

НИФТР и СТ КЫРГЫЗСТАНДАРТ

**РАБОЧИЙ  
ЭКЗЕМПЛЯР**

## ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

**ГОСТ  
20264.3—81**Методы определения активности  
пектолитического комплексаВзамен  
ГОСТ 20264.3—74Enzyme preparations.  
Methods for determination of pectolytic complex activity

---

**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

*90 01.04.92  
СЧЗ 4-87*

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.*

## 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 серноокислым цинком при проведении гидролиза в строго определенных условиях: температура 30 °С, время гидролиза 1 ч, величина рН 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 серноокислым 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 рН 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 свеколовичный со степенью метоксилирования не менее 35 % и содержанием основного вещества не менее 70 %.

Сахароза по ГОСТ 5833—75.

Цинк серноокислый 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 см<sup>3</sup>. Навеску тщательно растирают стеклянной палочкой с небольшим количеством дистиллированной воды. Затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> (500 см<sup>3</sup>), 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, см <sup>3</sup>	Объем, до которого необходимо разбавить взятое количество раствора, см <sup>3</sup>	Количество препарата, содержащееся в 10 см <sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup>, заливают 100 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> раствора было 2,5 г чистого пектина (см. обязательное приложение), тонкой струей всыпают при непрерывном перемешивании

на мешалке в коническую колбу вместимостью 300 см<sup>3</sup>, куда предварительно наливают около 130 см<sup>3</sup> 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 рН 4,0. Затем объем раствора доводят дистиллированной водой до 250 см<sup>3</sup>, тщательно перемешивают и фильтруют через два слоя марли.

Таблица 2

Количество условных единиц активности в 1 г культуры	Количество фильтрата вытязки, взятое для разбавления, см <sup>3</sup>	Количество культуры, содержащееся в 10 см <sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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.