
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
55293—
2012

**ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ
ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**
Метод определения целлюлазной активности

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2014

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом пищевой биотехнологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии)

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1493-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске информационного указателя «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 (gost.ru)

© Стандартинформ, 2014

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

II

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ
ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
Метод определения целлюлазной активности**

Enzyme preparations.
Method of detection of cellulase activity

Дата введения — 2014—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты и ферментсодержащие смеси целлюлолитического действия, применяемые в пищевой промышленности и устанавливает метод определения целлюлазной активности.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ИСО 5725-1–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ Р ИСО 5725-2–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ Р 53228–2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 12.0.004–90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005–88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.2.007.0–75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009–83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021–75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 12.4.103–83 Система стандартов безопасности труда. Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация

ГОСТ 61–75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 83–79 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия

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

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603–79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3765–78 Реактивы. Аммоний молибденовокислый. Технические условия

Издание официальное

1

ГОСТ 4165–78 Реактивы. Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия
 ГОСТ 4166–76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия
 ГОСТ 4201–79 Реактивы. Натрий углекислый кислый. 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 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
 ГОСТ 13867–68 Продукты химические. Обозначение чистоты
 ГОСТ 14262–78 Кислота серная особой чистоты. Технические условия
 ГОСТ 18481–81 Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия
 ГОСТ 20264.0–74 Препараты ферментные. Правила приемки и методы отбора проб
 ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
 ГОСТ 28498–90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
 ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

П р и м е ч а н и е – 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 ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

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

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

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

3.4 натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы: Высокомолекулярное соединение, полимер, в котором остатки глюкозы соединены гликозидными связями; с водой образует коллоидные растворы.

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

П р и м е ч а н и е

Системные названия ферментов.

К ферментативному комплексу целлюлаз, участвующих в деструкции целлюлозы, относятся:

- 1,4-β-D-глюкан-4-глюканогидролазы (КФ 3.2.1.4) – эндоглюканаза. Катализирует расщепление β-1,4-связи целлюлозы с образованием целлоолигосахаридов, глюкозы и целлотриозов;

- β-D-глюкозидглюкогидролаза (КФ 3.2.1.24) – β-глюкозидаза. Катализирует отщепление концевых нередуцирующих остатков β-D-глюкозы с образованием молекулы глюкозы. Может гидролизовать также β-D-глюкозиды и целлобиозу;

- 1,4-β-D-глюканглюкогидролаза (КФ 3.2.1.74) – экзо-1,4-β-глюкозидаза. Гидролизует 1,4-связи в 1,4-β-D-глюканах с последовательным отщеплением глюкозных остатков;

- 1,4-β-D-глюканцеллобиогидролаза (КФ 3.2.1.91) – целлобиогидролаза. Отщепляет целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов.

4 Метод определения ферментативной активности целлюлазы с субстратом натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы

4.1 Сущность метода

4.1.1 Метод основан на количественном определении редуцирующих (восстанавливающих) сахаров, образующихся в результате действия фермента целлюлазы на субстрат натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) при температуре 50 °С.

4.1.2 За единицу целлюлазной активности (1 ед.ЦлС) принимают количество фермента, которое гидролизует КМЦ с высвобождением 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в глюкозном эквиваленте), образующихся за 1 мин при стандартных условиях (температура 50 °С и 5,0 ед. рН).

4.1.3 Содержание редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом, основанным на взаимодействии сахаров с реактивом Шомоди–Нельсона [2]. В результате этой реакции образуется соединение голубого или бирюзового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию редуцирующих сахаров, образовавшихся в процессе ферментативной реакции. Интенсивность окраски полученных растворов измеряют на фотозлектроколориметре или спектрофотометре при длине световой волны 610 нм; активность выражается в единицах целлюлазной способности (ед.ЦлС/г или ед.ЦлС/см³) анализируемого препарата.

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

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

Весы, обеспечивающие точность взвешивания с пределами допускаемой абсолютной погрешности $\pm 0,3$ мг по ГОСТ Р 53228.

Фотозлектроколориметр (КФК-3) или спектрофотометр (СФ) любого типа, которые обеспечивают измерения при длине световой волны 610 нм с погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 % (не более 0,01 единицы оптической плотности).

Холодильник бытовой.

рН-метр любого типа для измерения в диапазоне от 0 до 14 ед. рН с пределом допускаемой погрешности в эксплуатации $\pm 0,1$ ед. рН.

Мешалка магнитная, обеспечивающая скорость вращения до 800 мин⁻¹.

Ультратермостат или водяной термостат с точностью регулирования температуры ± 1 °С.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая скорость вращения не менее 7000 мин⁻¹.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры (100 ± 1) °С.

Секундомер с емкостью шкалы счетчика 1 мин, ценой деления 1 с и погрешностью $\pm 1,5$ с.

Пипетки автоматические вместимостью от 0,1 до 1,0 см³, 1,0 см³ и от 2 до 10,0 см³ с наконечниками.

Встряхиватель V-3 типа Вортекс или аналогичный для перемешивания жидкости со скоростью вращения от 50 до 3400 об/мин.

Термометры ртутные стеклянные лабораторные от 0 °С до 50 °С и от 0 °С до 100 °С с ценой деления 0,1 °С или 0,5 °С по ГОСТ 28498.

Ареометры общего назначения по ГОСТ 18481.

Стаканы и колбы стеклянные лабораторные В-1-150 ТС, В-1-800 ТС, Кн-1-100-14/23 ТС по ГОСТ 25336.

Стаканчики для взвешивания (бюксы) СВ-19/9 по ГОСТ 25336.

Воронки В-75-140 ХС по ГОСТ 25336.

Пробирки П1-14-120 ХС или П1-16-150 ХС по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 1-25-2, 1-50-2, 1-100-2, 1-200-2, 1-250-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770. Цилиндры 1-25-2, 1-50-2, 1-100-2, 1-250-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки стеклянные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5, 1-2-2-10 по ГОСТ 29227.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026

Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, массовая доля основного вещества не менее 98 %.

Натрий уксуснокислый по ГОСТ 199.

Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61.

Ацетон по ГОСТ 2603.

Натрий углекислый по ГОСТ 83.

Калий-натрий виннокислый 4-водный по ГОСТ 5845.

Медь сернокислая 5-водная по ГОСТ 4165.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201.

Аммоний молибденовокислый 4-водный по ГОСТ 3765.

Натрий сернокислый по ГОСТ 4166.

Кислота серная концентрированная для пробы Савая по ГОСТ 14262.

Натрий кислый мышьяковокислый, массовая доля основного вещества не менее 98 %.

D(+)-глюкоза по ГОСТ 6038.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.2.2 Все реактивы должны относиться к подгруппе чистоты 2 (х. ч.) или 3 (ч. д. а.) по ГОСТ 13867.

4.2.3 Допускается применение средств измерений, вспомогательного оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов по качеству не хуже вышеуказанных.

4.3 Подготовка к анализу

4.3.1 Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/дм³ и 5,0 ед. pH из растворов уксуснокислого натрия и уксусной кислоты

4.3.1.1 Приготовление раствора молярной концентрации с (CH₃COONa) = 0,1 моль/дм³ (раствор А)

В мерную колбу вместимостью 1 дм³ помещают (8,20 ± 0,01) г или (13,60 ± 0,01) г безводного уксуснокислого натрия CH₃COONa·3H₂O и растворяют приблизительно в 300 см³ дистиллированной воды. Затем раствор доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и перемешивают.

4.3.1.2 Приготовление раствора молярной концентрации с (CH₃COOH) = 0,1 моль/дм³ (раствор Б)

В мерную колбу вместимостью 1 дм³ вносят 5,72 см³ ледяной уксусной кислоты, разводят приблизительно 300 см³ дистиллированной воды. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и перемешивают.

4.3.1.3 Для приготовления ацетатного буферного раствора в колбе смешивают растворы уксуснокислого натрия (раствор А) и уксусной кислоты (раствор Б) в соотношении 2 : 1, создавая значение pH смеси, равное 5,0 ед. pH. При необходимости доводят кислотность раствора до 5,0 ед. pH одним из исходных растворов.

Срок хранения буферного раствора в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С – не более четырех недель.

4.3.2 Приготовление реактива Шомоди

4.3.2.1 Приготовление раствора В

(24,00 ± 0,01) г безводного углекислого натрия и (12,00 ± 0,01) г виннокислого калий-натрия 4-х-водного растворяют в стакане в 250 см³ дистиллированной воды. К этому раствору добавляют при перемешивании раствор сернокислой меди 5-ти-водной, для чего (4,00 ± 0,01) г CuSO₄·5H₂O растворяют в 40 см³ дистиллированной воды при температуре 20 °С. Затем в полученную смесь вносят (16,00 ± 0,01) г безводного кислого углекислого натрия и содержимое стакана вновь перемешивают. Получают раствор В.

4.3.2.2 Приготовление раствора Г

В другом стакане растворяют (18,00 ± 0,01) г безводного сернокислого натрия в 500 см³ горячей (~ 80 °С) дистиллированной воды и кипятят раствор на слабом огне 40 мин, после чего остужают. Получают раствор Г.

4.3.2.3 В мерной колбе вместимостью 1 дм³ смешивают приготовленные растворы В и Г, доводят объем смеси до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С.

Срок хранения реактива Шомоди в стеклянной темной посуде при температуре (20,0 ± 0,2) °С – не более 3 мес.

4.3.3 Приготовление реактива Нельсона

4.3.3.1 Приготовление раствора Д

(50,00 ± 0,01) г или (68,40 ± 0,01) г безводного молибденовокислого аммония 4-х-водного растворяют в стакане в 800 см³ горячей (~ 60 °С) дистиллированной воды. Раствор охлаждают до температуры 5 °С – 10 °С.

4.3.3.2 Приготовление раствора Е

В навеску концентрированной серной кислоты массой (42,00 ± 0,02) г вносят навеску безводного кислого мышьяковокислого натрия массой (6,00 ± 0,01) г (или 10 г Na₂HAsO₄·7H₂O).

4.3.3.3 Раствор Д переносят в мерную колбу вместимостью 1 дм³. К раствору Д при перемешивании осторожно добавляют раствор Е. Объем смеси доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С. Полученную смесь инкубируют в течение 48 ч при температуре 40 °С, после чего при наличии осадка фильтруют через стеклянный фильтр.

Срок хранения реактива Нельсона в темном месте при температуре (20,0 ± 0,2) °С – не более 3 мес.

4.3.4 Приготовление раствора КМЦ массовой долей 1,0 % (субстрат)

Субстратом является натриевая соль карбоксиметицеллюлозы (КМЦ). КМЦ с массовой долей 1,0 % готовят в ацетатном буфере (5,0 ед. рН) молярной концентрации 0,1 моль/дм³. В стакан вместимостью 100 см³ вносят 0,5 г КМЦ, добавляют 49,5 см³ ацетатного буферного раствора по 4.3.1 и непрерывно перемешивают в течение 1 ч на магнитной мешалке при комнатной температуре до полного растворения соли. Готовый раствор субстрата должен быть прозрачным.

Срок хранения раствора КМЦ в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С – не более 1 сут.

4.3.5 Приготовление градуировочных растворов глюкозы

4.3.5.1 Приготовление основного градуировочного раствора глюкозы с массовой долей 1 мг/см³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают (0,1000 ± 0,0002) г глюкозы, растворяют в небольшом количестве ацетатного буферного раствора кислотностью 5,0 ед. рН молярной концентрации 0,05 моль/дм³, получая его путем разведения ацетатного буферного раствора по 4.3.1 дистиллированной водой в соотношении 1 : 1. Раствор тщательно перемешивают и доводят объем до метки буферным раствором молярной концентрации 0,05 моль/дм³.

Срок хранения основного раствора глюкозы в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С – не более четырех недель.

4.3.5.2 Приготовление рабочих градуировочных растворов глюкозы

Из основного градуировочного раствора глюкозы по 4.3.5.1 готовят серию разведений в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Объем градуировочного раствора глюкозы массовой концентрации 1 мг/см ³ , см ³	Объем буферного раствора молярной концентрации 0,05 моль/дм ³ , см ³	Массовая доля глюкозы в рабочем растворе, мг/см ³
0,10	4,90	0,02
0,20	4,80	0,04
0,30	4,70	0,06
0,40	4,60	0,08
0,50	4,50	0,10

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

4.3.6 Построение градуировочного графика

В каждую из параллелей, состоящей из пяти пробирок (16 x 150 мм), вносят по 1 см³ рабочих градуировочных растворов глюкозы различных концентраций в соответствии с таблицей 1, добавляют в каждую пробирку по 1 см³ реактива Шомоди, приготовленного по 4.3.2, перемешивают и помещают пробирки в кипящую водяную баню на 20 мин.

Пробирки охлаждают в холодной воде, добавляют по 1 см³ реактива Нельсона, приготовленного по 4.3.3, содержимое перемешивают, выдерживают 10 мин и вносят по 7 см³ дистиллированной воды, доводя объем содержимого пробирки до 10 см³.

Одновременно готовят контрольную пробу на реактивы по 4.5.2. Оптические плотности растворов глюкозы измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине световой волны $\lambda = 610$ нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм в сравнении с контролем на реактивы.

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

По полученным среднеарифметическим значениям строят градуировочный график зависимости оптической плотности (поглощения) от массовой доли глюкозы (мг/см^3). Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,10 до 1,1 ед. оптической плотности.

На оси абсцисс X откладывают массовую долю глюкозы C в мг/см^3 ; на оси ординат Y – соответствующие значения оптической плотности D при $\lambda = 610$ нм. На рисунке приведен пример градуировочного графика. Величина, обратная тангенсу угла наклона калибровочной кривой, составляет, например, 0,098 ($1/\text{tg} = 0,098$), что является коэффициентом K , входящим в формулу расчета целлюлазной активности. Величина коэффициента может меняться в зависимости от приготовленных реактивов Шомоди и Нельсона. Таким образом, эта величина равна массовой доле глюкозы в рабочем растворе, отложенной на оси X , при оптической плотности на оси Y , равной 1,0.

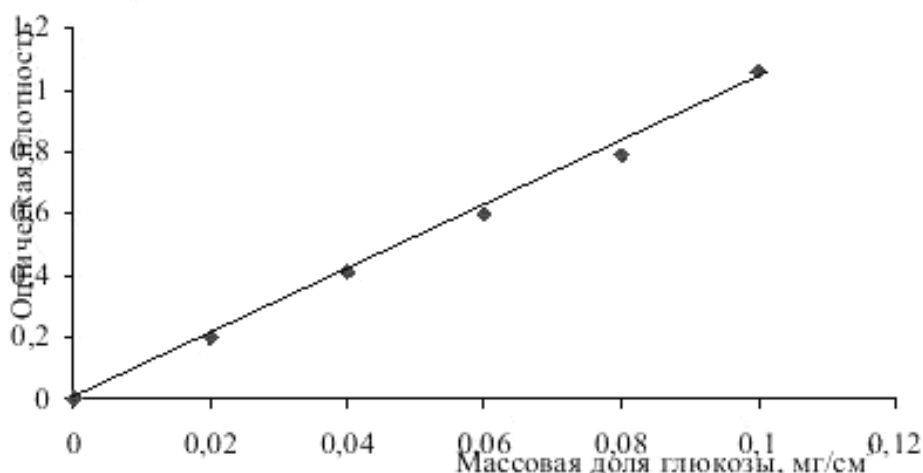


Рисунок – Пример градуировочного графика

Градуировочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов Шомоди и Нельсона, а также при замене прибора.

4.4 Подготовка пробы

4.4.1 Отбор проб – по ГОСТ 20264.0.

Анализируемые пробы ферментных препаратов в форме порошка или жидком виде можно использовать без предварительной подготовки.

4.4.2 Приготовление основного раствора анализируемой пробы ферментного препарата

В стаканчик для взвешивания помещают $(0,1000 \pm 0,0002)$ г сухой анализируемой пробы ферментного препарата или $(1,00 \pm 0,02)$ г жидкого ферментного препарата и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды. Суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 , доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20°C и тщательно перемешивают. Приготовленный раствор ферментного препарата является основным раствором анализируемой пробы.

Срок хранения основного раствора ферментного препарата при температуре 20°C – не более 1 ч.

4.4.3 Приготовление рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата

Рабочий раствор анализируемого ферментного препарата готовят из основного раствора по 4.4.2 путем дальнейшего разведения его дистиллированной водой таким образом, чтобы при определении активности оптические плотности опытного и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика по 4.3.6.

Количество фермента, взятого на анализ, должно быть рассчитано так, чтобы в реакционной смеси по 4.5.1.2 присутствовал избыток субстрата и чтобы измеряемые величины оптической плотности D_{610} по 4.5.1.5 при колориметрировании в кювете с толщиной поглощающего светового слоя 10 мм лежали в диапазоне значений 0,3 – 0,6 ед. оптической плотности.

При отклонении оптической плотности от указанных значений необходимо подобрать разведение препарата таким образом, чтобы оптическая плотность окрашенных растворов D_{ϕ} по 4.5.1.5 соответствовала указанным пределам диапазона.

Каждую пробу анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1 и ГОСТ Р ИСО 5725-2.

Раствор готовят в день определения. Длительность использования рабочего раствора ферментного препарата не должна превышать 1 ч с момента приготовления во избежание потерь его ферментативной активности.

4.5 Проведение анализа

4.5.1 Проведение ферментативной реакции

4.5.1.1 В две пробирки (16 x 150 мм) вносят по 0,5 см³ субстрата КМЦ по 4.3.4. Содержимое пробирок перемешивают и прогревают в ультратермостате с температурой $(50 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 5 мин.

4.5.1.2 В пробирки добавляют по 0,5 см³ рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата по 4.4.3, предварительно прогретого до температуры $(50 \pm 1) ^\circ\text{C}$, и тщательно перемешивают. Реакционную смесь инкубируют при температуре $(50 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 5 мин, ведя отсчет с момента начала ферментативной реакции.

4.5.1.3 По окончании реакции в пробирки вносят по 1 см³ реактива Шомоди по 4.3.2, тщательно перемешивают, закрывают стеклянными пробками, помещают в кипящую водяную баню на 20 мин.

4.5.1.4 Пробирки охлаждают в холодной воде, добавляют 1,0 см³ реактива Нельсона по 4.3.3 и выдерживают в течение 10 мин., периодически тщательно перемешивая. Полученные растворы приобретают синюю или бирюзовую окраску различной интенсивности. При образовании осадка или мути в пробирки добавляют по 1 см³ ацетона и перемешивают до полного их исчезновения. В этом случае ацетон добавляют в пробирки контрольного раствора на реактивы по 4.5.2 и раствора субстрата по 4.5.3.

4.5.1.5 Содержимое пробирок доводят до общего объема 10 см³ дистиллированной водой и измеряют оптическую плотность D_{ϕ} на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине световой волны 610 нм в кюветках с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм против контрольного раствора на реактивы по 4.5.2. Значение D_{ϕ} должно быть в диапазоне 0,3 – 0,6 ед. оптической плотности.

4.5.1.6 Если значение оптической плотности опытной пробы D_{ϕ} находится за пределами рабочей зоны градуировочного графика и не укладывается в диапазон ее значения, определение активности следует повторить с рабочим раствором анализируемой пробы, содержащей большее или меньшее количество фермента соответственно.

4.5.2 Определение оптической плотности контрольного раствора на реактивы

Измерения оптической плотности опытной пробы D_{ϕ} , раствора субстрата D_c и рабочего раствора фермента D_o осуществляют против кюветы с контрольным раствором на реактивы. Контрольный раствор на реактивы готовят, внося в пробирку 0,5 см³ ацетатного буферного раствора по 4.3.1, 0,5 см³ дистиллированной воды и 1 см³ реактива Шомоди по 4.3.2. Содержимое пробирки перемешивают и инкубируют в кипящей водяной бане 20 мин. Дальнейшие операции осуществляют аналогично 4.5.1.4 – 4.5.1.5.

4.5.3 Определение оптической плотности раствора субстрата

В пробирку вносят по 0,5 см³ субстрата КМЦ по 4.3.4, добавляют 0,5 см³ дистиллированной воды и 1 см³ реактива Шомоди по 4.3.2. Содержимое пробирки перемешивают и инкубируют в кипящей водяной бане 20 мин. Дальнейшие операции осуществляют аналогично 4.5.1.4 – 4.5.1.5. Показания оптической плотности раствора субстрата обозначают D_c .

4.5.4 Определение оптической плотности рабочего раствора фермента

В пробирку вносят 0,5 см³ ацетатного буфера по 4.3.1 и 0,5 см³ рабочего раствора фермента по 4.4.3, затем добавляют 1 см³ реактива Шомоди по 4.3.2. Содержимое пробирки инкубируют в кипящей водяной бане 20 мин. Дальнейшие операции осуществляют аналогично 4.5.1.4 – 4.5.1.5. Показания оптической плотности рабочего раствора фермента обозначают как D_o .

4.6 Обработка результатов

4.6.1 Целлюлазную способность (ЦлС) в анализируемой пробе в единицах ЦлС/г или единицах ЦлС/см³ вычисляют по формуле

$$\text{ЦлС} = K \cdot \Delta D \cdot n \cdot 2,22 \cdot d, \quad (1)$$

где K – коэффициент по 4.3.6;

$$\Delta D = D_{\Phi} - D_c - D_o,$$

D_{Φ} – оптическая плотность анализируемого раствора ферментного препарата;

D_c – оптическая плотность раствора субстрата;

D_o – оптическая плотность рабочего раствора фермента;

n – масса ферментного препарата, взятая на гидролиз (расчет ведется на 1 см³ рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата), г;

2,22 – коэффициент, учитывающий двукратное разбавление рабочего раствора ферментного препарата непосредственно в реакционной смеси, время проведения ферментативной реакции (5 мин) и молекулярный вес глюкозы (0,18016 мг/мкмоль), т. е. $2/5 \cdot 0,18016 = 2,22$;

d – плотность ферментного препарата (для жидких препаратов) по ГОСТ 18481, г/см³.

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

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

Результат определения при доверительной вероятности $P = 0,95$ представляют в виде

$$\bar{X} \pm \Delta,$$

где $\bar{X}$ – среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, признанных приемлемыми (см. 4.7.1), ед. ЦлС/г (ед. ЦлС/см³);

$\pm \Delta$ – значение границ абсолютной погрешности результатов измерений ед. ЦлС/г (ед. ЦлС/см³), вычисляемое по формуле

$$\pm \Delta = \bar{X} \cdot \delta \cdot 0,01 \text{ или } \pm \Delta = 0,07 \cdot \bar{X},$$

где δ – границы относительной погрешности результата анализа целлюлазной активности в анализируемой пробе при $P = 0,95$.

4.7 Сходимость и воспроизводимость результатов

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

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

где X_1 и X_2 – результаты двух параллельных определений, полученные в условиях повторяемости при $P=0,95$, ед. ЦлС/г или ед. ЦлС/см³;

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

r – предел повторяемости (сходимости), равный 7 %;

X – среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, ед. ЦлС/г или ЦлС/см³ анализируемого препарата.

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

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

где X_3 и X_4 – окончательные результаты определений, полученные в условиях повторяемости в двух лабораториях в точном соответствии с методикой, ед. ЦлС/г или ед. ЦлС/см³ анализируемого препарата;

X – среднеарифметическое значение двух окончательных результатов, измерений полученных в условиях повторяемости, ед. ЦлС/г или ед. ЦлС/см³ анализируемого препарата;

100 – коэффициент для пересчета в проценты;

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

5 Условия измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:

температура окружающего воздуха $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
 относительная влажность воздуха $(60 \pm 20) \%$;
 атмосферное давление $(84,0 \div 106,7) \text{ кПа}$;
 напряжение в сети $(220 \pm 10) \text{ В}$.

6 Требования безопасности

6.1 Условия безопасности проведения работ

При выполнении анализов необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007 и ГОСТ 12.4.103.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть оснащено приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021.

Электробезопасность при работе с электроустановками – по ГОСТ 12.2.007.0 и по ГОСТ Р 12.1.019.

Организация обучения работающих безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

6.2 Требования к квалификации операторов

К проведению анализов допускаются лица, имеющие квалификацию не ниже среднего технического образования, владеющие навыками работы в лаборатории, проведения анализов и изучившие инструкции по эксплуатации используемой аппаратуры.

Библиография

- [1] Enzyme Nomenclature, recommendations of the nomenclature Committee of the IUB // N.Y., Academic Press – 1984
[2] Польшалина Г.В., Чердниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов: Справочник. М.: ДеЛи принт, 2003, 372 с.

УДК 577.15:543.06:006.354

ОКС 07.100.30

ОКСТУ 9291

Ключевые слова: ферментные препараты, целлюлазная активность, метод определения с использованием субстрата КМЦ, гидролиз КМЦ при 50 °С, индикация образующихся редуцирующих сахаров с реактивом Шомоди–Нельсона

Подписано в печать 01.07.2014. Формат 60х84¹/₈.

Усл. печ. л. 1,40. Тираж 98 экз. Зак. 2544.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru