
**Молоко и молочные продукты.
Микробные коагулянты. Определение
общей молокосвертывающей
активности**

*Milk and milk products — Microbial coagulants — Determination of total
milk-clotting activity*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 15174:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочные номера
ISO 15174:2012(R)
IDF 176:2012(R)

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.itech.ai)

ISO 15174:2012

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO и IDF 2012

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без письменного согласия ISO или IDF, полученного по адресу, приведенному ниже.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

International Dairy Federation
Silver Building • Boulevard Auguste Reyers 70/B • B-1030 Brussels
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
Предисловие	v
Введение	vi
1 Область применения	1
2 Принцип	1
3 Реактивы и материалы.....	1
4 Аппаратура.....	2
5 Отбор проб.....	3
6 Приготовление пробы для испытания.....	3
6.1 Жидкий микробный коагулянт.....	3
6.2 Порошкообразный микробный коагулянт.....	4
7 Методика	4
7.1 Приготовление субстрата	4
7.2 Приготовление раствора эталона микробного коагулянта	4
7.3 Приготовление испытуемого раствора микробного коагулянта	5
7.4 Свертывание	5
8 Расчет и выражение результатов	5
8.1 Расчет	5
8.2 Выражение результатов	6
9 Прецизионность	6
9.1 Межлабораторное испытание	6
9.2 Повторяемость	7
9.3 Воспроизводимость	7
10 Протокол испытания.....	7
Приложение А (информативное) Межлабораторное испытание	8
Библиография.....	9

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член ISO, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO непосредственно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам электротехнической стандартизации.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. ISO не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 15174|IDF 176 разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной федерацией по молочному животноводству (IDF). Этот стандарт должен быть опубликован совместно ISO и IDF.

Настоящее второе издание ISO 15174|IDF 176 отменяет и заменяет первое издание (ISO 15174|IDF 176:2002), которое было подвергнуто техническому пересмотру.

Предисловие

Международная федерация по молочному животноводству (IDF) является некоммерческой организацией, представляющей всемирное молочное животноводство. Членами IDF являются Национальные комитеты каждой страны-члена, а также региональные ассоциации по молочному животноводству, которые имеют подписанное официальное соглашение о совместной деятельности с IDF. Каждый член IDF имеет право быть представленным в Постоянных комитетах IDF, осуществляющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO по вопросам разработки стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Основная задача Постоянных комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые Постоянными комитетами, рассылаются Национальным комитетам для утверждения до опубликования в качестве международных стандартов. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50 % Национальных комитетов IDF, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. IDF не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 15174|IDF 176 подготовлен Международной федерацией по молочному животноводству (IDF) и Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*. Этот стандарт должен быть опубликован совместно IDF и ISO.

Вся работа была проведена совместной ISO-IDF рабочей группой по *Микробным коагулянтам* Постоянного комитета по *Аналитическим методам определения технологических добавок и индикаторов* под руководством м-ра М. Харбое (Дания) и профессора А. Андрена (Швеция).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143128ee97/iso->

Настоящее второе издание ISO 15174|IDF 176 отменяет и заменяет первое издание (ISO 15174|IDF 176:2002), которое было подвергнуто техническому пересмотру.

Введение

Микробные коагулянты получают из различных микробиологических источников, наиболее распространенными являются *Rhizomucor miehei* (ЕС 3.4.23.23), *R. pusillus* (ЕС 3.4.23.23) и *Cryphonectria parasitica*, ранее называемый *Endothia parasitica* (ЕС 3.4.23.22).

Каждый из этих ферментов имеет свои собственные характеристики, что касается общей молокосвертывающей активности и свойств, связанных с сыроделием. Существуют различия в чувствительности к воздействию температуры, рН, ионов кальция, а также во влиянии на реологические свойства образованного молочного геля.

Поэтому очень важно, исходя из практических и экономических соображений, иметь международный метод определения общей молокосвертывающей активности микробных коагулянтов относительно признанного на международном уровне исходного эталона. Также по практическим причинам было решено использовать фермент *R. miehei* в качестве исходного эталона микробных коагулянтов для всех типов этих коагулянтов.

Этот метод соответствует методу определения относительной молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента, описанного в ISO 11815|IDF 157.

Качественное определение микробных коагулянтов в пробе можно выполнять в соответствии с ISO 15163|IDF 110:—^[7], Приложение А. В случае смеси различных молокосвертывающих ферментов невозможно осуществить правильное определение общей молокосвертывающей активности в пробе.

ISO 15174:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012>

Молоко и молочные продукты. Микробные коагулянты. Определение общей молокосвертывающей активности

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод сравнения общей молокосвертывающей активности пробы микробного коагулянта с молокосвертывающей активностью международного исходного эталона микробного коагулянта в стандартном молочном субстрате, приготовленном с использованием раствора хлорида кальция концентрацией 0,5 г/л (рН ~6,5).

2 Принцип

Определяют время, необходимое для видимого образования хлопьев в стандартном молочном субстрате, приготовленном с использованием раствора хлорида кальция концентрацией 0,5 г/л (рН ~6,5). Сравнивают при идентичных химических и физических условиях продолжительность его свертывания пробой микробного коагулянта с продолжительностью свертывания исходным эталоном микробного коагулянта с известной молокосвертывающей активностью.

3 Реактивы и материалы

Если не указано иначе, используют реактивы только признанного аналитического качества и дистиллированную или деминерализованную воду либо воду эквивалентной чистоты.

3.1 Буферный раствор, рН 5,5. Добавляют с помощью пипетки (4.1) 10,0 мл раствора уксусной кислоты концентрацией 1 моль/л (CH_3COOH) к 10,0 г тригидрата ацетата натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) и перемешивают. Разбавляют водой до 1 000 мл. При необходимости доводят рН до 5,5 с помощью раствора уксусной кислоты концентрацией 1 моль/л или раствора ацетата натрия концентрацией 1 моль/л.

3.2 Основной раствор хлорида кальция, $\rho(\text{CaCl}_2) = 500$ г/л. Растворы хлорида кальция требуемой точной концентрации 500 г/л и заявленной фактической плотности имеются в продаже.¹⁾ Хранят раствор согласно инструкциям производителя.

Перед применением доводят основной раствор хлорида кальция до комнатной температуры (18 °С – 22 °С). Проверяют концентрацию раствора хлорида кальция путем титрования раствором EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоты) каждый год.

3.3 Рабочий раствор хлорида кальция, $\rho(\text{CaCl}_2) = 0,5$ г/л. Используют плотность основного раствора хлорида кальция (3.2) для расчета массы, необходимой для получения окончательной концентрации хлорида кальция 0,5 г/л в рабочем растворе.

Масса раствора должна быть эквивалентна добавлению 2,00 мл основного раствора с точной концентрацией $\rho(\text{CaCl}_2) = 500$ г/л, в этом случае масса раствора составляет ~2,70 г.

Для приготовления рабочего раствора хлорида кальция рекомендуется взвешивание основного раствора хлорида кальция (3.2), поскольку вязкий раствор трудно отбирать пипеткой.

1) Chr. Hansen's A/S, Hvidovre, Denmark является примером подходящего поставщика. Эта информация дается для удобства пользователей данного документа и не означает одобрения этого поставщика со стороны ISO или IDF.

Взвешивают с точностью до 0,01 г приблизительно 2,70 г основного раствора хлорида кальция (3.2) точно установленной концентрации при комнатной температуре (18 °C – 22 °C) в мерной колбе с одной меткой вместимостью 2 000 мл. Разбавляют водой до метки 2 000 мл и перемешивают. Раствор хлорида кальция должен быть свежеприготовленным в день его использования.

ПРИМЕЧАНИЕ Альтернативно можно приготовить промежуточный раствор хлорида кальция концентрацией 50 г/л и в дальнейшем разбавлять его перед использованием.

3.4 Сухое молоко низкотемпературного сгущения и распылительной сушки с пониженным содержанием жира, с хорошим сычужным свертыванием и хорошего бактериологического качества.

ПРИМЕЧАНИЕ Соответствующее этим требованиям сухое молоко низкотемпературного сгущения и распылительной сушки с пониженным содержанием жира имеется в продаже.^{1),2)}

3.5 Порошкообразный исходный эталон микробного коагулянта (*Rhizomucor miehei*), в стеклянных ампулах. Точное значение общей молокосвертывающей активности маркируют на ампулах.

Хранят порошкообразный исходный эталон микробного коагулянта в темноте при температуре –18 °C в защищенном от влаги месте. В течение коротких промежутков времени, например, при транспортировке, порошок может храниться при температуре окружающей среды.

Порошкообразный исходный эталон микробного коагулянта является первичным исходным эталоном; можно приготовить вторичный жидкий эталон и использовать его в том случае, если гарантируется получение одинаковых результатов.

Общая молокосвертывающая активность международного порошкообразного исходного эталона микробного коагулянта (*R. miehei*) — это величина активности, установленная относительно первой партии международного порошкообразного исходного эталона сычужного фермента из желудка телят, который, как было определено, содержит 1 000 IMCU/г (см. ISO 11815 | IDF 157^[6]).

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Общая молокосвертывающая активность выражается в процентах относительно среднеарифметического значения результатов испытаний.^{5174:2012}

Общая молокосвертывающая активность порошкообразного исходного эталона микробного коагулянта маркируется на стеклянных ампулах и/или заявляется в предусмотренном сертификате. Это необходимо для будущих препаратов микробных исходных эталонов, активность которых должна быть установлена относительно предыдущей партии микробного исходного эталона.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Общую протеолитическую (молокосвертывающую) активность порошкообразного исходного эталона микробного коагулянта проверяют каждый второй год альтернативным методом, например, на синтетическом гексапептидном субстрате NIZO³⁾.

Международный порошкообразный исходный эталон микробного коагулянта доступен для приобретения в DSM Food Specialties⁴⁾.

4 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура и, в частности, следующая.

4.1 Микropипетка или любая другая пипетка, способная подавать 0,5 мл не менее чем за 1 с при повторяемости 0,2 % или выше.

2) Secalait, Poligny, France является примером подходящего поставщика. Эта информация дается для удобства пользователей данного документа и не означает одобрения этого поставщика со стороны ISO или IDF.

3) NIZO Food Research BV, Ede, Netherlands является примером подходящего поставщика. Эта информация дается для удобства пользователей данного документа и не означает одобрения этого поставщика со стороны ISO или IDF.

4) DSM Food Specialties, Dairy Ingredients Group, Delft, Netherlands является примером подходящего поставщика. Эта информация дается для удобства пользователей данного документа и не означает одобрения этого поставщика со стороны ISO или IDF.

4.2 Пипетки с одной меткой, для подачи соответствующих объемов, ISO 648^[1], класс А.

Альтернативно для разбавления коагулянтов можно использовать **разбавитель** (например, разбавитель Гамильтона) с такой же прецизионностью. Для измерения субстрата также можно использовать **шприц** или **дозатор**, подающий соответствующее количество с повторяемостью 0,4 %.

4.3 Мерные колбы с одной меткой, требуемой вместимости, ISO 1042^[3], класс А.

4.4 Термометр, калиброванный, градуированный от 20 °С до 45 °С, с точностью до $\pm 0,1$ °С.

4.5 рН-метр, пригодный для считывания показаний с точностью до 0,01 единиц рН.

4.6 Аналитические весы, пригодные для считывания показаний с точностью до 1 мг.

4.7 Секундомер, пригодный для считывания показаний с точностью до секунды.

4.8 Колбы или пробирки, для испытания молока на свертывание соответствующей вместимости (см. 7.4).

4.9 Водяная баня, способная поддерживать температуру $32\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, а также постоянную температуру по всей бане в пределах $\pm 0,2\text{ °C}$. Баню следует оборудовать следующими приспособлениями.

4.9.1 Электродвигатель, к вращающемуся валу которого может быть присоединена колба или пробирка (4.8), способный вращаться под углом примерно 30° к поверхности воды в водяной бане.

ПРИМЕЧАНИЕ Частота вращения не существенна для этого международного стандарта. Пригодна частота вращения от 2 об/мин до 4 об/мин.

4.9.2 Электрическая лампа, размещенная так, чтобы эффективно освещать колбу или пробирку (4.8).

ПРИМЕЧАНИЕ Для улучшения визуального наблюдения за процессом свертывания молока в колбе или пробирке можно использовать экран с темным фоном, размещенный в водяной бане.

5 Отбор проб

Отбор проб не включен в метод, установленный в этом международном стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приводится для жидкого микробного коагулянта (6.1) в ISO 707|IDF 50:2008^[2], Раздел 9 и для порошкообразного микробного коагулянта (6.2) в ISO 707|IDF 50:2008^[2], Раздел 13.

Важно поставлять в лабораторию действительно представительную пробу, которая не была подвергнута порче или изменению во время транспортировки или хранения.

Хранят пробы для испытания в темноте при температуре от 0 °С до 5 °С.

6 Приготовление пробы для испытания

6.1 Жидкий микробный коагулянт

Перемешивают пробу для испытания с образованием завихрения, избегая образования пены. Доводят пробу до комнатной температуры (18 °С – 22 °С) до начала приготовления испытуемого раствора коагулянта (7.3).

Жидкий коагулянт довольно вязкий. При отборе пробы пипеткой используют правильную методику. Альтернативно можно делать точные и прецизионные разбавления, особенно для коагулянтов высокой концентрации. Это достигается с помощью взвешивания жидких проб на аналитических весах и расчета их объема, в миллилитрах, путем деления их массы на плотность используемого коагулянта.

6.2 Порошкообразный микробный коагулянт

Тщательно перемешивают пробу для испытания для получения однородного порошка. Доводят пробу до комнатной температуры (18 °C – 22 °C) перед приготовлением испытуемого раствора коагулянта (7.3).

ПРИМЕЧАНИЕ Порошкообразные продукты могут быстро разделяться.

Учитывают массу проб(ы) для анализа, отбираемых(ой) от пробы для испытания. Часто достаточно отбирать пробы для анализа массой от 3 г до 5 г. Однако, если требуется анализировать неоднородные пробы для испытания и получить точные результаты, необходимо отбирать большие пробы для анализа.

7 Методика

7.1 Приготовление субстрата

Заполняют мерную колбу с одной меткой вместимостью 1 000 мл (4.3) до метки рабочим раствором хлорида кальция (3.3).

Взвешивают 110 г сухого молока низкотемпературного сгущения и распылительной сушки с пониженным содержанием жира (3.4) с точностью до 0,1 г в стакане вместимостью 2 000 мл. Добавляют примерно 100 мл рабочего раствора хлорида кальция из мерной колбы вместимостью 1 000 мл к порошку в стакане. Перемешивают вручную для получения однородной смеси.

Добавляют к содержимому стакана оставшиеся 900 мл рабочего раствора хлорида кальция из мерной колбы вместимостью 1 000 мл, дав возможность раствору полностью стечь. Перемешивают полученный таким образом субстрат на магнитной мешалке в течение 30 мин, соблюдая осторожность для предотвращения образования пены.

Оставляют полученный субстрат в темноте при комнатной температуре на 30 мин. При необходимости можно хранить субстрат в темноте при комнатной температуре не более 4 ч или охлажденным в течение дня приготовления.

ПРИМЕЧАНИЕ pH приготовленного субстрата равняется приблизительно 6,50. Значение pH не является существенным и не требует регулировки.

7.2 Приготовление раствора эталона микробного коагулянта

7.2.1 Раствор исходного эталона микробного коагулянта

Порошкообразный исходный эталон микробного коагулянта (3.5) растворяют согласно следующей методике.

Чтобы избежать попадания влаги в порошок удостоверяются в том, что перед открытием стеклянная ампула с порошкообразным исходным эталоном микробного коагулянта находится при комнатной температуре (18 °C – 22 °C).

Открывают ампулу и взвешивают с точностью до миллиграмма такое количество порошкообразного исходного эталона микробного коагулянта, общая молокосвертывающая активность которого составляет 2 500 IMCU в мерной колбе с одной меткой вместимостью 50 мл (4.3). Добавляют от 15 мл до 20 мл буферного раствора (3.1) и перемешивают с образованием завихрения, избегая образования пены, для растворения порошка. Разбавляют до 50 мл буферным раствором (3.1) и хорошо перемешивают снова.

ПРИМЕЧАНИЕ В ISO 15174|IDF 176:2001 и ISO 11815|IDF 157^[6] используют порошкообразный исходный эталон (3.5) с активностью примерно 1 000 IMCU/г и устанавливают навеску порошка массой 2,500 г, общая молокосвертывающая активность которой составляет примерно 2 500 IMCU. При поставке второй партии невозможно достичь оговоренного значения активности 1 000 IMCU/г. Поэтому было решено сохранять значение 2 500 IMCU и регулировать взвешиваемую массу в зависимости от общей молокосвертывающей активности порошкообразного исходного эталона. Например, если исходный эталон имеет общую активность 2 200 IMCU/г, то взвешивают 1,136 г (2500/2200) порошка.