ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

ГОСТ 20264.4—89

Издание официальное

5 коп. БЗ 3—89/249

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 577.15.001.4 : 006.354 Группа С09

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

Методы определения амилолитической активности

ГОСТ 20264.4—89

Enzyme preparations. Methods for fhe determination of amylase activity

ОКСТУ 9291

Срок действия с 01.07.90
до 01.07.95

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты и устанавливает методы определения активности амилолитического комплекса ферментных препаратов микробного происхождения.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

Методы отбора проб — по ГОСТ 20264.0.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (АС)

2.1. Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

Амилолитическая активность характеризует способность амилолитических ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в 1 г препарата.

За единицу амилолитической активности (АС) принята способность фермента при определенных значениях температуры, pH и времени действия катализировать до декстринов различной молекулярной массы 1 г крахмала, что составляет 30% крахмала, введенного в реакцию.

2.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Издание официальное ★

Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1989

Весы лабораторные общего назначения не ниже 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Колориметр фотоэлектрический лабораторный (фотоэлектроколориметр) по ГОСТ 12083, обеспечивающий измерения в интервалах длин волн 434—450 нм и 630—670 нм с погрешностью ±1% абс. (по коэффициенту пропускания) или 0,01 *Д* (по оптической плотности) или спектрофотометр.

Прибор для измерения pH среды в диапазоне 0—14 с погрешностью измерения ±0,1 pH.

Термостат или ультратермостат, обеспечивающий температуру нагрева (30,0±0,2)°С.

Баня водяная.

Мешалка магнитная.

Термометры по ГОСТ 215 с пределами измерения 0—55°С и ценой деления шкалы не более 0,1°С.

Холодильник бытовой.

Стаканчики для взвешивания по ГОСТ 25336.

Стаканы вместимостью от 100 до 2000 см³ по ГОСТ 25336.

Колбы типа Кн вместимостью от 100 до 2000 см³ по ГОСТ 25336.

Колбы мерные наливные 1 или 2-го исполнения вместимостью 100, 200, 250 и 1000 см³ по ГОСТ 1770.

Воронки типа В по ГОСТ 25336.

Пипетки 1, 2 и 3-го исполнения вместимостью от 0,5 до 20 см³ и 100 см³ по ГОСТ 20292.

Пробирки П1—21—200, или П1—16—150, или П2—19—180, или П2—16—150(180) по ГОСТ 25336.

Бюретка типа I; 1, 2 или 3-го исполнения по ГОСТ 20292.

Эксикатор по ГОСТ 25336.

Секундомер по ГОСТ 5072.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Крахмал растворимый по ГОСТ 10163.

Ацетатный буферный раствор с pH 4,7, приготовленный по ГОСТ 4919.2.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный по ГОСТ 4172, раствор молярной концентрацией $^1/_{15}$ моль/дм³.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, раствор солярной концентрацией $^1/_{15}$ моль/дм³.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрацией вещества эквивалента 0,1 моль/дм³, приготовленный по ГОСТ 4919.2.

Йод по ГОСТ 4159.

Калий йодистый по ГОСТ 4232.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания:

1. Все реактивы должны быть квалификации ч., х. ч. или ч. д. а.

2. Допускается использование импортной посуды и приборов с метрологическими характеристиками и реактивов с квалификацией не ниже отечественных.

2.3. Подготовка к анализу

2.3.1. *Приготовление раствора крахмала с массовой долей 1% (субстрата)*

(1,00±0,01) г крахмала, взятого с учетом влажности, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 25 см³ воды и перемешивают. Затем добавляют в колбу еще 25 см³ воды, помещают колбу в кипящую водяную баню не менее чем на 10—15 мин, непрерывно перемешивая содержимое до полного растворения крахмала. После этого содержимое колбы охлаждают, добавляют 10 см³ ацетатного буферного раствора с pH 4,7 (для препаратов грибного происхождения), фосфатного буферного раствора с pH 6,0 (для препаратов бактериального происхождения) или фосфатного буферного раствора с pH 5,6 (для препаратов из дрожжевых микроорганизмов). Объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой и содержимое колбы перемешивают. Раствор должен быть прозрачным.

Раствор крахмала готовят в день проведения анализа.

2.3.2. *Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 5,6 и pH 6,0*

Смешивают растворы фосфорнокислого натрия и фосфорнокислого калия концентрацией $^1/_{15}$ моль/дм³ в соотношении 0,5 : 9,5 (для pH 5,6) и 1 : 9 (для pH 6,0).

Величину pH проверяют на приборе. В случае отклонения pH буфера от требуемого, соответствующими растворами доводят его до нормы.

2.3.3. *Приготовление основного раствора йода*

0,50 г йода и 5,00 г йодистого калия растворяют в бюксе с притертой крышкой в небольшом количестве воды.

Содержимое перемешивают на магнитной мешалке при плотно закрытой крышке бюксы.

Раствор после полного растворения йода переносят в мерную колбу с притертой крышкой вместимостью 200 см³ и объем доводят дистиллированной водой до метки.

Основной раствор йода хранят в течение 1 мес в склянке из темного стекла с притертой пробкой.

2.3.4. *Приготовление рабочего раствора йода*

2 см³ основного раствора йода разводят раствором соляной кислоты концентрацией 0,1 моль/дм³ при анализе препаратов грибного происхождения и концентрацией 0,5 моль/дм³ — препаратов бактериального происхождения с предполагаемой активностью больше 50 ед/см³ в мерной колбе вместимостью 100 см³.

Перед употреблением рабочего раствора проверяют его оптическую плотность в диапазоне длин волн 434—450 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Оптическая плотность рабочего раствора йода должна быть равна 0,220 (±0,01).

В случае отклонения ее от этого значения добавляют в раствор несколько капель соляной кислоты или основного раствора йода.

2.3.5. *Приготовление основного раствора очищенных ферментных препаратов*

0,1000—1,0000 г исследуемого препарата (в зависимости от предполагаемой активности) растворяют в небольшом количестве воды, при необходимости тщательно растирая стеклянной палочкой, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Препараты с нерастворимыми наполнителями фильтруют. Раствор хранят в течение суток при температуре от 2 до 6°С.

2.3.6. *Приготовление рабочего раствора очищенных ферментных препаратов*

Рабочий раствор готовят в соответствии с табл. 1 из основного раствора (для навески 0,1000 г), разбавляя его дистиллированной водой так, чтобы в 5 см³ рабочего раствора содержалась масса фермента, обеспечивающая в принятых условиях гидролиз крахмала от 20 до 60%.

Таблица 1

Амилолитическая активность (АС), ед/г, (предполагаемая)	Масса препарата в 5 см³ рабочего раствора (m_1), мг	Объем основного раствора, необходимый для вторичного разбавления, см³	Общий объем разбавленного раствора, см³
От 20 до 80 включ.	5,0	50,0	50,0
» 80 » 150 »	2,0	20,0	50,0
» 150 » 300 »	1,0	10,0	50,0
» 300 » 700 »	0,5	5,0	50,0
» 700 » 1200 »	0,25	10,0	200,0
» 1200 » 2500 »	0,125	5,0	200,0
» 2500 » 5000 »	0,05	2,0	200,0
Св. 5000	0,025	1,0	200,0

Примечание. Для анализа берут две параллельные навески препарата и из каждой делают одно разведение, которое анализируют не менее трех раз.

Рабочий раствор ферментного препарата готовят непосредственно перед определением.

2.3.7. *Приготовление основного раствора из воздушно-сухой культуры гриба*

5,00 г исследуемой воздушно-сухой культуры гриба, предварительно растертой в ступке, переносят в коническую колбу вместимостью 250 см³, обавляют 90 см³ дистиллированной воды и

10 см³ ацетатного буферного раствора с pH 4,7. Смесь выдерживают в течение 1 ч в термостате при температуре (30,0±0,2)°С, периодически перемешивая и затем фильтруют. Фильтрат используют в качестве основного раствора.

Фильтрат хранят в течение суток при температуре от 2 до 6°С.

2.3.8. *Приготовление рабочего раствора из воздушно-сухой культуры гриба*

Рабочий раствор готовят из основного раствора, разбавляя его дистиллированной водой, в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Амилолитическая активность (АС) культуры гриба, ед/г, (предполагаемая)	Масса культуры гриба в 5 см³ рабочего раствора (m_1), мг	Объем основного раствора, необходимый для вторичного разбавления, см³	Общий объем разбавленного раствора, см³
От 5 до 15 включ.	37,5	15	100
» 15 » 50 »	10,0	4	100
» 50 » 100 »	2,5	1	100
» 100 » 150 »	1,25	1	200
» 150 » 300 »	0,625	0,5	200

2.3.9. *Приготовление основного раствора из культуральной жидкости бактериального происхождения*

В мерную колбу вместимостью 100 см³ наливают 90 см³ дистиллированной воды и вносят 1 см³ испытуемой культуральной жидкости. Объем доводят до метки дистиллированной водой.

2.3.10. *Приготовление рабочего раствора из культуральной жидкости*

Рабочий раствор готовят из основного раствора, разбавляя его дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 100 см³ в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Амилолитическая активность (АС) культуральной жидкости, ед/см³, (предполагаемая)	Объем культуральной жидкости в 5 см³ рабочего раствора, см³	Объем основного раствора, необходимый для вторичного разбавления, см³
От 10 до 25 включ.	0,01	20,0
» 25 » 50 »	0,005	10,0
» 50 » 75 »	0,003—0,0035	6,0—7,0
» 75 » 100 »	0,0025	5,0
» 100 » 125 »	0,0020	4,0
» 125 » 150 »	0,0015	3,0
Св. 150	0,00125	2,5

Примечание. При анализе культур бактериального происхождения с предполагаемой активностью 50—150 ед/см³ берут разведение фермента, обеспечивающее гидролиз крахмала от 0,02 до 0,04 г.

2.4. Проведение анализа

Берут две пробирки, наливают в каждую по 10 см³ раствора крахмала (субстрата) и ставят в термостат или водяную баню с температурой (30±0,2)°С на 5—10 мин. Затем, не вынимая пробирок из термостата, наливают в первую 5 см³ дистиллированной воды (контрольная пробирка), во вторую — 5 см³ рабочего раствора анализируемого продукта (опытная). Смеси быстро перемешивают и выдерживают в термостате в течение 10 мин, используя секундомер.

Затем из каждой пробирки поочередно отбирают по 0,5 см³ раствора и переносят в колбы с предварительно налитыми 50 см³ рабочего раствора йода. Содержимое колб перемешивают.

Полученные растворы приобретают следующую окраску:

Контрольный раствор — синий цвет, опытный — фиолетовый различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала.

Через 5—10 мин после смешивания определяют оптическую плотность растворов фотоэлектрическим колориметром в диапазоне длин волн 630—670 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Контрольным раствором при колориметрировании является дистиллированная вода.

2.5. Обработка результатов

Массу прогидролизованного крахмала (m) в граммах вычисляют по формуле

$$m = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0{,}1, \qquad (1)$$

где D_1 — оптическая плотность контрольного раствора;

D_2 — оптическая плотность опытного раствора;

0,1 — масса крахмала, взятая для анализа, г.

Если масса прогидролизованного крахмала меньше 0,02 г или больше 0,06 г, то анализ повторяют, подбирая другое разведение.

Амилолитическую активность (АС) в ед/г для препаратов бактериального происхождения и в ед/см³ для культуральной жидкости вычисляют по формуле

$$AC = \frac{5{,}885m + 0{,}001671}{m_1} \cdot 1000. \qquad (2)$$

Амилолитическую активность (AC_1) в ед/г для препаратов грибного происхождения вычисляют по формуле

$$AC_1 = \frac{7{,}264m - 0{,}03766}{m_1} \cdot 1000, \qquad (3)$$

где m_1 — масса ферментного препарата, содержащаяся в 5 см³ рабочего раствора, мг;

5,885; 0,001671; 7,264; 0,03766 — коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости массы прогидролизованного крахмала от массы фермента, взятого для анализа в пересчете на 1 ч действия фермента.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов определения активностей, полученных при анализе двух параллельных навесок препарата, относительное допускаемое расхождение между которыми не должно превышать 5%. Результат округляют до первого десятичного знака.

Предел возможных значений относительной погрешности измерений при доверительной вероятности $P=0,95$ составляет 5%.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОАМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

3.1. Метод основан на определении глюкозы, образующейся при гидролизе растворимого крахмала ферментом глюкоамилазы.

Глюкоамилазная активность (ГлС) характеризует способность ферментного препарата катализировать расщепление растворимого крахмала до глюкозы и выражается числом единиц активности в грамме препарата.

За единицу глюкоамилазной активности принята способность фермента катализировать гидролиз растворимого крахмала при определенных условиях температуры и pH, высвобождая за 1 мин 1 мкмоль глюкозы.

3.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Аппаратура и материалы — по п. 2.2 со следующими дополнениями.

Колориметр фотоэлектрический лабораторный (фотоэлектроколориметр) по ГОСТ 12083, обеспечивающий измерения в интервале длин волн 390—415 нм с погрешностью ±1% абс. (по коэффициенту пропускания) или 0,01 Д (по оптической плотности) или спектрофотометр.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, раствор молярной концентрацией 1 моль/дм^3.

Калий железистосинеродистый по ГОСТ 4207.

Глюкоза по ГОСТ 6038.

Натрий уксуснокислый по ГОСТ 199.

Кислота уксусная по ГОСТ 61.

Крахмал растворимый по ГОСТ 10163.

Кислота бензойная по ГОСТ 10521.

Калий гидроокись по ГОСТ 24363, раствор молярной концентрацией 1 моль/дм^3.

Кальций хлористый.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962 или спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.

Глюкозооксидаза с ферментативной активностью 100000 ед/г.
Пероксидаза.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечание. Все реактивы должны быть квалификации ч.; х. ч. или ч. д. а.

3.3. Подготовка к анализу

3.3.1. Приготовление раствора крахмала с массовой долей 1% (субстрата) — по п. 2.3.1.

3.3.2. *Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 7,5 концентрацией 1 моль дм³*

Смешивают равные объемы растворов фосфорнокислого однозамещенного калия и гидроокиси калия концентрацией 1 моль/дм³.

Величину pH проверяют на приборе. В случае отклонения pH от требуемого составляющими растворами доводят его до нормы.

3.3.3. *Приготовление раствора железистосинеродистого калия с массовой долей 1% (раствора А)*

0,05 г железистосинеродистого калия количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и объем доводят дистиллированной водой до метки.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

3.3.4. *Приготовление раствора глюкозооксидазы (раствора Б)*

5,00 (6,00) мг глюкозооксидазы растворяют фосфатным буферным раствором с pH 7,5 в мерной колбе вместимостью 50 см³ и затем добавляют 2,0 мг пероксидазы. Объем доводят до метки фосфатным буферным раствором.

Если активность глюкозооксидазы отличается от требуемой (100000 ед/г), то навеску берут с таким расчетом, чтобы в 50 см³ раствора содержалось 500—600 ед активности.

3.3.5. *Приготовление рабочего раствора С*

Рабочий раствор *С* готовят смешиванием равных объемов растворов А и Б.

Полученный раствор хранят в темной склянке в холодильнике в течение 2—3 сут.

3.3.6. *Приготовление насыщенной бензойной кислоты*

2,70 г бензойной кислоты количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

3.3.7. *Приготовление стандартных растворов глюкозы*

Для приготовления стандартных растворов глюкозы пользуются перекристаллизованной из спирта безводной глюкозой, которую хранят в эксикаторе над хлористым кальцием.

100,00 мг глюкозы растворяют в 100 см³ насыщенного раствора бензойной кислоты. Из этого раствора отбирают поочередно 5, 10 и 15 см³ в мерной колбе вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки бензойной кислотой. Полученные растворы соответствуют содержанию 50, 100 и 150 мкг глюкозы в 1 см³.

Этими растворами пользуются для построения градуировочного графика.

3.3.8. *Приготовление основного и рабочего растворов очищенных ферментных препаратов*

Основной раствор очищенных ферментных препаратов готовят по п. 2.3.5.

Рабочий раствор готовят из основного раствора, разбавляя его дистиллированной водой в зависимости от предполагаемой активности препарата.

3.3.9. *Приготовление основного и рабочего растворов из воздушно-сухой культуры гриба*

1,00—5,00 г исследуемой воздушно-сухой культуры гриба (в зависимости от активности) предварительно растертой в ступке, переносят в коническую колбу вместимостью 250 см³, добавляют 100 см³ дистиллированной воды, смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч, периодически перемешивая, а затем фильтруют.

Основной раствор хранят в течение суток при температуре от 2 до 6°С.

Рабочий раствор готовят из основного, разбавляя его дистиллированной водой в зависимости от предполагаемой активности.

3.3.10. *Приготовление рабочего раствора из культуральной жидкости*

Отфильтрованную культуральную жидкость разбавляют дистиллированной водой в 1000 и более раз в зависимости от предполагаемой активности.

3.3.11. *Построение градуировочного графика*

В пробирки приливают по 1 см³ стандартных растворов глюкозы, добавляют по 3 см³ рабочего раствора С. В контрольную пробу (контроль на реактив С) вместо раствора глюкозы приливают 1 см³ дистиллированной воды. Оставляют пробирки на 45 мин при комнатной температуре для развития окраски. Затем измеряют интенсивность окраски раствора глюкозы в диапазоне длин волн 390—415 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм против контрольной пробы на реактив С.

По полученным значениям строится градуировочный график, имеющий линейную зависимость.

Рабочая зона градуировочного графика лежит в области 50—150 мкг.

Оптическая плотность раствора должна быть близка к значениям $0,1\pm0,01$; $0,2\pm0,01$; $0,3\pm0,01$.

Если оптическая плотность отличается от этих значений, то навеску глюкозооксидазы увеличивают,

3.4. Проведение анализа

Берут две параллельные навески анализируемого продукта и из каждой делают не менее двух разведений. Каждое разведение исследуемого раствора анализируют не менее двух раз.

В пробирку наливают 10 см³ раствора крахмала (субстрата) и ставят в термостат или водяную баню с температурой (30,0± ±0,2)°С на 5—10 мин. Затем приливают к содержимому пробирки 5 см³ раствора анализируемого продукта и инкубируют смесь в течение 10 мин при той же температуре.

Затем 1 см³ смеси переносят в другую пробирку, помещенную в кипящую водяную баню, выдерживают в течение 2 мин (для инактивации фермента) и охлаждают холодной водой. Затем к смеси добавляют 3 см³ раствора С, перемешивают и оставляют на 45 мин при комнатной температуре.

Одновременно готовят контрольную пробу. Для этого 5 см³ раствора анализируемого продукта выдерживают в кипящей водяной бане в течение 10 мин (для инактивации фермента). Затем раствор охлаждают и добавляют 10 см³ раствора крахмала.

Все последующие операции с контрольными пробами проводят так же, как и с опытными.

Кроме указанной контрольной пробы на инактивированный фермент ставят контрольную пробу на рабочий раствор С. Для этого к 3 см³ этого раствора приливают 1 см³ дистиллированной воды.

Интенсивность окраски определяют на фотоэлектроколориметре в диапазоне длин волн 390—415 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Если контрольные пробы на инактивированный фермент имеют заметную окраску, то необходимо исследуемый раствор проколориметрировать, взяв в качестве раствора сравнения рабочий раствор.

Значение оптической плотности должно лежать в пределах, соответствующих массе глюкозы от 50 до 150 мкг.

3.5. Обработка результатов

Глюкоамилазную активность (*ГлС*) в ед/г вычисляют по формуле

$$ГлС = \frac{m}{m_1 \cdot 180 \cdot 10}, \qquad (4)$$

где m — масса глюкозы, образовавшейся в 1 см³ гидролизата за счет действия фермента, найденная по калибровочному графику, мкг;

m_1 — масса фермента, содержащегося в 1 см³ гидролизата, взятая на определение, г;

10 — время гидролиза, мин;

180 — молекулярная масса глюкозы, г/мкмоль.

Примечание. Глюкоамилазная активность в ед/см³ вычисляют по формуле 4, только вместо массы фермента берется объем (V).

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов определения активностей, полученных при анализе двух параллельных навесок препарата, относительное допускаемое расхождение между которыми не должно превышать 5%. Результат округляют до первого десятичного знака.

Предел возможных значений относительной погрешности измерений глюкоамилазной активности при доверительной вероятности $P=0,95$ составляет 5%.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСАХАРИВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ (ОС)

4.1. Метод основан на гидролизе растворимого крахмала в пределах 25% глюкозидных связей исследуемым ферментом с последующим йодометрическим определением количества образовавшихся сахаров.

Осахаривающая активность характеризует способность амилолитических ферментов катализировать осахаривание крахмала до мальтозы или мальтозы в смеси с глюкозой.

За единицу осахаривающей активности принята способность фермента катализировать за 1 мин при определенных значениях температуры и pH расщепление 1 мкмоля гликозидных связей до восстанавливающих сахаров. Активность выражается в ед/г препарата.

4.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Аппаратура и материалы — по п. 2.2.

Крахмал растворимый по ГОСТ 10163.

Натрий уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 199, раствор молярной концентрацией вещества эквивалента 1 моль/дм³.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный по ГОСТ 4172, раствор молярной концентрацией $^1/_{15}$ моль/дм³.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, раствор молярной концентрацией $^1/_{15}$ моль/дм³.

Калий двухромовокислый по ГОСТ 4220.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрацией 1 моль/дм³.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, раствор молярной концентрацией вещества эквивалента 1 моль/дм³.

Калий йодистый по ГОСТ 4232.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363 или натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор молярной концентрацией вещества эквивалента 0,1 моль/дм³.

Натрий серноватистокислый (натрия тиосульфат) по ГОСТ 27068 или фиксанал.

Кислота серная по ГОСТ 4204 (плотность $\rho=1,850$ г/см³).

Йод по ГОСТ 4159.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечание. Все реактивы должны быть марки ч.; х. ч. или ч. д. а.

4.3. Подготовка к анализу

4.3.1. Приготовление раствора крахмала с массовой долей 1% (субстрата) — по п. 2.3.1.

4.3.2. *Приготовление раствора йода концентрацией 0,1 моль/дм³*

25,00 г йодистого калия растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 см³ в минимальном количестве дистиллированной воды и туда же вносят 12,70 г йода. После полного растворения йода объем раствора доводят дистиллированной водой до метки. Раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой. Титр не устанавливают, но проверяют по раствору гипосульфита. Концентрация приготовленного раствора йода должна быть не ниже 0,95—1,05 моль/дм³.

4.3.3. *Приготовление раствора серноватистокислого натрия (гипосульфита) концентрацией 0,1 моль/дм³*

25,00 г гипосульфита растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 см³ в небольшом количестве дистиллированной воды, не содержащей углекислоту. Содержимое перемешивают и объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой.

Приготовленный раствор хранят в склянке из темного стекла с сифоном и бюреткой с хлоркальциевой трубкой, заполненной натронной известью.

Титр устанавливают по двухромовокислому калию после выдерживания раствора гипосульфита в течение 15 сут.

4.3.4. *Приготовление раствора серной кислоты 1 : 4*

К четырем объемам дистиллированной воды приливают один объем серной кислоты.

4.3.5. Приготовление основного раствора очищенных ферментных препаратов — по п. 2.3.5.

4.3.6. *Приготовление основного раствора из воздушно-сухой культуры гриба*

5,00 г исследуемой воздушно-сухой культуры гриба, предварительно растертой в ступке, переносят в коническую колбу вместимостью 250 см³, приливают 100 см³ дистиллированной воды и настаивают 1 ч при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Через 1 ч раствор фильтруют и фильтрат используют для анализа.

Фильтрат хранят в течение суток при температуре от 2 до 6°С.

4.4. Проведение анализа

4.4.1. Берут две параллельные навески исследуемого продукта и из каждой делают не менее двух разведений. Каждое разведение анализируют не менее двух раз.

4.4.2. *Определение осахаривающей активности в очищенных препаратах и культуре гриба, полученных из Asp. oryzae*

В коническую колбу вместимостью 50 см³ наливают 20 см³ субстрата (раствора крахмала, приготовленного на буферном растворе с pH 4,7), колбу закрывают часовым стеклом и помещают в термостат или водяную баню с температурой (30,0±0,2)°С. Через 10 мин добавляют от 1 до 10 см³ ферментного раствора (в зависимости от предполагаемой активности) и содержимое тщательно перемешивают. Общий объем реакционной смеси должен быть 30 см³. Если на определение берут меньше 10 см³ ферментного раствора, то недостающий объем дополняют дистиллированной водой непосредственно перед добавлением ферментного раствора.

Через 10 мин после добавления ферментного раствора действие фермента приостанавливают добавлением 2 см³ раствора соляной кислоты. Затем содержимое колбы количественно переносят, смывая дистиллированной водой, в коническую колбу вместимостью 500 см³ приливают 20 см³ раствора йода и сразу же по каплям, при тщательном перемешивании, добавляют 60 см³ раствора гидроокиси натрия или калия.

Колбу закрывают и оставляют на 15 мин в защищенном от света месте. Через 15 мин в раствор добавляют 2 см³ серной кислоты и титруют выделившийся йод раствором гипосульфита в присутствии (в качестве индикатора) растворимого крахмала до исчезновения синего окрашивания. Раствор становится бесцветным.

Одновременно ставят контрольный опыт с теми же количествами всех реагентов, только ферментный раствор вводят после добавления 2 см³ раствора соляной кислоты (без выдержки в термостате).

Разность между результатами титрования контрольного и опытного растворов должна составлять 0,5—6 см³ раствора гипосульфита. Если разность меньше 0,5 см³ или больше 6 см³, то анализ повторяют с большим или меньшим количеством ферментного раствора.

4.4.3. *Определение осахаривающей активности в очищенных препаратах и в культуре гриба, полученный из Asp. awamori*

Все операции по определению осахаривающей активности проводят по п. 4.4.2 со следующим дополнением:

для прекращения ферментативной реакции добавляют 5 см³ раствора соляной кислоты. При тщательном перемешивании сначала добавляют 3 см³, затем 60 см³ раствора гидроокиси натрия (калия).

4.4.4. *Определение осахаривающей активности в очищенных препаратах и в культуре из Bac. subtilis*

Все операции по определению осахаривающей активности проводят по п. 4.4.2 со следующими дополнениями:

в качестве субстрата берут раствор крахмала, приготовленного на буферном растворе с pH 6,0;

после введения 20 см³ раствора йода добавляют 52,5 см³ раствора гидроокиси натрия или калия;

при пересчете найденных значений скорости реакции на начальную скорость (в пределах 4—25% гидролиза гликозидных связей крахмала) следует пользоваться градуировочным графиком, построенном на основании экспериментальных данных.

4.5. Обработка результатов

4.5.1. Осахаривающую активность (OC_1), ед/г в культуре гриба и в очищенных препаратах из Asp. oryzae вычисляют по формуле

$$OC_1 = \frac{e}{m_2 \cdot t}, \qquad (5)$$

где e — эквивалентная масса вещества, мкмоль, найденная по табл. 3;

m_2 — масса препарата, введенная в реакционную смесь, г;

t — время гидролиза, мин.

Эквивалентную массу вещества, в зависимости от разности титрования контрольного и опытного растворов ($K—O$), определяют по табл. 3.

Таблица 3

($K—O$), см³	l, мкмоль	($K—O$), см³	l, мкмоль	($K—O$), см³	l, мкмоль
0,1	5,0	2,1	118,9	4,1	273,8
0,2	10,0	2,2	125,5	4,2	283,2
0,3	15,0	2,3	132,1	4,3	292,8
0,4	20,2	2,4	138,9	4,4	302,7
0,5	25,5	2,5	145,8	4,5	312,8
0,6	30,8	2,6	152,8	4,6	323,1
0,7	36,2	2,7	159,9	4,7	333,6
0,8	41,6	2,8	167,1	4,8	344,4
0,9	47,0	2,9	174,5	4,9	355,5
1,0	52,6	3,0	181,9	5,0	366,9
1,1	58,2	3,1	189,5	5,1	378,6
1,2	63,9	3,2	197,2	5,2	390,6
1,3	69,7	3,3	205,1	5,3	402,9
1,4	75,5	3,4	213,1	5,4	415,6
1,5	81,5	3,5	221,3	5,5	428,8
1,6	87,6	3,6	229,6	5,6	442,3
1,7	93,6	3,7	238,1	5,7	456,2
1,8	99,8	3,8	246,8	5,8	470,6
1,9	106,1	3,9	255,6	5,9	485,0
2,0	112,5	4,0	264,6	6,0	501,2

4.5.2. Осахаривающую активность (OC_2), ед/г, в культуре гриба и в очищенных препаратах из Asp. awamori вычисляют по формуле

$$OC_2 = \frac{(K-O) \cdot 50}{m \cdot t}, \quad (6)$$

где $(K-O)$ — разность титрования контрольного и опытного растворов, см³;

50 — коэффициент пересчета на мкмоль гликозидных связей;

m_2 — масса ферментного препарата, введенная в реакционную смесь, г;

t — время гидролиза, мин.

4.5.3. Осахаривающую активность (OC_3), ед/г, в культуре и в очищенных препаратах из Bac. subtilis вычисляют по формуле

$$OC_3 = \frac{l}{m_2 \cdot t}, \quad (7)$$

где l — эквивалентная масса вещества, мкмоль, найденная по табл. 4;

m_2 — масса ферментного препарата, введенная в реакционную смесь, г;

t — время гидролиза, мин.

Эквивалентную массу вещества в зависимости от разности титрования контрольного и опытного растворов $(K-O)$ определяют по табл. 4.

Таблица 4

$(K-O)$, см³	l, мкмоль	$(K-O)$, см³	l, мкмсль
0,9	45,0	2,6	169,7
1,0	52,1	2,7	180,9
1,1	58,7	2,8	192,3
1,2	63,3	2,9	209,9
1,3	67,8	3,0	226,1
1,4	74,7	3,1	250,6
1,5	81,4	3,2	278,2
1,6	85,9	3,3	312,1
1,7	92,7	3,4	366,2
1,8	99,6	3,5	452,3
1,9	108,5	3,6	517,9
2,0	113,1	3,7	585,7
2,1	119,9	3,8	662,7
2,2	128,8	3,9	740,3
2,3	138,0	4,0	811,9
2,4	150,3	4,1	891,6
2,5	158,3	4,2	968,1

4.5.4. За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов определения активностей, полученных при анализе двух параллельных навесок препарата, относительное допускаемое расхождение между которыми не должно превышать 5%.

Результат округляют до первого десятичного знака.

Предел возможных значений относительной погрешности измерений при доверительной вероятности $P=0,95$ составляет 5%.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Министерством медицинской и микробиологической промышленности СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

А. Н. Саприн, д-р биол. наук, **А. В. Гарбузов**, канд. биол. наук, **В. М. Лаврухина.**

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 24.03.89 № 677

3. Срок первой проверки — 1994 г.
Периодичность проверки — 5 лет

4. ВЗАМЕН ГОСТ 20264.4—74

5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта
ГОСТ 61—75	3.2, 4.2
ГОСТ 199—78	3.2, 4.2
ГОСТ 1770—74	2.2
ГОСТ 3118—77	2.2, 4.2
ГОСТ 4159—79	2.2, 4.2
ГОСТ 4172—76	2.2, 4.2
ГОСТ 4198—75	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 4204—77	4.2
ГОСТ 4207—75	3.2
ГОСТ 4220—75	4.2
ГОСТ 4232—74	2.2, 4.2
ГОСТ 4328—77	4.2
ГОСТ 4919.2—77	2.2
ГОСТ 5072—79	2.2
ГОСТ 5962—67	3.2
ГОСТ 6038—79	3.2
ГОСТ 6709—72	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 10163—76	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 10521—78	3.2
ГОСТ 12026—76	2.2
ГОСТ 12083—78	2.2, 3.2
ГОСТ 18300—87	3.2
ГОСТ 20264.0—74	1
ГОСТ 20292—74	2.2
ГОСТ 24104—88	2.2
ГОСТ 24363—80	3.2, 4.2
ГОСТ 25336—82	2.2
ГОСТ 27068—86	4.2

Изменение № 1 ГОСТ 20264.4—89 Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности

Принято Межгосударственным Советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 12 от 21.11.97)

Зарегистрировано Техническим секретариатом МГС № 2737

За принятие изменения проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа стандартизации
Азербайджанская Республика	Азгосстандарт
Республика Армения	Армгосстандарт
Республика Белоруссия	Госстандарт Белоруссии
Грузия	Грузстандарт
Киргизская Республика	Киргизстандарт
Республика Молдова	Молдовастандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Республика Таджикистан	Таджикгосстандарт
Туркменистан	Главная государственная инспекция Туркменистана
Республика Узбекистан	Узгосстандарт
Украина	Госстандарт Украины

(Продолжение см. с. 52)

Пункт 2.2. Второй абзац. Заменить слова: «по ГОСТ 12083» на «по НД»;

седьмой абзац. Заменить слова: «по ГОСТ 215 с пределами измерения 0—55 °С» на «по ГОСТ 28498 диапазоном измерения 0—100 °С»;

четырнадцатый абзац изложить в новой редакции: «Пипетки 1—1—2—0,5; 1—1—2—1; 1—2—2—5; 1—2—2—10; 1—2—2—25 по ГОСТ 29227»;

шестнадцатый абзац изложить в новой редакции: «Бюретка 1—1—2—25 по ГОСТ 29251»;

восемнадцатый абзац. Заменить слова: ГОСТ 5072 на НД.

Раздел 3. Наименование изложить в новой редакции:

«3. Определение глюкоамилазной активности (ГлС) глюкозооксидазным методом (арбитражный метод)».

Стандарт дополнить разделом — 3а:

«3а. Определение глюкоамилазной активности (ГлСп) поляриметрическим методом

3а.1. Метод основан на определении глюкозы, образующейся при гидролизе мальтозы ферментом глюкоамилазой.

Глюкоамилазная активность характеризует способность ферментного препарата катализировать гидролиз мальтозы с образованием глюкозы и выражается числом единиц активности в грамме (или $см^3$) препарата.

(Продолжение см. с. 53)

За единицу активности глюкоамилазы принимается способность фермента катализировать при определенных значениях температуры и pH гидролиз 1 мкмоль мальтозы до глюкозы за 1 мин.

3а.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г, не ниже 2-го класса точности.

Сахариметр универсальный СУ-3, СУ-4, автоматический СП или автоматические поляриметры А1-ЕПО или А1-ЕПЛ.

Прибор для измерения pH среды в диапазоне 0—14 с погрешностью измерения ±0,1 pH.

Термостат или ультратермостат, обеспечивающий температуру нагрева (50±0,2) °С.

Термометры по ГОСТ 28498 диапазоном измерения 0—100 °С и ценой деления шкалы не более 0,1 °С.

Баня водяная.

Стаканчики для взвешивания по ГОСТ 25336.

Колбы типа Кн вместимостью от 100 до 1000 см³ по ГОСТ 25336.

Колбы мерные наливные 1-го или 2-го исполнения вместимостью 100, 200, 250 и 1000 см³ по ГОСТ 1770.

Воронки типа В по ГОСТ 25336.

Пипетки типа 2; 1-го и 2-го исполнения вместимостью от 1 до 25 см³ по ГОСТ 29227 или ГОСТ 29169.

Пробирки П1—21—200, или П1—16—150, или П2—19—180, или П2—16—150 по ГОСТ 25336.

Секундомер по НД.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Мальтоза перекристаллизованная для бактериологических целей по НД.

Раствор буферный ацетатный с pH 4,7, приготовленный по ГОСТ 4919.2.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации 5 моль/дм³.

Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174.

Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания:

1. Все реактивы должны быть квалификации ч., х. ч. или ч. д. а.

2. Допускается использование импортной посуды и приборов с метрологическими характеристиками и реактивов с квалификацией не ниже отечественных.

3а.3. Подготовка к анализу

3а.3.1. *Приготовление раствора мальтозы массовой долей 2 % (субстрат)*

(Продолжение см. с. 54)

20,00 г перекристаллизованной мальтозы, взятой с учетом влаги, растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 см³ в небольшом количестве воды, добавляют 100 см³ ацетатного буферного раствора, доводят до метки дистиллированной водой и фильтруют. Раствор мальтозы готовят не менее чем за сутки до его использования, чтобы в нем прошла мутаротация.

Хранят раствор при температуре 4—6 °С в течение 30 дней. Если при хранении раствор мальтозы помутнеет, пользоваться им не следует.

3а.3.2. *Приготовление раствора железистосинеродистого калия массовой долей 15 %*

17,65 г калия железистосинеродистого количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, перемешивают до полного растворения соли (в случае необходимости раствор подогревают) и доводят до метки дистиллированной водой.

3а.3.3. *Приготовление раствора сернокислого цинка массовой долей 30 %*

42,85 г сернокислого цинка количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, перемешивают до полного растворения соли (в случае необходимости раствор подогревают) и доводят до метки дистиллированной водой.

3а.3.4. *Приготовление раствора соляной кислоты концентрации 5 моль/дм³*

430 см³ соляной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, растворяют и доводят объем до метки дистиллированной водой.

3а.3.5. *Приготовление растворов ферментных препаратов*

3а.3.5.1. *Приготовление основного и рабочего растворов очищенных ферментных препаратов*

Основной раствор из очищенных ферментных препаратов готовят в соответствии с 2.3.5.

Рабочий раствор готовят из основного, разбавляя его дистиллированной водой в зависимости от предполагаемой активности.

3а.3.5.2. *Приготовление основного и рабочего растворов из воздушно-сухой культуры гриба*

Основной раствор из воздушно-сухой культуры гриба готовят в соответствии с 2.3.7.

Рабочий раствор готовят из основного, разбавляя его дистиллированной водой в зависимости от предполагаемой активности.

3а.3.5.3. *Приготовление раствора из культуральной жидкости*

Культуральную жидкость фильтруют через бумажный фильтр (или двойной полотняный мешок), возвращая первые порции обратно, добиваясь получения прозрачного раствора.

От 5 до 20 см³ прозрачного раствора культуральной жидкости помеща-

(Продолжение см. с. 55)

ют в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

3а.3.5.4. *Приготовление раствора из ультраконцентрата*

5 см³ прозрачного ультраконцентрата (после отбора пипетку снаружи отбирают фильтровальной бумагой) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 или 500 см³, частично заполненную водой. Объем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Все исследуемые растворы глюкоамилазы, приготовленные по 3а.3.5, должны обеспечивать разность угла вращения плоскости поляризации ($П_1$-$П_2$) в пределах от 0,5 ° до 2,5 ° нормальной сахарной шкалы.

Если эта разность ниже 0,5 ° или выше 2,5 °, то основной раствор разбавляют в ту или другую сторону.

3а.4. Проведение анализа

Берут две параллельные навески анализируемого продукта и из каждой делают не менее двух разведений. Каждое разведение исследуемого раствора анализируют не менее двух раз.

В две пробирки наливают по 25 см³ раствора мальтозы и ставят в термостат или ультратермостат, или водяную баню температурой (50±0,2) °С на 5—10 мин. Затем к содержимому пробирок приливают по 5 см³ раствора исследуемого ферментного препарата, быстро перемешивают и инкубируют смесь в течение 15 мин при этой же температуре. По истечении указанного времени в пробирки добавляют по 1 см³ раствора соляной кислоты (для прерывания ферментативной реакции) и охлаждают растворы до 20 °С.

Одновременно готовят контрольную пробу. Для этого к 25 см³ раствора мальтозы приливают сначала 1 см³ раствора соляной кислоты, затем 5 см³ исследуемого раствора ферментного препарата.

Если опытные и контрольные растворы получились мутными, их осветляют. Для этого приливают по 1 см³ осветлителей — раствора сернокислого цинка и железистосинеродистого калия.

Содержимое пробирок перемешивают и фильтруют. На сахариметре или автоматическом поляриметре измеряют угол вращения плоскости поляризации опытного и контрольного растворов, используя поляриметрическую трубку (кювету) длиной 200 мм. При использовании автоматического поляриметра показания прибора умножают на коэффициент перевода круговых градусов в градусы нормальной сахарной шкалы, равный 2,8885. Величина ΔП при измерении на сахариметре должна находиться в пределах от 0,2 до 2,5 °S; при измерении на автоматическом поляриметре — от 0,6 до 7 °S.

3а.5. Обработка результатов

Глюкоамилазную активность *ГлСп*, ед/г (или ед/см³), вычисляют по формуле

(Продолжение см. с. 56)

$$ГлСп = \frac{(П_1 - П_2) \cdot 0{,}00243 \cdot 31 \cdot 10^6}{m \cdot 15 \cdot 2 \cdot 180}, \qquad (4а)$$

где $П_1$ — угол вращения плоскости поляризации опытного раствора, °S;

$П_2$ — угол вращения плоскости поляризации контрольного раствора, °S;

0,00243 — массовая концентрация глюкозы, соответствующая 1°S, г/см^3;

31 — объем инкубационной смеси, см^3;

10^6 — коэффициент перевода г в мкг;

m — масса (объем) препарата в рабочем растворе, г (см^3);

15 — время гидролиза, мин;

2 — коэффициент, учитывающий образование из мальтозы двух молекул глюкозы;

180 — молярная масса глюкозы, мкг/мкмоль.

В случае применения осветления конечный результат, вычисленный по формуле (4а), умножают на коэффициент, учитывающий изменение объема инкубационной смеси на 2 см^3 за счет осветления, равный 1,06.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов определения активностей, полученных при анализе двух параллельных навесок. Результат округляют до второго десятичного знака. Расхождение между каждым измерением и средним арифметическим значением не должно превышать 5 % среднего значения при доверительной вероятности $P = 0{,}95$.

Перевод единиц активности, полученных поляриметрическим методом, в единицы стандартного глюкозооксидазного метода осуществляется в соответствии с приложением А.

Стандарт дополнить приложением — А:

«Приложение А
(справочное)

Перевод единиц активности в единицы глюкозооксидазного метода

Для перевода единиц активности, полученных поляриметрическим методом, в единицы глюкозооксидазного метода используется переводной коэффициент K, полученный экспериментальным путем.

1. Для препаратов, полученных при культивировании гриба Asp. awamori, выращенного глубинным способом, $K = 1{,}76 \pm 0{,}11$; выращенного поверхностным способом — $K = 1{,}51 \pm 0{,}11$.

При изменении условий культивирования продуцента глюкоамилазы

(Продолжение см. с. 57)

значение коэффициента следует уточнять. Для контрольных заводских условий уточнение коэффициента проводят путем сравнительного определения активности глюкоамилазы глюкозооксидазным и поляриметрическим методами.

Работу проводят на пяти пробах, полученных при разных ферментациях.

Переводной коэффициент K вычисляют по формуле

(Продолжение см. с. 58)

$$K = \frac{ГлС}{ГлСп}, \qquad (А.1)$$

где *ГлС* — глюкоамилазная активность, определенная глюкозооксидазным методом, ед/г;

ГлСп — глюкоамилазная активность, определенная поляриметрическим методом, ед/г».

(ИУС № 8 1998 г.)

Редактор *Т. И. Василенко*
Технический редактор *Л. А. Никитина*
Корректор *М. М. Герасименко*

Сдано в наб. 19.04.89 Подп. в печ. 08.06.89 1,25 усл. п. л. 1,25 усл. кр.-отт. 1,15 уч.-изд. л.
Тир. 8000 Цена 5 к.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП,
Новопресненский пер., д. 3.
Вильнюсская типография Издательства стандартов, ул. Даряус и Гирено, 39. Зак. 1237.
gost.e-ecolog.ru