ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53046— 2008

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

Методы определения ферментативной активности целлюлазы

Издание официальное

БЗ 9—2008/323

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 16 декабря 2008 г. № 415-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 целлюлазы

Enzyme preparation.
Methods of cellulasa enzyme activity determination

Дата введения — 2010—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы определения ферментативной активности целлюлазы ферментных препаратов с использованием двух субстратов: хроматографической бумаги и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы.

Методы, установленные в настоящем стандарте, могут быть также использованы для определения ферментативной активности целлюлазы ферментсодержащих смесей, в т.ч. кормовых смесей и кормов.

Примечания

1 Активность целлюлазы (целлюлолитическую активность) природных объектов обеспечивает комплекс, содержащий, в основном, три типа ферментов: эндо-1,4-β-глюканазы, экзо-1,4-β-глюканазы и β-глюкозидазы.

2 Системные названия ферментов:

- эндо-1,4-β-глюкан-4-глюканогидролазы (КФ 3.2.1.4) катализируют расщепление целлюлозы с образованием крупных фрагментов;
- экзо-1,4-β-глюканцеллобиогидролазы (КФ 3.2.1.91) отщепляют целлобиозу от нередуцирующего конца молекул целлюлозы и их фрагментов;
- экзо-1,4-β-глюкан-4-глюкогидролазы (КФ 3.2.1.74) отщепляют глюкозу от нередуцирующего конца цепей;
- β-глюкозидглюкогидролазы (КФ 3.2.1.21), или β-глюкозидазы (целлобиазы) катализируют гидролиз целлобиозы.

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 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4206—75 Реактивы. Калий железосинеродистый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

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

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

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

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

Издание официальное

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

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1:1981) 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.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют 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).

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

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

3.5 **целлюлоза**: Высокомолекулярное соединение, полимер глюкозы.

3.6 **целлюлолитический комплекс ферментов:** Комплекс гидролитических ферментов, расщепляющий целлюлозу до конечного продукта — глюкозы.

4 Метод определения ферментативной активности целлюлазы с использованием субстрата хроматографической бумаги

4.1 Характеристика метода

4.1.1 Метод основан на количественном определении восстанавливающих сахаров, образующихся в результате гидролиза целлюлозы хроматографической бумаги под действием ферментов целлюлолитического комплекса.

Метод используется при возникновении разногласий в качестве арбитражного.

4.1.2 За единицу целлюлолитической активности (1 ед. ЦлА) принято количество ферментов, которое катализирует гидролиз целлюлозы хроматографической бумаги с образованием 1 мкмоля восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу) за 1 ч при температуре 50 °С и pH 4,7.

4.1.3 Содержание восстанавливающих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом с использованием реактива динитросалициловой кислоты или калия железосинеродистого (красной кровяной соли, калия феррицианида, калия гексационоферрата) и рассчитывают по градуировочному графику, построенному для глюкозы. Диапазон измерений контролируемого показателя 0,5 — 25,0 ед. ЦлА.

4.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы

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

- фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр (СФ) любого типа, которые обеспечивают измерения при длине волны 540 нм и погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 % (не более 0,01 D (ед. ОП));
- pH-метр любого типа для измерения в диапазоне от 0 до 14 pH, пределом допускаемой погрешности в эксплуатации ± 0,1 ед. 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 высокого или специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и ценой поверочного деления 0,1 мг по ГОСТ 24104;
- секундомер механический с пределом измерений 60 мин с ценой деления 0,2 с;
- водяную баню любого типа, которая обеспечивает поддержание температуры (100 ± 1) С;
- таймер любого типа с погрешностью ± 30 с;
- 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 целлюлазы 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;
- автоматические пипетки номинальной 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
- ступку и пестик фарфоровые по ГОСТ 9147.

4.2.3 Для определения ферментативной активности целлюлазы используют следующие реактивы:

- кислоту уксусную ледяную по ГОСТ 61;
- натрий уксуснокислый трехводный по ГОСТ 199;
- калий-натрий виннокислый четырехводный по ГОСТ 5845;
- калий железосинеродистый по ГОСТ 4206;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- кислоту 3,5-динитросалициловую по действующим документам (ДНС);
- D-глюкозу по ГОСТ 6038;
- хроматографическую бумагу массой от 98 до 102 мг (Watman № 1).

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 по качеству не ниже указанных.

4.3 Подготовка к анализу

4.3.1 Для определения ферментативной активности целлюлазы приготавливают ацетатный буферный раствор молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ с pH 4,7.

4.3.1.1 Ацетатный буферный раствор готовят из растворов уксусной кислоты и уксуснокислого натрия молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ путем их смешивания.

4.3.1.2 Для приготовления раствора уксусной кислоты в мерную колбу на 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.

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

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

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

4.3.2 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 Для приготовления реактива динитросалициловой кислоты (ДНС) массовой доли 1,0 % в стакан вместимостью 1 $дм^3$ вносят 10,0 г ДНС и 400 $см^3$ дистиллированной воды. Перемешивают на магнитной мешалке в течение 25—30 мин при комнатной температуре. Затем постепенно, при постоянном перемешивании, добавляют 150 $см^3$ раствора гидроокиси натрия. 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, доводят объем до метки дистиллированной водой, при необходимости фильтруют через воронку со стеклянным фильтром.

Приготовленный реактив должен иметь ярко-желтое окрашивание (без красного оттенка).

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

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

4.3.4 Приготовление щелочного раствора калия железосинеродистого (гексацианоферрата)

6,01 г гидроксида натрия растворяют в 200 см^3 дистиллированной воды в мерной колбе на 1 дм^3, добавляют 0,6 г калия гексацианоферрата, растворяют и доводят объем до метки дистиллированной водой.

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

4.3.5 Приготовление стандартных растворов глюкозы при определении по методу с ДНС-реактивом

Для приготовления стандартных растворов глюкозы готовят основной стандартный раствор концентрации 5 мкмоль/см^3 (900 мкг/ см^3). Для этого навеску D-глюкозы (далее — глюкоза) массой 90 мг, взятую с точностью до 0,2 мг, вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в небольшом количестве буферного раствора (от 30 до 50 см^3), доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Из основного стандартного раствора глюкозы готовят серию разведений в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Объем стандартного раствора с молярной (массовой) концентрацией глюкозы 5 мкмоль/см^3 (900 мкг/см^3), см^3	Объем буферного раствора, см^3	Концентрация глюкозы в разведении	
		массовая, мкг/см^3	молярная, мкмоль/см^3
1	9	90	0,5
2	8	180	1,0
3	7	270	1,5
4	6	360	2,0
5	5	450	2,5
6	4	540	3,0
7	3	630	3,5
8	2	720	4,0
9	1	810	4,5
10	0	900	5,0

4.3.6 Приготовление стандартных растворов глюкозы при определении по методу с железосинеродистым калием

Для приготовления стандартных растворов глюкозы готовят основной стандартный раствор концентрации 1 мкмоль/см^3 (180 мкг/см^3). Для этого навеску безводной глюкозы массой 90 мг, взятую с точностью до 0,2 мг, вносят в мерную колбу вместимостью 500 см^3, растворяют в небольшом количестве буферного раствора (от 30 до 50 см^3), доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Из основного стандартного раствора глюкозы готовят серию разведений в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Объем стандартного раствора с молярной (массовой) концентрацией глюкозы 1 мкмоль/см^3 (180 мкг/см^3), см^3	Объем буферного раствора, см^3	Концентрация глюкозы в разведении	
		массовая, мкг/см^3	молярная, мкмоль/см^3
2	8	36	0,20
3	7	54	0,30
4	6	72	0,40
5	5	90	0,50
6	4	108	0,60
7	3	126	0,70
8	2	144	0,80

4.3.7 Стандартные растворы глюкозы готовят в день построения градуировочного графика из трех параллельных навесок.

4.3.8 Для построения градуировочного графика с реактивом ДНС в пробирки вносят по 1 см^3 стандартного раствора глюкозы, приготовленных по 4.3.5, различной концентрации, 1 см^3 дистиллированной воды, 3 см^3 реактива ДНС и быстро перемешивают. Одновременно готовят контрольную пробу на реактивы. Для этого к 1 см^3 дистиллированной воды добавляют 1 см^3 ацететного буферного раствора и 3 см^3 реактива ДНС.

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

По полученным данным строят градуировочный график оптической плотности (поглощения) как функции от концентрации глюкозы (мкмоль/см^3). По оси абсцисс откладывают молярные концентрации глюкозы мкмоль/см^3, по оси ординат — оптические плотности в единицах ОП. Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах оптической плотности от 0,15 до 0,65 ед. ОП.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют средне- арифметическое значение оптической плотности трех параллельных измерений.

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

4.3.9 Для построения градуировочного графика с железосинеродистым калием вносят в серию пробирок по 2 см^3 разведений стандартного раствора глюкозы, приготовленных по 4.3.6, и добавляют 6 см^3 раствора гексацианоферрата калия. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 10 мин, затем вынимают и охлаждают до комнатной температуры. Измеряют оптическую плотность окрашенных растворов при длине волны 400—440 нм и толщине поглощающего слоя 10 мм против дистиллированной воды.

На основании полученных результатов строят градуировочный график зависимости значений оптической плотности от концентрации глюкозы (мкмоль/ см^3). По оси абсцисс откладывают молярные концентрации глюкозы мкмоль/ см^3, по оси ординат — оптические плотности в единицах ОП. График имеет обратную линейную зависимость. Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,3 до 0,6 мкмоль/см^3 глюкозы, что соответствует поглощению в единицах оптической плотности от 0,50 до 0,65 ед. ОП.

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

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

4.3.10 Для приготовления раствора ферментного препарата отбирают образец 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.

4.3.10.1 Для приготовления основного раствора ферментного препарата берут его навеску 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, измельченные микрогранулы и др.) или 60 мин (корма, кормовые смеси). Суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$ 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.

4.3.10.2 Рабочий раствор готовят из основного раствора ферментного препарата путем его разведения в дистиллированной воде (например, в 10 раз) таким образом, чтобы при определении активности оптические плотности опытного и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика.

4.4 Проведение анализа

4.4.1 Анализ проводят в двух параллельных определениях.

4.4.2 В три пробирки (две опытные и одна контрольная) помещают по полоске бумаги для хроматографии массой 98—102 мг (размером 1,5 × 8,0 см), сложенной гармошкой, заливают 2 $см^3$ ацетатного буферного раствора и перемешивают. Пробирки закрывают пробками, помещают в ультратермостат с температурой (50 ± 1) °С и выдерживают в течение 10 мин.

4.4.3 В две опытные пробирки добавляют по 2 $см^3$ рабочего раствора ферментного препарата с той же температурой и перемешивают. Все три пробирки помещают в ультратермостат с температурой (50 ± 1) С и выдерживают в течение 60 мин.

4.4.4 При определении восстанавливающих сахаров по методу с ДНС-реактивом после проведения гидролиза из двух пробирок (опытные пробы) отбирают по 1 $см^3$ реакционной смеси в чистые пробирки. В третью пробирку (контрольную) вносят 2 $см^3$ рабочего раствора, перемешивают и сразу же отбирают 1 $см^3$ смеси в чистую пробирку.

Во все три пробирки (две опытные и одну контрольную) сразу же добавляют по 1 $см^3$ дистиллированной воды и 3 $см^3$ ДНС-реактива. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 5 мин (с точностью, определяемой по секундомеру), после чего охлаждают до комнатной температуры.

Оптические плотности измеряют в опытных и контрольной пробах на ФЭК или СФ при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм против контрольной пробы на реактивы по 4.3.7.

4.4.5 При определении восстанавливающих сахаров по методу с калием железосинеродистым после проведения гидролиза из двух пробирок (опытные пробы) отбирают по 2 $см^3$ реакционной смеси в чистые пробирки. В третью пробирку (контрольную) вносят 2 $см^3$ основного раствора препарата фермента, перемешивают и сразу же отбирают 2 $см^3$ смеси в чистую пробирку.

Во все три пробирки добавляют по 6 $см^3$ раствора калия гексацианоферрата. Пробирки закрывают пробками и кипятят в водяной бане ровно 10 мин (по секундомеру), после чего быстро охлаждают до комнатной температуры.

Измеряют оптическую плотность содержимого всех трех пробирок против дистиллированной воды при длине волны 400—420 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Показатели оптических плотностей в опытных и контрольной пробах должны соответствовать значениям от 0,50 до 0,65 ед. ОП. В случае, если ОП опытных проб меньше 0,50, то основной раствор дополнительно разводят, если больше 0,65 — берут меньшее разведение основного раствора. Обыкновенно опытные пробы в сравнении с контрольной имеют в 10 раз большее разведение.

4.5 Обработка результатов

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

4.5.2 Целлюлолитическую активность *ЦлА*, ед/г, в ферментном препарате при определении с ДНС-реактивом вычисляют по формуле

$$ЦлА = \frac{C_о - C_к}{tc}, \quad (1)$$

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

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

t — продолжительность гидролиза, ч (1 ч);

---

* В зависимости от предполагаемой активности.

c — массовая концентрация ферментного препарата в реакционной смеси, г/см^3, вычисляют по формуле

$$c = \frac{m}{VP2}, \quad (2)$$

где m — масса навески ферментного препарата, г;

V — объем разведения навески при приготовлении основного раствора по 4.3.6, см^3;

P — разведение основного раствора ферментного препарата для приготовления рабочего раствора по 4.3.9.2;

2 — разведение рабочего раствора в реакционной смеси.

4.5.3 Целлюлолитическую активность *ЦлА*, ед/г, при определении с феррицианидом калия вычисляют по формуле

$$ЦлА = \frac{C_о - \frac{C_к}{p}}{tc}, \quad (3)$$

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

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

p — коэффициент разведения рабочего раствора препарата по отношению к контрольному (основному) раствору;

t — продолжительность гидролиза, ч;

c — массовая концентрация ферментного препарата в реакционной смеси, г/см^3, по формуле (2).

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

4.6 Сходимость и воспроизводимость результатов

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

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

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).

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

$$|X_1 - X_2| \le R \cdot 0{,}01 \cdot \overline{X}, \quad (5)$$

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 Метод определения ферментативной активности целлюлазы с использованием натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы

5.1 Характеристика метода

5.1.1 Метод основан на количественном определении восстанавливающих сахаров, образующихся при действии ферментов целлюлолитического комплекса на натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ).

5.1.2 За единицу целлюлолитической активности (1 ед. КМЦлА) принято количество фермента, катализирующего гидролиз Na-КМЦ до образования 1 мкмоля восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу) за 1 мин при температуре 50 °С, значении pH 4,7 и продолжительности гидролиза 10 мин.

5.1.3 Содержание восстанавливающих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом с ДНС-реактивом и рассчитывают по градуировоч-

ному графику, построенному для глюкозы. Диапазон измерений контролируемого показателя 50—500 ед. КМЦлА.

5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы

5.2.1 Для определения ферментативной активности целлюлазы с использованием субстрата Na-КМЦ применяют средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы, которые указаны в 4.2.1—4.2.3, за исключением хроматографической бумаги, вместо которой применяют Na-КМЦ (содержание основного вещества не менее 96 %).

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

5.3 Подготовка к анализу

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

5.3.2 Приготовление раствора натрия гидроокиси с массовой долей 10,7 % осуществляют в соответствии с 4.3.2.

5.3.3 Приготовление реактива ДНС с массовой долей 1,0 % осуществляют в соответствии с 4.3.3.

5.3.4 Приготовление стандартного раствора глюкозы с молярной (массовой) концентрацией 5 мкмоль/см^3 (900 мкг/см^3) и серии разведений стандартного раствора осуществляют в соответствии с 4.3.5.

5.3.5 Градуировочный график соответствия концентраций глюкозы оптическим плотностям в реакции с ДНС-реактивом строят, как указано в 4.3.7.

5.3.6 Для приготовления субстрата, раствора Na-КМЦ массовой долей 1 %, в коническую колбу вместимостью 100 см^3 наливают около 70 см^3 буферного раствора, помещают ее на магнитную мешалку и при включенной мешалке вносят 1,0 г Na-КМЦ. Перемешивание продолжают не менее 40 минут при комнатной температуре до получения однородного коллоидного раствора. Далее субстрат переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки буферным раствором.

Субстрат готовят в день проведения анализа.

5.3.7 Приготовление основного и рабочего растворов ферментного препарата осуществляют в соответствии с 4.3.9.

5.4 Проведение анализа

5.4.1 Анализ проводят в двух параллельных определениях.

5.4.2 В три пробирки (две опытные и одну контрольную) вносят по 1 см^3 субстрата, закрывают их пробками и термостатируют при (50 ± 1) °С в течение 5 минут.

5.4.3 В две опытные пробирки вносят по 1 см^3 рабочего раствора ферментного препарата. Содержимое пробирок тщательно перемешивают.

5.4.4 Все три пробирки выдерживают при температуре (50 ± 1) °С в течение 10 минут (с точностью, определяемой по секундомеру).

5.4.5 После проведения гидролиза в две опытные пробирки вносят по 3 см^3 реактива ДНС. В третью пробирку (контрольную) добавляют 3 см^3 реактива ДНС и 1 см^3 рабочего раствора препарата. Смеси тщательно перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 5 мин (с точностью, определяемой по секундомеру), после чего охлаждают до комнатной температуры.

5.4.6 Измеряют оптические плотности опытных и контрольной проб на ФЭК или СФ при длине волны 540 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм против контрольной пробы на реактивы по 4.3.7.

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

5.5 Обработка результатов

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

5.5.2 Целлюлолитическую активность *КМЦлА*, ед/г, в ферментном препарате вычисляют по формуле

$$КМЦлА = \frac{C_о - C_к}{tc}, \quad (6)$$

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

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

t — продолжительность гидролиза, мин (10 мин);

c — массовая концентрация ферментного препарата в реакционной смеси, г/см^3, по формуле (2).

5.5.3 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 $\Delta = 0,01\,\delta \cdot \overline{X}$. Границы погрешности $\delta = \pm 7$ %.

5.6 Сходимость и воспроизводимость результатов

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

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

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).

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

$$|X_1 - X_2| \le R \cdot 0,01 \cdot \overline{X}, \qquad (8)$$

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.

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

Ключевые слова: препараты ферментные, ферментативная активность целлюлазы, методы определения с использованием хроматографической бумаги и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы

Редактор *Р.Г. Говердовская*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 14.07.2009. Подписано в печать 29.07.2009. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 148 экз. Зак. 442.

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