УДК 577.15:543.06:006.354 Группа С09

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

Методы определения активности пектолитического комплекса

Enzyme preparations.
Methods for determination of pectolytic complex activity

ГОСТ 20264.3—81

Взамен ГОСТ 20264.3—74

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 15 апреля 1981 г. № 1973 срок действия установлен

с 01.07.82
до 01.07.87

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты микробного происхождения и устанавливает методы определения активности пектолитического комплекса.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Отбор проб — по ГОСТ 20264.0—74.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

Переиздание. Февраль 1985 г.

gost.e-ecolog.ru

2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕКТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (ПкС) (интерферометрический метод)

2.1. Сущность метода

Метод основан на определении пектолитических ферментов при каталитическом расщеплении пектина.

За единицу пектолитической активности должно быть принято количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г пектина до продуктов, не осаждаемых сернокислым цинком при проведении гидролиза в строго определенных условиях: температура 30 °С, время гидролиза 1 ч, величина pH реакционной среды 4,0; соотношение фермент-субстрат в реакционной среде, обеспечивающее гидролиз 30 %-ного пектина, взятого на реакцию.

Пектолитическую активность выражают числом указанных единиц в 1 г испытуемого препарата.

Количество продуктов гидролиза пектина, не осаждаемых сернокислым цинком, определяют на интерферометре.

2.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Весы лабораторные аналитические 3-го класса точности любой марки.

Весы технические 2—3-го класса точности.

Мешалка любой марки.

Интерферометр типа ИТР-2 или ЛИР-2.

Прибор для измерения pH среды любой марки.

Термометры ртутные стеклянные лабораторные по ГОСТ 215—73.

Стаканы и колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336—82.

Стаканчики для взвешивания (бюксы высотой 40—50 мм) по ГОСТ 25336—82.

Термостат водяной любой марки.

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336—82.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026—76.

Приборы мерные лабораторные стеклянные, бюретки, пипетки по ГОСТ 20292—74.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82.

Фильтры обеззоленные. Синяя лента.

Марля медицинская по ГОСТ 9412—77.

Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 35 % и содержанием основного вещества не менее 70 %.

Сахароза по ГОСТ 5833—75.

Цинк сернокислый по ГОСТ 4174—77, 15 %-ный раствор.

Аммиак водный по ГОСТ 3760—79.

Баня водяная.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Все реактивы должны быть х. ч. или ч. д. а.

2.3. Подготовка к анализу

2.3.1. *Приготовление основного ферментного раствора из очищенных порошкообразных препаратов*

0,1 г (или 1 г) исследуемого препарата взвешивают на аналитических весах с погрешностью не более 0,0001 г в стаканчике вместимостью 25—30 см³. Навеску тщательно растирают стеклянной палочкой с небольшим количеством дистиллированной воды. Затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ (500 см³), доводят водой до метки и перемешивают. С целью избежания адсорбции фермента на наполнителе необходимо процессы растворения и фильтрации проводить неразрывно: после растворения стандартизованных препаратов раствор сразу же фильтруют через беззольный фильтр. Из фильтрата отбирают определенное количество раствора в зависимости от активности препарата для проведения анализа в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Количество ед. активности в 1 г препарата (ед. ПкС)	Количество раствора, которое необходимо для вторичного разбавления, см³	Объем, до которого необходимо разбавить взятое количество раствора, см³	Количество препарата, содержащееся в 10 см³ ферментного раствора, взятое на анализ, г
2—5	Без разведения	Без разведения	0,02
5—10	20	50	0,008
10—20	10	50	0,004
20—40	5	50	0,002
40—100	2,5	50	0,001
100—200	2,5	100	0,0005
200—500	2,5	250	0,0002

2.3.2. *Приготовление основного ферментного раствора из поверхностной культуры гриба*

1 г измельченной воздушно-сухой культуры гриба взвешивают на технических весах, переносят в стакан вместимостью 250 см³, заливают 100 см³ дистиллированной воды и выдерживают в течение 1 ч при 30 °С при периодическом перемешивании. Полученный ферментный экстракт фильтруют через бумажный фильтр и из фильтрата, в зависимости от активности культуры, в соответствии с табл. 2 отбирают определенное количество в колбу вместимостью 50 см³ и доводят водой до метки. Содержимое перемешивают и используют для определения пектолитической активности.

2.3.3. *Приготовление 1 %-ного раствора пектина (субстрат)*

Навеску пектина, взятую с таким расчетом, чтобы в 250 см³ раствора было 2,5 г чистого пектина (см. обязательное приложение), тонкой струей всыпают при непрерывном перемешивании

на мешалке в коническую колбу вместимостью 300 см³, куда предварительно наливают около 130 см³ дистиллированной воды. Раствор перемешивают в течение 3 ч на мешалке при комнатной температуре. По истечении этого времени в раствор добавляют при перемешивании определенное количество концентрированного раствора аммиака для установления pH 4,0. Затем объем раствора доводят дистиллированной водой до 250 см³, тщательно перемешивают и фильтруют через два слоя марли.

Таблица 2

Количество условных единиц активности в 1 г культуры	Количество фильтрата вытяжки, взятое для разбавления, см³	Количество культуры, содержащееся в 10 см³ ферментного раствора, взятое на анализ, г
0,4—1,0	—	0,1
1,0—2,5	20	0,04
2,5—5,0	10	0,02
5,0—10	5	0,01
Св. 10	2,5	0,005

Раствор пектина готовят не менее чем за 4 ч до проведения анализа. Окраска раствора должна быть светло-серой

Раствор пектина можно использовать в течение 2—3 сут при условии хранения в холодильнике.

2.3.4. *Проверка интерферометра*

Интерферометр проверяют 0,25 %-ным раствором сахарозы В правую секцию кюветы интерферометра с длиной грани 4 см наливают дистиллированную воду, в левую — приготовленный раствор сахарозы.

Поправочный коэффициент (K) вычисляют по формуле

$$K = \frac{780}{X},$$

где 780 — показание прибора;

X — показание прибора при проверке 0,25 %-ным раствором сахарозы.

2.4. Проведение анализа

Для анализа берут несколько пробирок диаметром 2 см и высотой 18 см по количеству исследуемых проб. В каждую пробирку наливают по 20 см³ субстрата и ставят их в термостат с температурой (30±0,2) °С. В термостате пробирки выдерживают в течение 10 мин для того, чтобы растворы приняли постоянную температуру. Затем наливают в каждую по 10 см³ испытуемого ферментного раствора, предварительно подогретого до 30 °С, содержимое каждой пробирки тщательно перемешивают и оставляют в термостате при 30 °С на 1 ч для проведения гидролиза.

По истечении этого времени в пробирки с реакционной смесью добавляют по 2 см³ 15 %-ного раствора сернокислого цинка для инактивации фермента и осаждения продуктов гидролиза и вынимают из термостата.

Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивают путем встряхивания не менее 10 раз и фильтруют через фильтр.

Если фильтрат будет мутным, то его необходимо заново профильтровать через тот же фильтр до получения прозрачного раствора. Полученный раствор является исследуемым.

Одновременно готовят контрольный раствор. Для этого в пробирку наливают 2 см³ 15 %-ного раствора сернокислого цинка, 10 см³ исследуемого ферментного раствора и 20 см³ субстрата.

Измерение проводят на интерферометре. Для этого исследуемый раствор наливают в левое отделение кюветы интерферометра с длиной грани 4 см, а контрольный раствор в правое отделение и измеряют величину смещения интерференционных полос, возникающую вследствие различия показателей преломления контрольного и исследуемого растворов. Отсчет ведут по шкале барабана прибора.

Для обеспечения точности анализа необходимо разведение ферментных препаратов подбирать таким образом, чтобы получать показания прибора от 400 до 1250.

2.5. Обработка результатов

Пектолитическую активность (ПкС) в ед/г вычисляют по формуле

$$ПкС = \frac{0{,}06425 \cdot K \cdot n + 19{,}62}{m \cdot 1000},$$

где n — показание прибора для данного разведения;

m — количество ферментного препарата, содержащееся в 10 см³ ферментного раствора, взятого на определение, г;

0,06425, 19,62 и 1000 — постоянные коэффициенты, полученные при математической обработке экспериментальных данных по изучению зависимости между количеством образующихся продуктов гидролиза пектина в условиях метода и количеством единиц активности фермента, взятого на анализ;

K — поправочный коэффициент.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение активностей, полученных при анализе двух навесок. Из каждой навески делают не менее трех разведений. Допускаемое расхождение между значениями активностей не должно превышать 5 %.

Вычисление проводят до 0,1.

3. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКЗОПОЛИГАЛАКТУРОНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ (экзо-ПгС) ПО УВЕЛИЧЕНИЮ КОЛИЧЕСТВА ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ АЛЬДЕГИДНЫХ ГРУПП

3.1. Сущность метода

Метод основан на учете количества прогидролизированных связей по увеличению конечных альдегидных групп.

За единицу экзополигалактуроназной активности принято количество фермента, которое в условиях определения при 30 °С катализирует гидролиз 1 мкэкв. гликозидных связей в молекуле пектовой кислоты за 1 мин.

Экзополигалактуроназная активность выражается числом указанных единиц в 1 г препарата (или 1 $см^3$ раствора).

3.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Фотоэлектроколориметр любой марки.

Весы лабораторные аналитические 3-го класса точности любой марки.

Шкаф сушильный вакуумный любой марки.

Весы технические 2—3-го класса точности.

Термостат водяной любой марки.

Прибор для измерения pH среды любой марки.

Воронка Бюхнера.

Воронка стеклянная по ГОСТ 25336—82.

Баня водяная.

Вязь по ГОСТ 11680—76.

Марля медицинская по ГОСТ 9412—77.

Стаканы и колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336—82 вместимостью 100, 500, 1000 $см^3$.

Термометры ртутные стеклянные лабораторные по ГОСТ 215—73.

Эксикатор по ГОСТ 25336—82.

Приборы мерные лабораторные стеклянные. Бюретки, пипетки по ГОСТ 20292—74.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026—76.

Кислота пектовая.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300—72.

Калий йодистый по ГОСТ 4232—74.

Калий двухромовокислый по ГОСТ 4220—75.

Натрий серноватистокислый по СТ СЭВ 223—75, 0,05 н. раствор.

Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 35 % и содержанием основного вещества не менее 70 %.

Крахмал растворимый по ГОСТ 10163—76, 1 %-ный раствор.

Натрий углекислый по ГОСТ 83—79 1 М раствор.

Йод по ГОСТ 4159—79, 0,1 н. раствор.

Кислота серная по ГОСТ 4204—77, 2 М раствор.

Натрий гидроокись по ГОСТ 4328—77.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

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

3.3. Подготовка к анализу

3.3.1. *Приготовление пектовой кислоты (субстрат)*

30 г свекловичного пектина, взвешенного на технических весах, заливают 600 см³ дистиллированной воды для набухания и растворения, оставляют в холодильнике на ночь. Затем к раствору пектина прибавляют 300 см³ 0,5 н. раствора гидроокиси натрия для полного растворения пектина и снижения вязкости. Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через два слоя марли, между которыми проложен слой ваты, и к фильтрату прибавляют еще 300 см³ 0,5 н. раствора гидроокиси натрия.

Для омыления раствор оставляют на 1 ч в холодильнике. Затем осаждают пектовую кислоту прибавлением примерно 900 см³ 0,5 н. раствора соляной кислоты. Выпавшую пектовую кислоту сразу же отжимают через бязь, помещают в стакан, заливают 70 %-ным этиловым спиртом, тщательно перемешивают, растирая комки, и фильтруют на воронке Бюхнера через бязь. Промывают на воронке сначала 70 %-ным этиловым спиртом до отсутствия ионов хлора, а затем 50 см³ 96 %-ным этиловым спиртом.

Полученную кислоту сушат на воздухе, затем в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре.

Порошок отсеивают через сито с ячейками 0,25 мм (остаток на сите отбрасывают). Влажность продукта обычно 10—15 %.

3.3.2. *Приготовление 1 %-ного раствора пектовой кислоты*

Навеску пектовой кислоты, взятую с таким расчетом, чтобы в 100 см³ раствора был 1 г пектовой кислоты, взвешивают с погрешностью не более 0,0001 г, медленно всыпают при тщательном перемешивании в стакан с дистиллированной водой и из бюретки по каплям при перемешивании добавляют 1 н. раствор гидроокиси натрия для доведения раствора до pH 4,0.

Полученный раствор пектовой кислоты количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и фильтруют через два слоя марли на воронке Бюхнера. Раствор используют в день приготовления.

3.3.3. *Приготовление основного раствора ферментного препарата* — по пп. 2.3.1, 2.3.2 непосредственно перед применением.

3.4. Проведение анализа

3.4.1. 10 см³ 1 %-ного раствора пектовой кислоты вносят в колбу вместимостью по 100 см³ и помещают в термостат с температурой 30 °С (303 К).

Через 10 мин в колбу вводят по 5 см³ ферментного раствора соответствующего разведения, растворы тщательно перемешива-

ют, отмечают время и оставляют на 10, 20, 30 или 60 мин (в зависимости от ферментативной активности) для проведения гидролиза.

По истечении этого времени в эти же колбы добавляют по 1,8 см³ 1 М раствора углекислого натрия и по 10 см³ 0,1 н. раствора йода.

3.4.2. Для проведения анализа ферментных препаратов, величина активности которых неизвестна, необходимо взять 50 см³ раствора субстрата и от 1 до 25 см³ ферментного раствора (общий объем реакционной смеси 75 см³). Из этой реакционной смеси каждые 5—10 мин отбирают пробы по 15 см³ в колбы, куда предварительно налито 1,8 см³ 1 М раствора углекислого натрия.

3.4.3. Растворы тщательно перемешивают, закрывают стеклянными пробками и оставляют стоять 20 мин в защищенном от света месте. Затем вводят 2 см³ 2 М раствора серной кислоты, интенсивно перемешивают и оттитровывают избыток йода 0,05 н. раствором серноватистокислого натрия в присутствии крахмала, а результаты титрования выражают в см³ 0,1 н. раствора серноватистокислого натрия.

Одновременно ставят контрольный опыт с таким же количеством всех реагентов, только ферментный раствор вводят после добавления углекислого натрия непосредственно перед добавлением раствора йода.

Разность при титровании между контролем и опытом должна быть от 0,5 до 2,5 см³.

3.5. Обработка результатов

Экзополигалактуроназную активность (*экзо-ПгС*) в ед/г вычисляют по формуле

$$экзо\text{-}ПгС = \frac{51{,}3 \cdot a}{t \cdot к},$$

где 51,3 — число микроэквивалентов альдегидных групп, соответствующих 1 см³ 0,1 н. раствора йода (или гипосульфита);

a — количество 0,1 н. раствора йода, израсходованное на окисление образовавшихся при гидролизе альдегидных групп (находят по удвоенной разности титрований 0,05 н. раствором гипосульфита контрольной и опытной проб), см³;

t — время гидролиза, мин;

k — количество препарата в пробе, израсходованное на титрование, г.

Для обеспечения точности анализа необходимо разведение ферментных препаратов подбирать таким образом, чтобы гидролиз пектовой кислоты не превышал 20 %.

Гидролиз пектовой кислоты (A) в процентах вычисляют по формуле

$$A = \frac{9{,}03 \cdot a}{m} \cdot 100,$$

где a — количество 0,1 н. раствора йода, израсходованное на окисление образовавшихся при гидролизе альдегидных групп, см³;

9,03 — количество пектовой кислоты, соответствующее 1 см³ 0,1 н. раствора йода, мг;

m — количество пектовой кислоты в реакционной смеси, мг;

100 — коэффициент перевода в проценты.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение активностей, полученных при анализе двух навесок. Из каждой навески делают не менее трех разведений. Допускаемое расхождение между значениями активностей не должно превышать 5 %.

Вычисление ведут до 0,1.

4. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНДОПОЛИГАЛАКТУРОНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ (эндо-ПгС) (вискозиметрический метод)

4.1. Сущность метода

Метод основан на гидролизе пектина или пектовой кислоты исследуемым ферментным препаратом с последующим контролем степени расщепления по снижению вязкости.

Эндополигалактуроназная активность характеризует способность фермента снижать вязкость 1 %-ного раствора пектина

За единицу эндополигалактуроназной активности принято такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г пектина со снижением вязкости раствора на 30 % за 1 мин при 30 °С.

Эндополигалактуроназная активность выражается числом указанных единиц в 1 г ферментного препарата или 1 см³ ферментного раствора.

4.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Баня водяная.

Вискозиметр Оствальда с капилляром диаметром 0,8—1,0 мм.

Термостат водяной любой марки.

Секундомер.

Воронка Бюхнера.

Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не ниже 35 % с содержанием пектина не ниже 70 %.

Кислота пектовая.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026—76

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

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

4.3. Подготовка к анализу

4.3.1. Приготовление основного ферментного раствора по пп. 2.3.1; 2.3.2.

4.3.2. Приготовление 1 %-ного раствора пектина проводят по п. 2.3.3, 1 %-ного раствора пектовой кислоты по п. 3.3.2.

4.4. Проведение анализа

В сухой вискозиметр, погруженный в термостат с температурой 30 °С пипеткой вносят 10 см³ 1 %-ного раствора пектина или пектовой кислоты.

Через 5 мин вводят раствор фермента (от 1 до 5 см³). Общий объем реакционной смеси в вискозиметре всегда должен быть равен 15 см³, поэтому, если на определение берут меньше 5 см³ ферментного раствора, то непосредственно перед его добавлением вносят соответствующее количество дистиллированной воды. После введения фермента сразу по секундомеру отмечают время начала гидролиза и одновременно тщательно перемешивают содержимое вискозиметра воздухом при помощи груши, надетой на узкое колено вискозиметра. Через 2—3 мин (если использовался вискозиметр с диаметром 1,0 мм) или через 5 мин (если использовался вискозиметр с диаметром 0,8 мм) после введения фермента измеряют вязкость по времени истечения реакционной смеси.

Время отмечают вторым секундомером через каждые 2, 3, 5 мин, пока вязкость раствора не снизится на 30 % от исходной.

Время гидролиза не должно превышать 18 мин. Процент гидролиза пектина должен быть в пределах от 7 до 12. При отклонении от этой величины необходимо увеличить или уменьшить количество ферментного раствора.

Контрольное определение вязкости исходного раствора субстрата проводят аналогично опытному в том же вискозиметре, только без фермента с добавлением 5 см³ воды.

При анализе препаратов с низкой активностью контрольное определение следует проводить с ферментным раствором, инактивированным кипячением в водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч.

В большинстве случаев при анализе активных препаратов на определение берут разбавленные растворы, вязкость которых не отличается от вязкости воды.

4.5. Обработка результатов

Снижение вязкости пектина ($Б$) в процентах вычисляют по формуле

$$Б = \frac{t_к - t}{t_к - t_в} \cdot 100,$$

где $t_к$ — время истечения контрольного раствора пектина с водой или инактивированным ферментным раствором, с;

t — время истечения опытного раствора (после гидролиза), с;

$t_в$ — время истечения воды, с.

Снижение вязкости вычисляют для всех произведенных определений. Для получения более точных результатов и сокращения длительности анализа снижение вязкости после 3—5 мин гидролиза должно находиться от 10 до 15 %.

По полученным данным строят график, где на оси абсцисс откладывают время гидролиза (1 мин — 10 мм), которое вычисляют прибавлением к времени начала измерения половины времени истечения реакционной смеси, поскольку ферментативный гидролиз продолжается в процессе определения.

На оси ординат откладывают соответствующее этому времени снижение вязкости (1 % — 1 мм).

Полученные точки соединяют прямой и интерполированием находят время, за которое израсходованное на анализ количество препарата снизило вязкость на 30 % от исходной.

Если прямая пересекает ось ординат выше 10 мм, то анализ повторяют.

Найденную величину (t_{30}) используют для расчета активности (*эндо-ПгС*) ед/г по формуле

$$эндо\text{-}ПгС = \frac{100}{m \cdot t_{30}},$$

где 100 — количество пектина или пектовой кислоты во взятых на определение 10 мл 1 %-ного раствора субстрата, мг;

m — количество ферментного препарата, введенного в реакционную смесь, мг;

t_{30} — найденное интерполированием время гидролиза в минутах, за которое m мг ферментного препарата снизили вязкость раствора пектина на 30 %.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение активностей, полученных при анализе двух навесок. Из каждой навески делают не менее трех разведений. Допускаемое расхождение между значениями активностей не должно превышать 5 %.

Вычисления проводят до 0,1.

5. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕКТИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ (ПэС)

5.1. Сущность метода

Метод основан на гидролизе раствора пектина исследуемым ферментным препаратом с последующим определением освободившихся в результате гидролиза карбоксильных групп.

Пектинэстеразная активность характеризует способность фермента катализировать гидролиз сложноэфирных связей в молекуле пектина с образованием метилового спирта и свободных карбоксильных групп.

За единицу активности пектинэстеразы принято количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкэкв сложноэфирных связей в молекуле пектина за 1 мин при 30 °С.

Пектинэстеразную активность (*ПэС*) выражают числом указанных единиц в 1 г (или 1 см³) исследуемого препарата.

Определяемая величина пектинэстеразной активности находится в непосредственной зависимости от степени этерификации пектина.

Сравнимые результаты при работе с различными субстратами можно получить только при пересчете полученных данных на субстрат со 100 %-ной степенью метоксилирования.

5.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Мешалка любой марки.

Весы лабораторные аналитические 3-го класса точности любой марки.

Весы технические 2—3-го класса точности.

Прибор для измерения pH среды любой марки.

Термометры ртутные стеклянные лабораторные по ГОСТ 215—73.

Баня водяная.

Стекла часовые.

Воронка Бюхнера.

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336—82.

Марля медицинская по ГОСТ 9412—77.

Вата медицинская гигроскопичная по ГОСТ 5556—81.

Микробюретка.

Стаканы и колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336—82 вместимостью 100, 500 и 1000 см³.

Приборы мерные лабораторные стеклянные. Бюретки, пипетки по ГОСТ 20292—74.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026—76.

Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 80 % и содержанием пектина не менее 70 %.

Кислота серная по ГОСТ 4204—77.

Кислота щавелевая пб ГОСТ 22180—76.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, 0,1 н. раствор.

Фенолфталеин по ГОСТ 5850—72.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

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

5.3. Подготовка к анализу

5.3.1. *Приготовление 1 %-ного раствора пектина (субстрат)*

Навеску пектина, взятую с таким расчетом, чтобы в 100 см³ раствора был 1 г пектина (см. обязательное приложение), взвешивают с погрешностью не более 0,0001 г. Затем медленно всыпают при непрерывном перемешивании на мешалке в стакан с 70 см³ дистиллированной воды и оставляют на 2 ч при комнатной температуре для набухания и растворения, после чего помещают на ночь в холодильник.

На следующий день раствор нагревают до 20 °С, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через два слоя марли с ватой на воронке Бюхнера. Раствор можно использовать в течение 2 сут при условии его хранения в холодильнике.

5.3.2. *Приготовление основного раствора ферментного препарата из очищенных порошкообразных препаратов*

0,5 г исследуемого ферментного препарата взвешивают на аналитических весах с погрешностью не более 0,0001 г, тщательно растирают стеклянной палочкой в небольшом количестве дистиллированной воды, затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и объем раствора доводят до метки дистиллированной водой. Раствор фильтруют и используют в день приготовления.

5.3.3. *Приготовление основного раствора ферментного препарата из поверхностной культуры гриба*

5 г исследуемой культуры взвешивают на технических весах, помещают в колбу вместимостью 200—300 см³, приливают пипеткой 100 см³ дистиллированной воды и настаивают 1 ч при комнатной температуре, перемешивая через каждые 10 мин, затем раствор фильтруют через складчатый фильтр.

5.3.4. *Приготовление инактивированного ферментного раствора*

Для инактивации фермента, применяемого в контрольном опыте, берут 25 см³ основного ферментного раствора, помещают его в колбу вместимостью 50 см³, закрывают пробкой с воздушным холодильником и выдерживают в кипящей водяной бане 1 ч.

5.4. Проведение анализа

В стаканы вместимостью по 50 см³ помещают по 20 см³ 1 %-ного раствора пектина, накрывают часовым стеклом и ставят с промежутками в 15 мин в термостат при температуре 30 °С. Через 15 мин в два стакана прибавляют по 10 см³ ферментного раствора, а в другие по 10 см³ раствора инактивированного фермента.

Общий объем реакционной смеси всегда равен 30 см³. Если для анализа берут менее 10 см³ ферментного раствора, то недостающий объем дополняют дистиллированной водой, которую вводят перед добавлением ферментного раствора.

Через час после введения фермента пробу вынимают из термостата и быстро титруют из микробюретки 0,1 н. раствором гид-

роокиси натрия до pH 7,5, используя для этой цели потенциометр. Разность между контролем и опытом при титровании должна быть от 0,5 до 1,5.

5.5. *Обработка результатов*

Пектинэстеразную активность (*ПэС*) в ед/г вычисляют по формуле

$$ПэС=\frac{100\cdot a\cdot 100}{t\cdot m\cdot c},$$

где a — количество 0,1 н. раствора гидроокиси натрия, необходимое для титрования освободившихся в результате действия фермента карбоксильных групп (находят по разности между количеством гидроокиси натрия, израсходованным на титрование опытного и контрольного растворов), см^3;

100 — число микроэквивалентов прогидролизованных сложноэфирных связей, соответствующее 1 см^3 0,1 н. раствора гидроокиси натрия;

t — время гидролиза, мин;

m — количество ферментного препарата, взятое для испытания, г;

c — степень этерификации пектина, используемого в качестве субстрата;

100 — степень этерификации пектина, на которой ведется расчет.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение активностей, полученных при анализе двух навесок. Из каждой навески делают не менее трех разведений. Допускаемое расхождение между значениями активностей не должно превышать 5 %.

Вычисления проводят до 0,1.

ПРИЛОЖЕНИЕ
Обязательное

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕКТИНА
(кальцийпектатный метод)

1. Сущность метода

Метод основан на получении соли пектана кальция в виде осадка.

2. Аппаратура, материалы, реактивы

Шкаф сушильный электрический любой марки.
Весы аналитические 3-го класса точности любой марки.
Мешалка любой марки.
Комплект ареометров.
Посуда мерная лабораторная стеклянная по ГОСТ 1770—74.
Колбы мерные вместимостью 100, 500, 1000 см^3.
Стаканчики для взвешивания (бюксы высотой 40—50 мм) по ГОСТ 25336—82.
Термометры ртутные стеклянные лабораторные по ГОСТ 215—73.
Эксикатор по ГОСТ 25336—82.
Приборы мерные лабораторные стеклянные. Пипетки вместимостью 20 и 50 см^3 по ГОСТ 20292—74.
Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 30 % и содержанием основного вещества не менее 70 %.
Кальций хлористый по ГОСТ 4161—77, 2н. раствор.
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, 0,1 н. раствор.
Кислота уксусная по ГОСТ 61—75, 0,1 н. раствор.
Серебро азотнокислое по ГОСТ 1277—75.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.
Фильтры обеззоленные, синяя лента.
Все реактивы должны быть марки х. ч. или ч. д. а.

3. Проведение анализа

0,15 г исследуемого свекловичного пектина, взвешенного на аналитических весах с погрешностью не более 0,002 г, растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды при постоянном перемешивании на мешалке, затем количественно переносят в колбу вместимостью 100 см^3, доводят дистиллированной водой до метки и оставляют до получения однородного раствора.

Затем берут 20 см^3 этого раствора в колбу и к ним прибавляют 100 см^3 0,1 н. раствора гидроокиси натрия. Смесь для полного омыления пектина в пектовую кислоту оставляют на 7 ч (можно на ночь). Затем прибавляют 50 см^3 1 н. раствора уксусной кислоты, а через 5 мин 50 см^3 2 н. раствора хлористого кальция и оставляют на 1 ч.

После этого раствор кипятят 5 мин и фильтруют через обеззоленный фильтр, высушенный до постоянной массы. Осадок пектата кальция промывают горячей дистиллированной водой до исчезновения ионов хлора (реакция с 1 %-ным раствором азотнокислого серебра).

После промывки осадок с фильтра помещают в бюксу и высушивают при 105 °С до постоянной массы.

4. Обработка результатов

Количество пектина (B) в граммах, взятое на омыление, вычисляют по формуле

$$B = \frac{m \cdot V_2}{V_1},$$

где m — масса пектина, взятая для приготовления раствора, г;

V_1 — объем исходного раствора пектина, см^3;

V_2 — объем пектина, взятый на омыление, см^3.

По разности масс между фильтром и осадком и фильтром без осадка определяют содержание пектата кальция.

Массовую долю пектина ($П$) в процентах вычисляют по формуле

$$П = \frac{m \cdot 0{,}92 \cdot 100}{B},$$

где m — масса осадка пектата кальция, г;

B — количество пектина, взятого на омыление, г;

0,92 — пересчетный коэффициент, учитывающий содержание кальция в осадке;

100 — переводной коэффициент для выражения результатов, %.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение пектина, полученное при анализе трех навесок пектина, допускаемое расхождение между ними не должно превышать 5 %.

Вычисление проводят до 0,01.

Группа С09

Изменение № 1 ГОСТ 20264.3—81 Препараты ферментные. Методы определения активности пектолитического комплекса

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 14.01.87 № 31

Дата введения 01.07.87

Под наименованием стандарта проставить код: ОКСТУ 9291.

Раздел 1 дополнить пунктом — 1.2: «1.2. Все весовые определения производятся на лабораторных весах общего назначения по ГОСТ 24104—80 1 и 2-го классов точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г. Допускается применение других весов с аналогичными техническими и метрологическими характеристиками»

Пункт 2.2 изложить в новой редакции: «2.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Интерферометр типа ИТР-2 или ЛИР-2.

Мешалка любой марки.

Прибор для определения pH среды в интервале от 1 до 14 с погрешностью измерения не более 0,05 pH.

Ультратермостат типа ТС-16А с пределом измерений 40 °С и погрешностью 1 % или другой ультратермостат с аналогичными характеристиками.

Термометры 0—150 °С по ГОСТ 215—73 с ценой деления 1 °С.

Пробирки стеклянные диаметром 15—18 мм по ГОСТ 25336—82.

Стаканчики для взвешивания вместимостью 25—30 см³ по ГОСТ 25336—82.

Колбы мерные 2—50, 500—2 (наливные) по ГОСТ 1770—74.

Стаканы и колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336—82 вместимостью 250, 300, 500 см³.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026—76.

Фильтры обеззоленные. Синяя лента.

Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 35 % и содержанием основного вещества не менее 70 %.

Сахароза по ГОСТ 5833—75, раствор с массовой долей сахарозы 0,25 %.

Цинк сернокислый по ГОСТ 4174—77, раствор с массовой долей сернокислого цинка 15 %.

(Продолжение см. с. 266)

Аммиак водный по ГОСТ 3760—79.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

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

Пункт 2.3.1. Заменить слова: «0,1 г (или 1 г) исследуемого препарата взвешивают на аналитических весах» на «0,1000 г (или 1,0000 г) исследуемого препарата взвешивают».

Пункт 2.3.2. Заменить слова: «1 г измельченной воздушно-сухой культуры гриба взвешивают на технических весах» на «1,00 г измельченной воздушно-сухой культуры гриба взвешивают с погрешностью не более 0,01 г».

Пункт 2.3.3. Заменить слова: «Приготовление 1 %-ного раствора пектина (субстрат)» на «Приготовление раствора с массовой долей пектина 1 % (субстрат)»;

исключить слова: «Окраска раствора должна быть светло-серой».

Пункт 2.3.4. Исключить значение: 0,25 %-ным (2 раза).

Пункт 2.4. Исключить значение: 15 %-ного (2 раза).

Пункт 2.5. Экспликация к формуле. Заменить слова: «количество» на «масса», «Вычисление проводят до 0,1» на «Результат округляют до первого десятичного знака»;

дополнить абзацем: «Предел возможных значений погрешности измерений пектолитической активности при доверительной вероятности $P=0,95$ составляет 2,5 %».

Пункт 3.2 изложить в новой редакции: «3.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Шкаф сушильный вакуумный любой марки.

Ультратермостат типа ТС-16А с пределом измерений 40 °С и погрешностью 1 % или другой ультратермостат с аналогичными характеристиками.

Прибор для определения pH среды в интервале от 1 до 14 с погрешностью измерения не более 0,05 pH.

Воронка Бюхнера.

Стаканы и колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336—82 вместимостью 100, 500, 1000 $см^3$.

Термометры 0—150 °С по ГОСТ 215—73 с ценой деления 1 °С.

Бюретки любого исполнения, 2-го класса точности вместимостью 25 $см^3$ по ГОСТ 20292—74.

Пипетки 2—1—10 и 2—1—25 по ГОСТ 20292—74.

Вязь по ГОСТ 11680—76.

(Продолжение см. с. 267)

Марля медицинская по ГОСТ 9412—77.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026—76.

Сито из проволочной сетки № 025 по ГОСТ 6613—73.

Кислота пектовая.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300—72.

Натрий серноватистокислый по ГОСТ 27068—86.

Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 35 % и содержанием основного вещества не менее 70 %.

Крахмал растворимый по ГОСТ 10163—76, раствор с массовой долей крахмала 1 %.

Натрий углекислый по ГОСТ 83—79, раствор концентрацией 1 моль/дм^3.

Йод по ГОСТ 4159—79, раствор концентрацией 0,1 моль/дм^3.

Кислота серная по ГОСТ 4204—77, раствор концентрацией 2 моль/дм^3.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77.

Кислота соляная по ГОСТ 3118—77, раствор концентрацией 0,5 моль/дм^3.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

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

Пункт 3.3.1. Заменить слова: «30 г свекловичного пектина, взвешенного на технических весах» на «30,00 г свекловичного пектина, взвешенного с погрешностью не более 0,01 г», «0,5 н. раствора гидроокиси натрия» на «раствора гидроокиси натрия концентрацией 0,5 моль/дм^3 (0,5 н.)» (2 раза);

«0,5 н. раствора соляной кислоты» на «соляной кислоты».

Пункт 3.3.2. Заменить слова: «Приготовление 1 %-ного раствора пектовой кислоты» на «Приготовление раствора с массовой долей пектовой кислоты 1 %», «1 г пектовой кислоты» на «1,0000 г пектовой кислоты», «1 н. раствор гидроокиси натрия» на «раствор гидроокиси натрия концентрацией 1 моль/дм^3 (1 н.)».

Пункт 3.4.1. Заменить слова: «1 %-ного раствора пектовой кислоты» на «раствора с массовой долей пектовой кислоты 1 %»;

исключить значения: 1 М и 0,1 н.

Пункт 3.4.2. Исключить значение: 1 М.

Пункт 3.4.3. Исключить значение: 2 М; заменить слова: «0,05 н. раствором серноватистокислого натрия» на «раствора серноватистокислого натрия концентрацией 0,025 моль/дм^3 (0,05 н.)», «0,1 н. раствора серноватистокислого натрия» на «раствора серноватистокислого натрия концентрацией 0,05 моль/дм^3 (0,1 н.)».

Пункт 3.5. Экспликация к формулам. Исключить значения: 0,1 н. (4 раза);

заменить слова: «0,05 н. раствором гипосульфита» на «раствором серноватистокислого натрия концентрацией 0,025 моль/дм^3 (0,05 н.)», «Вычисление ведут до 0,1» на «Результат округляют до первого десятичного знака»;

дополнить абзацем: «Предел возможных значений погрешности измерений экзополигалактуроназной активности при доверительной вероятности $P=0{,}95$ составляет 5 %».

Раздел 4 исключить.

Пункт 5.2 изложить в новой редакции: «5.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Прибор для определения pH среды в интервале от 1 до 14 с погрешностью измерения не более 0,05 pH.

Мешалка любой марки.

Ультратермостат типа ТС-16А с пределом измерений 40 °С и погрешностью 1 % или другой ультратермостат с аналогичными характеристиками.

Воронка Бюхнера.

Стаканчики для взвешивания вместимостью 25—30 см^3 по ГОСТ 25336—82.

Стаканы и колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336—82 вместимостью 50, 200, 250, 300 см^3.

Колбы мерные 2—50, 100—2 (наливные) по ГОСТ 1770—74.

Пипетка 2—1—10, 20, 100 по ГОСТ 20292—74.

Микробюретка.

(Продолжение см. с. 268)

Марля медицинская по ГОСТ 9412—77.

Баня водяная.

Вата медицинская по ГОСТ 5556—81.

Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 80 % и содержанием пектина не менее 70 %.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, раствор концентрацией 0,1 моль/дм³ (0,1 н.).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

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

Пункт 5.3.1. Заменить слова: «Приготовление 1 %-ного раствора пектина (субстрат)» на «Приготовление раствора с массовой долей пектина 1 % (субстрат)», «1 г пектина» на «1,0000 г пектина».

Пункт 5.3.2. Заменить значение: 0,5 г на 0,5000 г.

Пункт 5.3.3. Заменить слова: «5 г исследуемой культуры взвешивают на технических весах» на «5,00 г измельченной культуры гриба, взвешенной с погрешностью не более 0,01 г».

Пункт 5.4. Исключить значения: 1 %-ного, 0,1 н.

Пункт 5.5. Экспликация к формуле. Исключить значение: 0,1 н.; заменить слова: «количество ферментного препарата» на «масса ферментного препарата», «Вычисление проводят до 0,1» на «Результат округляют до первого десятичного знака»;

дополнить абзацем: «Предел возможных значений погрешности измерений пектинэстеразной активности при доверительной вероятности $P=0,95$ составляет 5 %».

Приложение. Раздел 2 изложить в новой редакции:

«2. Аппаратура, материалы, реактивы

Шкаф сушильный любой марки, обеспечивающий нагрев до 105 °С.

Мешалка любой марки.

Эксикатор по ГОСТ 25336—82.

Колбы мерные 1—100—2 или 2—100—2 (наливные) по ГОСТ 1770—74.

Пипетка 2—1—20 по ГОСТ 20292—74.

Цилиндр любого исполнения вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770—74.

Стаканчики для взвешивания любого типа вместимостью 25—30 см³ по ГОСТ 25336—82.

Фильтры обеззоленные. Синяя лента.

Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 30 % и содержанием основного вещества не менее 70 %.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4323—77, раствор концентрацией 0,1 моль/дм³ (0,1 н.).

Кислота уксусная по ГОСТ 61—75, раствор концентрацией 0,1 моль/дм³ (1 н.).

Кальций хлористый по ГОСТ 4161—77, раствор концентрацией 1 моль/дм³ (2 н.).

Серебро азотнокислое по ГОСТ 1277—75, раствор с массовой долей серебра 1 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

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

Раздел 3. Заменить значение: 0,15 г на 0,150 г;

исключить значения: 0,1 н., 2 н., «1 %-ным».

Раздел 4. Заменить слова: «Вычисление проводят до 0,01» на «Результат округляют до второго десятичного знака».

(ИУС № 4 1987 г.)

gost.e-ecolog.ru