

Изменение № 1 ГОСТ 20264.4—89 Препараты ферментные. Методы определения амилалитической 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) поляриметричес-  
ким методом**

3а.1. Метод основан на определении глюкозы, образующейся при гид-  
ролизе мальтозы ферментом глюкоамилазой.

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

*(Продолжение см. с. 53)*

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

**За.2. А п п а р а т у р а , м а т е р и а л ы , р е а к т и в ы**

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 рН среды в диапазоне 0—14 с погрешностью измерения  $\pm 0,1$  рН.

Термостат или ультратермостат, обеспечивающий температуру нагрева ( $50 \pm 0,2$ ) °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 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336.

Колбы мерные наливные 1-го или 2-го исполнения вместимостью 100, 200, 250 и 1000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770.

Воронки типа В по ГОСТ 25336.

Пипетки типа 2; 1-го и 2-го исполнения вместимостью от 1 до 25 см<sup>3</sup> 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 рН 4,7, приготовленный по ГОСТ 4919.2.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации 5 моль/дм<sup>3</sup>.

Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174.

Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

**П р и м е ч а н и я :**

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.

**За.3. Подготовка к анализу**

**За.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 см<sup>3</sup> в небольшом количестве воды, добавляют 100 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup>, 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 см<sup>3</sup>, 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/дм<sup>3</sup>*

430 см<sup>3</sup> соляной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>, 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, добывая получения прозрачного раствора.

От 5 до 20 см<sup>3</sup> прозрачного раствора культуральной жидкости помеща-

(Продолжение см. с. 55)

ют в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят до метки дистиллированной водой.

#### За.3.5.4. Приготовление раствора из ультраконцентрата

5 см<sup>3</sup> прозрачного ультраконцентрата (после отбора пипетку снаружи отбирают фильтровальной бумагой) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 или 500 см<sup>3</sup>, частично заполненную водой. Объем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Все исследуемые растворы глюкоамилазы, приготовленные по За.3.5, должны обеспечивать разность угла вращения плоскости поляризации ( $P_1 - P_2$ ) 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.

#### За.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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты (для прерывания ферментативной реакции) и охлаждают растворы до 20°С.

Одновременно готовят контрольную пробу. Для этого к 25 см<sup>3</sup> раствора мальтозы приливают сначала 1 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты, затем 5 см<sup>3</sup> исследуемого раствора ферментного препарата.

Если опытные и контрольные растворы получились мутными, их осветляют. Для этого приливают по 1 см<sup>3</sup> 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 ΔP 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.

#### За.5. Обработка результатов

Глюкоамилазную активность  $GлСп$ , ед/г (или ед/см<sup>3</sup>), вычисляют по формуле

(Продолжение см. с. 56)

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

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<sup>3</sup>;  
31 — объем инкубационной смеси, см<sup>3</sup>;  
10<sup>6</sup> — коэффициент перевода г в мкг;  
 $m$  — масса (объем) препарата в рабочем растворе, г (см<sup>3</sup>);  
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<sup>3</sup> 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)

*(Продолжение изменения № 1 к ГОСТ 20264.4–89)*

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)*

$$K = \frac{ГлС}{ГлСп}, \quad (A.1)$$

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

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

(ИУС № 8 1998 г.)