

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

**ISO
15163**

**IDF
110**

Первое издание
2012-05-15

Молоко и молочные продукты. Сычужный фермент из желудка телят и взрослых коров. Определение содержания химозина и говяжьего пепсина методом хроматографии

*Milk and milk products – Calf rennet and adult bovine rennet.
Determination by chromatography of chymosin and bovine pepsin
contents*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4a446889-b599-4aa0-9f9e-94bfac53f277/iso-15163-2012>



Ссылочные номера
ISO 15163:2012(R)
IDF 110:2012(R)

© ISO и IDF 2012

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.itech.ai)

ISO 15163:2012

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/4a446889-b599-4aa0-9f9e-94bfac53f277/iso-15163-2012>



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 предварительного письменного согласия ISO или IDF, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного 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

Напечатан в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
Предисловие	v
Введение	vi
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Принцип	1
4 Реактивы	1
5 Аппаратура	3
6 Отбор проб	4
7 Методика	4
7.1 Проверка	4
7.2 Подготовка чистой колонки со смолой Fractogel	4
7.3 Регенерация и уравнивание смолы Fractogel в колонке	5
7.4 Хранение колонки со смолой Fractogel	5
7.5 Приготовление пробы для испытания	5
7.6 Анализ обессоленного сычужного фермента	6
7.7 Определение времени свертывания	8
8 Вычисление и представление результатов	8
8.1 Вычисление активности химозина и пепсина, выражаемой в процентах	8
8.2 Вычисление активности химозина и говяжьего пепсина, в миллиграммах на литр	9
8.3 Выражение результатов	10
9 Прецизионность	10
9.1 Межлабораторные испытания	10
9.2 Повторяемость	10
9.3 Воспроизводимость	11
10 Протокол испытания	11
Приложение А (информативное) Количественное определение молокосвертывающих ферментов в промышленных коагулянтах методом двойной иммунодиффузии	12
Приложение В (информативное) Межлабораторные испытания	17
Библиография	19

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, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в этой работе. ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Проекты международных стандартов разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов заключается в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что, возможно, некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за определение некоторых или всех таких патентных прав.

Международный стандарт ISO 15163|IDF 110 был разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты* и Международной федерацией молочной промышленности (IDF). Стандарт опубликован ISO совместно с IDF.

Настоящее первое издание ISO 15163|IDF 110 отменяет и заменяет стандарт IDF 110B:1997, который был технически пересмотрен.

Предисловие

Международная федерация молочной промышленности (IDF) является некоммерческой всемирной федерацией предприятий молочной отрасли. Членство в IDF представлено национальными комитетами стран, а также региональными ассоциациями молочной промышленности, подписавшими официальное соглашение о сотрудничестве с IDF. Каждый национальный комитет 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 заключается в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые постоянными комитетами и рабочими группами, рассылаются национальным комитетам для голосования. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50 % национальных комитетов IDF, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что, возможно, некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за определение некоторых или всех таких патентных прав.

ISO 15163|IDF 110 был разработан Международной федерацией молочной промышленности (IDF) совместно с Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*. Стандарт опубликован ISO совместно с IDF.

Вся работа была выполнена объединенной проектной группой ISO/IDF по *Определению содержания химозина и говяжьего пепсина* Постоянного комитета по *Аналитическим методам определения технологических добавок и индикаторов* под руководством проф. А.Андрена (Швеция).

Настоящее первое издание ISO 15163|IDF 110 отменяет и заменяет IDF 110B:1997, который был технически пересмотрен.

Введение

Препараты на основе сычужного фермента из желудка телят и взрослых животных содержат химозин и говяжий пепсин в разных количествах в качестве основных молокосвертывающих ферментов. Пропорция химозина по отношению к пепсину в сычуге (четвёртый отдел желудка жвачных) с возрастом и отлучением теленка от матери уменьшается.

Соотношение сычуга молодняка к сычугу взрослых животных в сырье для производства фермента, таким образом, сильно влияет на состав химозина и пепсина в конечном сычужном ферменте. Чем больше сычуг у молодых вскормленных молоком телят, тем выше доля химозина и наоборот^{[5][6]}.

Как химозин, так и пепсин имеют особые характеристики, касающиеся молокосвертывающей активности и пригодности для производства сыров. Молокосвертывающая активность пепсина, например, намного больше зависит от показателя pH, чем активность химозина, кроме того, пепсин также имеет более общую протеолитическую активность, чем химозин.

Поэтому, важно проанализировать содержание химозина и пепсина в дополнение к концентрации (общей молокосвертывающей активности) сычужного фермента^{[6][7]}.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15163:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4a446889-b599-4aa0-9f9e-94bfac53f277/iso-15163-2012>

Молоко и молочные продукты. Сычужный фермент из желудка телят и взрослых коров. Определение содержания химозина и говяжьего пепсина методом хроматографии

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает контрольный метод определения количества химозина и говяжьего пепсина в пробе сычужного фермента телят и взрослых животных. Кроме того, стандарт может применяться для приготовления смесей сычужного фермента телят/взрослых особей крупного рогатого скота с полученным в процессе ферментации говяжьим химозином.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 11815|IDF 157:2007, *Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента*

3 Принцип

На первом этапе, пробу сычужного фермента обессоливают, а химозин и говяжий пепсин в ферментах разделяют на анионообменной колонке^{[8][9]}. На втором этапе, определяют молочносвертывающую активность каждого из двух разделенных ферментов в соответствии с ISO 11815|IDF 157 (восстановленного молока с pH 6,5). Ферментативный состав пробы сычужного фермента выражают в процентах активности химозина и пепсина от суммы активностей обоих компонентов в соответствии с Международными молокосвертывающими единицами (ММЕ), или результаты выражают в миллиграммах на литр активного химозина и миллиграммах на литр активного пепсина.

Общая молокосвертывающая активность первой партии контрольного сычужного порошка из желудка телят и первой партии контрольного сычужного порошка от взрослых животных раз и навсегда была установлена на уровне 1000 ММЕ/г. Будущие препараты стандартных проб должны быть установлены относительно предыдущих стандартных проб (см. ISO 11815|IDF 157).

Данный международный стандарт устанавливает требования как к ручной, так и к альтернативной автоматизированной упаковке колонок для анионообменной хроматографии.

Это контрольный метод и, поэтому, изменения могут быть сделаны только в случае подтверждения получения того же результата, а повторяемость и воспроизводимость, по крайней мере, так же высока, как в исходном контрольном методе. Любые изменения установленного в настоящем стандарте метода также должны быть указаны в протоколе испытаний (см. Раздел 10).

4 Реактивы

Если не указано иное, используют реактивы только установленной аналитической чистоты и

дистиллированную или деминерализованную воду или воду эквивалентной чистоты.

4.1 Смола, Fractogel® EMD DEAE (M) (Merck cat. no. 1.16883)¹⁾ или Mono Q® 1 мл предварительно упакованной колонки (HR 5/5 или 5/50 GL от GE Healthcare)²⁾ или эквивалентная смола.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Fractogel® EMD DEAE (M) подходящая смола для ручного ввода проб, а Mono Q® подходит для автоматического ввода.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Если смолу Fractogel® или Mono Q заменить другой смолой, то скорее всего появится необходимость заменить и буферные растворы в 4.12, что приведет к необходимости повторной оценки метода.

4.2 Пиперазина гексагидрат (C₄H₁₀N₂·6H₂O).

4.3 Хлорид натрия (NaCl).

4.4 Тимол, необязательный консервант.

4.5 Гидроксид натрия (NaOH).

4.6 Раствор соляной кислоты solution, c(HCl) = 1 моль/л.

4.7 Этанол (C₂H₅OH), с объемной долей не менее 96 %.

4.8 Этанол (C₂H₅OH), с приближенной объемной долей не менее 20 %.

Добавляют 105 мл 96 % этанола (4.7) к 400 мл воды и перемешивают. Если требуется стерильная фильтрация, фильтруют воду до перемешивания с этанолом.

4.9 Мочевина, c(N₂H₄CO) = 8 моль/л.

Растворяют 48 г мочевины в воде и доводят до общего объема 100 мл.

4.10 Система трубок для диализа, диаметром около 1 см (Union Carbide)³⁾ или эквивалентного (необязательно).

ПРИМЕЧАНИЕ Качество системы трубок для диализа не является решающим.

4.11 Колонки для обессоливания, Bio-Rad – Econopac 10DG (cat. no. 732-2010)⁴⁾ или эквивалентные (необязательно).

Используют или систему трубок для диализа (4.10) или колонки для обессоливания для обессоливания сычужного фермента.

4.12 Буферные растворы

4.12.1 Буферный раствор I, пиперазин [(CH₂)₄(NH)₂], c[(CH₂)₄(NH)₂] = 0,025 моль/л.

1) Fractogel® EMD DEAE (M) – это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация дается для удобства пользователей данного документа и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

2) Mono Q® 1 мл предварительно упакованной колонки – это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация дается для удобства пользователей данного документа и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

3) Union Carbide – это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация дается для удобства пользователей данного документа и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

4) Bio-RAD - Econopac 10DG - это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация дается для удобства пользователей данного документа и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

Отвешивают 4,85 г пиперазина (4.2) и 42,8 г раствора соляной кислоты (4.6) в лабораторный стакан и перемешивают. Переносят по частям содержимое стакана в 1000 мл мерную колбу с одной меткой (5.5), доводят водой до метки 1000 мл и перемешивают. Показатель pH должен быть равен $5,30 \pm 0,05$. Если это не так, регулируют пиперазином или соляной кислотой. Перед использованием дегазируют и консервируют буферный раствор, как описано в 4.12.5.

4.12.2 Буферный раствор I, $c(\text{NaCl}) = 0,25$ моль/л.

Отвешивают 14,6 г NaCl в 1000 мл мерную колбу с одной меткой (5.5). Добавляют буферный раствор I (4.12.1) до 1000 мл метки и перемешивают. pH не регулируют. Буферный раствор II используется только для ручного метода. Перед использованием дегазируют и консервируют буферный раствор, как описано в 4.12.5.

4.12.3 Буферный раствор III, $c(\text{NaCl}) = 0,50$ моль/л.

Отвешивают 29,2 г NaCl в 1000 мл мерную колбу с одной меткой (5.5). Добавляют буферный раствор I (4.12.1) до 1000 мл метки и перемешивают. pH не регулируют. Буферный раствор III используется только для ручного метода. Перед использованием дегазируют и консервируют буферный раствор, как описано в 4.12.5.

4.12.4 Буферный раствор IV, $c(\text{NaCl}) = 1,0$ моль/л.

Отвешивают 58,4 г NaCl в 1000 мл мерную колбу с одной меткой (5.5). Добавляют буферный раствор I (4.12.1) до 1000 мл метки и перемешивают. pH не регулируют. Буферный раствор III используется только для ручного метода. Перед использованием дегазируют и консервируют буферный раствор, как описано в 4.12.5.

4.12.5 Дегазация и консервация

Перед использованием дегазируют буферные растворы от I до IV (4.12.1 to 4.12.4) в вакууме, или используя ультразвуковую водяную баню. Консервируют буферные растворы от I до IV для ручного метода, добавляя несколько кристаллов тимола, а для автоматического метода применяют стерильную фильтрацию, используя фильтр размером 0,2 мкм.

Буферные растворы от I до IV можно хранить не менее 5 дней при комнатной температуре или в течение 2 месяцев в холодильнике.

5 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура и, в частности, следующая.

5.1 Многоканальный перистальтический насос или другой подходящий насос (только для ручного ввода).

5.2 pH-метр, чувствительностью $\pm 0,01$ pH единицы.

5.3 Хроматографическая колонка, диаметром $\sim 1,0$ см и длиной 10 см, с адаптером потока в одном направлении или эквивалентная колонка, подходящая для слоя геля высотой ~ 5 см (только для ручного ввода).

5.4 Магнитная мешалка.

5.5 Мерные колбы с одной меткой, нужной вместимости, ISO 1042^[2].

5.6 FPLC^{®5)}, ÄKTA^{®6)} или HPLC оборудование, пригодное для поставленной цели, используется только для автоматического ввода.

5.7 Лабораторное оборудование, для определения времени свертывания (см. ISO 11815|IDF 157).

6 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, рассматриваемого в данном международном стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приводится в стандарте ISO 707|IDF 50^[1].

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Отбор проб жидкого сычужного фермента установлен в стандарте ISO 707|IDF 50:2008, Раздел 9, а порошкового фермента – в стандарте ISO 707|IDF 50:2008, Раздел 13.

Репрезентативную пробу следует направить в лабораторию. Проба не должна быть повреждена или изменена при транспортировке или хранении.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Порошковые продукты можно быстро разделить.

Пробы хранят в темном месте при температуре от 0°C до 5°C.

7 Методика

7.1 Проверка

Перед проведением анализа проверяют сычужный фермент на отсутствие основных молокосвертывающих ферментов не говяжьего происхождения, используя подходящий метод (см. Приложение А). Однако, проверку можно не проводить, если известно, что фермент содержит химозин и пепсин только говяжьего происхождения.

7.2 Подготовка чистой колонки со смолой Fractogel

После дегазации в вакууме разливают суспензию готовой к использованию смолы Fractogel (4.1) непосредственно из бутылки поставщика, или используя ультразвуковую водяную баню, в колонку (5.3), установленную в вертикальном положении, с открытым выпуском, пока слой осажденной смолы Fractogel не достигнет высоты от 4,5 см до 5,5 см. Гелевая основа не должна быть сухой во время проведения процедуры.

Закрывают выпускную трубку. Погружают конец впускного отверстия трубки перистальтического насоса в лабораторный стакан с буферным раствором I (4.12.1). Подсоединяют трубку адаптера к отводной трубке насоса. Регулируют скорость потока до $(1,3 \pm 0,1)$ мл/мин. Заполняют трубку адаптера буферным раствором I (4.12.1), не превышая общий внутренний объем трубок 1,5 мл.

Закрывают колонку адаптером, как указано поставщиком колонки. Сжимают адаптером несколько миллиметров гелевой основы, чтобы ликвидировать свободное пространство над ней. Следует предупредить попадание пузырьков воздуха в колонку. Промывают колонку буферным раствором I (4.12.1) в течение 5 мин при скорости потока 1,3 мл/мин.

5) FPLC[®] – это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация дается для удобства пользователей данного документа и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

6) ÄKTA[®] – это пример имеющегося в продаже подходящего продукта. Информация дается для удобства пользователей данного документа и не свидетельствует о поддержке этого продукта со стороны ISO или IDF.

7.3 Регенерация и уравнивание смолы Fractogel в колонке

После подготовки новой колонки и после каждого цикла проводят регенерацию и приведение в равновесие смолы Fractogel (4.1) в колонке следующим методом.

Регенерируют смолу Fractogel в колонке со скоростью потока 1,3 мл/мин, используя не менее 15 мл буферного раствора IV (4.12.4) (~11,5 мин). Приводят в равновесие колонку, используя не менее 40 мл буферного раствора I (4.12.1) (~30 мин). После этого колонка готова для загрузки пробы для анализа.

Одну и ту же колонку можно использовать более 20 раз. Более тщательно очищают колонку после частого использования, промывая ее 0,1 моль/л NaOH в течение 10 мин, а затем водой в течение 10 мин. Затем проводят обычную процедуру регенерации и приведения в равновесие, как описано выше.

7.4 Хранение колонки со смолой Fractogel

Если колонка должна храниться более 1 недели, ее промывают не менее, чем 15 мл 20% этанола (4.8) с помощью перистальтического насоса (5.1). Хранят колонку с плотно закрытыми впускными и выпускными каналами.

Колонку можно хранить несколько месяцев при комнатной температуре, стараясь избегать попадания прямого солнечного света.

7.5 Приготовление пробы для испытания

7.5.1 Общие требования

Жидкие образцы могут быть использованы в том виде, как они есть; необходимо только следовать процедуре, описанной в 7.5.2.

Порошковую пробу сычужного фермента готовят следующим образом. Растворяют порошковую пробу фермента так, чтобы получить, например, 200 ММЕ/мл, в подходящем количестве буферного раствора I (4.12.1), или с использованием буферного раствора с pH 5,5 (см. ISO 11815|IDF 157) перед обессоливанием.

Определяют время свертывания растворенной пробы фермента в соответствии с ISO 11815|IDF 157 перед обессоливанием. Проводят приблизительную оценку активности пробы, в ММЕ/мл, устанавливая ее относительно эталона сычужного фермента, чтобы определить количество пробы на колонку (7.6.1 or 7.6.2).

Если результаты выражаются в миллиграммах на литр, определяют время свертывания пробы сычужного фермента, по меньшей мере, дважды в соответствии с ISO 11815|IDF 157. В этом случае измеряют время свертывания одновременно или в быстрой последовательности "до" и "после" обессоливания.

Перед внесением пробы для анализа в колонку, обессоливают ее путем диализа (7.5.2) или гелевой фильтрации (7.5.3).

7.5.2 Обессоливание путем диализа

Погружают диализную трубку (4.10) в кипящую воду на 5 мин и промывают ее внутри и снаружи водой.

Диализируют 5 мл исследуемой приготовленной пробы (7.5) (около 900 ММЕ) по отношению к 500 мл буферного раствора I (4.12.1) при 4°C в течение не менее 5 ч, но не более 20 ч. Сжимают очень крепко рукой диализную трубку, чтобы перекрыть ее в целях сокращения разбавления, которое происходит во время диализа. Во время диализа перемешивают буфер магнитной мешалкой (5.4).