора олова двухлористого по 4.3.3, тщательно перемешивают.

Все пробы выдерживают 1 мин и измеряют оптические плотности на фотоэлектроколориметре при длине волны от 650 до 670 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 3 мм, против контрольной пробы на реактивы.

По полученным значениям строят градуировочный график, для чего по оси ординат откладывают величины оптической плотности в единицах ОП, а по оси абсцисс — молярные концентрации фосфатов в мкмоль/см$^3$.

Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,25 до 0,60 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 Подготовка пробы**

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, на зерновой мельнице или в фарфоровой ступке) и просеивать через сито с диаметром отверстий не более 1 мм.

**4.4.2 Приготовление 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 бидистиллированной воды (до 50 см$^3$) на магнитной мешалке в течение 15 мин (порошок, микрогранулы, микрокапсулы) или 60 мин (корма, кормовые смеси). Суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$ и доводят объем бидистиллированной водой до метки. Полученную суспензию центрифугируют при частоте вращения 7000 мин$^{-1}$ в течение 15 мин. Для анализа используют надосадочную жидкость.

Раствор готовят в день определения.

**4.4.3 Приготовление рабочего раствора анализируемого образца**

Рабочий раствор готовят из основного раствора по 4.4.2 путем его разведения в бидистиллированной воде (например, в 20 раз) таким образом, чтобы при определении активности оптические плотности опытных и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика.

**4.5 Проведение анализа**

4.5.1 В три пробирки (две опытные и одну контрольную) вносят по 1,0 см$^3$ рабочего раствора анализируемого образца по 4.4.3. Пробирки помещают в ультратермостат или водяную баню с температурой (37 ± 1) °С и выдерживают в течение 5 мин.

4.5.2 В две опытные пробирки добавляют по 1,0 см$^3$ раствора субстрата фитата натрия по 4.3.4, предварительно выдержанного в ультратермостате или водяной бане с температурой (37 ± 1) °С в течение 5 мин, и перемешивают. Пробирки помещают в ультратермостат или водяную баню с температурой (37 ± 1) °С на 15 мин.

4.5.3 В контрольную пробирку вносят 1,0 см$^3$ раствора субстрата фитата натрия по 4.3.4. В контрольную и две опытные пробирки добавляют по 2,0 см$^3$ раствора натрия молибдата по 4.3.2 и 0,5 см$^3$ рабочего раствора олова хлорида по 4.3.3 и тщательно перемешивают.

4.5.4 Пробирки (две опытные и одну контрольную) выдерживают одну мин при комнатной температуре. Растворы колориметрируют при длине волны от 650 до 700 нм, в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 3 мм, против контроля на реактивы. При необходимости (опалесценция, взвесь и т. д.) раствор центрифугируют при 7000 мин$^{-1}$.

## 5 Метод определения ферментативной активности фитазы с образованием фосфорнованадиево-молибденового комплекса

**5.1 Характеристика метода**

5.1.1 Метод основан на определении содержания неорганических фосфатов ($PO_4$), образующихся в результате действия фермента фитазы на субстрат — фитат натрия (натриевую соль фитиновой кислоты) — при определенных стандартных условиях, путем их связывания ванадиево-молибденовым реактивом с образованием фосфорнованадиево-молибденового комплекса желтого цвета.

5.1.2 За единицу фитазной активности (1 ед. ФА) принимают количество фермента, катализирующего гидролиз фитата натрия с образованием одного мкмоля неорганического фосфата за одну минуту в стандартных условиях (температура 37 °С, значение pH 5,5, продолжительность гидролиза 15 мин).

5.1.3 Интенсивность окраски измеряют фотоколориметрическим методом при длине волны от 400 до 415 нм.

---

* В зависимости от предполагаемой активности.

5.1.4 Количество выделенных неорганических фосфатов определяют по градуировочному графику, построенному как функция оптической плотности от молярной концентрации фосфатов, мкмоль/см$^3$.

Метод позволяет определять 0,5—2,0 мкмоль/см$^3$ фосфатов. Диапазон измерений контролируемого показателя 500—8000 ед. ФА.

**5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы**

5.2.1 Для определения ферментативной активности фитазы с образованием фосфорнованадиево-молибденового комплекса применяют средства измерений, вспомогательное оборудование, которые указаны в 4.2.1 и 4.2.2.

5.2.2 Для определения ферментативной активности фитазы используют реактивы по 4.2.3, а также:

- аммоний молибденовокислый по ГОСТ 3765;
- аммиак водный особой чистоты по ГОСТ 24147, раствор массовой доли 25 %;
- кислоту азотную по ГОСТ 4461, раствор массовой доли 25 %;
- аммония метаванадат по ГОСТ 9336;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

**5.3 Подготовка к анализу**

5.3.1 Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/дм$^3$ с pH 5,5 проводят по 4.3.1.

**5.3.2 Приготовление ванадиево-молибденового реактива**

В колбу вместимостью 2 дм$^3$ помещают 0,6 г аммония метаванадата и растворяют в 440,0 см$^3$ горячей дистиллированной воды. Раствор охлаждают до комнатной температуры и при постоянном перемешивании добавляют 560,0 см$^3$ 25 % раствора азотной кислоты и 25,0 г аммония молибденовокислого. Перемешивают до полного растворения.

Срок хранения при комнатной температуре — один год.

5.3.3 Приготовление раствора субстрата фитата натрия молярной концентрации 5 мкмоль/см$^3$ проводят по 4.3.4.

Раствор готовят в день проведения анализа.

**5.3.4 Приготовление рабочих стандартных растворов фосфатов ($PO_4$) для построения градуировочного графика**

5.3.4.1 Приготовление основного стандартного раствора фосфатов проводят по 4.3.5.1.

Молярная концентрация фосфатов в стандартном растворе составляет 5 мкмоль/см$^3$.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 мес.

5.3.4.2 Приготовление серии разведений — рабочих стандартных растворов фосфатов

Из основного стандартного раствора фосфорнокислого калия по 4.3.5.1 готовят серию разведений в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

| Объем стандартного раствора фосфорнокислого калия молярной концентрации 5 мкмоль/см$^3$, см$^3$ | Объем ацетатного буферного раствора, см$^3$ | Молярная концентрация фосфатов в растворе, мкмоль/см$^3$ |
|---|---|---|
| 1,0 | 9,0 | 0,50 |
| 1,5 | 8,5 | 0,75 |
| 2,0 | 8,0 | 1,00 |
| 2,5 | 7,5 | 1,25 |
| 3,0 | 7,0 | 1,50 |
| 3,5 | 6,5 | 1,75 |
| 4,0 | 6,0 | 2,00 |

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

**5.3.5 Построение градуировочного графика**

В семь пробирок вместимостью 10 см$^3$ вносят по 2,0 см$^3$ рабочих стандартных растворов фосфорнокислого калия различных молярных концентраций в соответствии с табл. 2, добавляют по 4,0 см$^3$ ванадиево-молибденового реактива по 5.3.2 и 4,0 см$^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

Одновременно готовят контрольную пробу на реактивы, для чего в пробирку вносят 2,0 см$^3$ ацетатного буферного раствора по 5.3.1, 4,0 см$^3$ ванадиево-молибденового реактива по 5.3.2 и 4,0 см$^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

Все пробы выдерживают 10 мин при комнатной температуре и измеряют оптические плотности на фотоэлектроколориметре при длине волны от 400 до 415 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм, против контроля на реактивы.

По полученным значениям строят градуировочный график, для чего по оси ординат откладывают величины оптической плотности в единицах ОП, а по оси абсцисс — молярной концентрации фосфатов в мкмоль/см$^3$.

Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,20 до 0,60 единиц оптической плотности.

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.

**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 Приготовление рабочего раствора анализируемого образца проводят путем разведения основного раствора по 5.4.2 в бидистиллированной воде (например в пять раз).

**5.5 Проведение анализа**

5.5.1 В три пробирки (две опытные и одну контрольную) вносят по 2,0 см$^3$ рабочего раствора анализируемого образца по 5.4.3. Пробирки помещают в ультратермостат или водяную баню с температурой (37 ± 1) °С и выдерживают в течение 5 мин.

5.5.2 В две опытные пробирки добавляют по 4,0 см$^3$ раствора субстрата фитата натрия по 5.3.3, предварительно выдержанного в ультратермостате или водяной бане с температурой (37 ± 1) °С в течение 5 мин, и перемешивают. Все три пробирки помещают в ультратермостат или водяную баню с температурой (37 ± 1) °С на 15 мин.

5.5.3 В контрольную пробирку вносят 4 см$^3$ раствора субстрата фитата натрия по 5.3.3. В контрольную и две опытные пробирки добавляют по 4,0 см$^3$ ванадиево-молибденового реактива по 5.3.2 и тщательно перемешивают.

5.5.4 Пробирки (две опытные и одну контрольную) выдерживают 10 мин при комнатной температуре. Растворы колориметрируют при длине волны от 400 до 415 нм, в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм, против контроля на реактивы. При необходимости (опалесценция, взвесь и т. д.) растворы центрифугируют при 7000 мин$^{-1}$.

## 6 Обработка результатов

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

6.2 Ферментативную активность фитазы ФА, ед/г, в анализируемом образце рассчитывают по формуле

$$ФА = \frac{(C_о - C_к)}{ct}, \quad (1)$$

где $C_о$ — молярная концентрация фосфатов в опытной пробе в соответствии с градуировочным графиком, мкмоль/см$^3$;

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

$t$ — продолжительность гидролиза, мин;

$c$ — массовая концентрация ферментного препарата, содержащаяся в реакционной смеси, г/см$^3$, рассчитываемая 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 5.4.3.

6.3 За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до первого десятичного знака ($\overline{X} + \Delta$), ед/г, при доверительной вероятности $P = 0,95$, где $\Delta = 0,01\,\delta\overline{X}$.

Границы относительной погрешности $\delta = \pm 7$ % при доверительной вероятности $P = 0,95$.

## 7 Сходимость и воспроизводимость результатов

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;

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

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

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

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;

$R$ — предел воспроизводимости, равный 10 %.

## Библиография


| | |
|---|---|
| [1] | Enzyme Nomenclature, recommendations of the nomenclature Committete of the IUB, N.Y., Academic Press, 1984 |
| [2] ТУ 2638-263-00209792—2000 | Вода деионизированная |
| [3] ТУ 6-09-5394—88 | Олово (II)хлорид 2-водное (олово двухлористое) |

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

Ключевые слова: препараты ферментные, ферментативная активность фитазы, метод определения активности фитазы с образованием молибденовой сини, метод определения активности фитазы с образованием фосфорнованадиево-молибденового комплекса

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 01.09.2009. Подписано в печать 21.09.2009. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,10. Тираж 120 экз. Зак. 603.

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