ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

ГОСТ 20264.2—88

Издание официальное

Цена 5 коп. БЗ 1—88/33

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 574.15.001.4 : 006.354 Группа С09

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ

Методы определения протеолитической активности

Enzyme preparations. Methods for determination of proteolytic activity

ГОСТ 20264.2—88

ОКСТУ 9291

Срок действия с 01.01.89
до 01.01.94

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты и устанавливает методы определения протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ — по ГОСТ 20264.0—74.

2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (ПС)
(модифицированный метод Ансона)

2.1. Метод основан на гидролизе казеината натрия исследуемым ферментным препаратом до пептидов и аминокислот с последующим их определением.

За единицу протеолитической активности принята способность фермента превращать за 1 мин при температуре 30°С казеинат натрия в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве, соответствующем 1 мкмолю тирозина.

Протеолитическую активность выражают числом указанных единиц в 1 г испытуемого препарата.

Активность грибных и бактериальных протеиназ определяют при значениях pH в следующих диапазонах:

2,5±0,2 и 5,5±0,2 — кислые протеиназы;

7,2±0,2 — нейтральные протеиназы;

9,5±0,2 — щелочные протеиназы.

Издание официальное Перепечатка воспрещена

★

© Издательство стандартов, 1988

2.2. Аппаратура, материалы, реактивы, растворы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104—80:

2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

1-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г или 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 20 г.

Прибор для определения pH среды в диапазоне от 0 до 14 с погрешностью измерения ±0,1 единиц pH.

Мешалка магнитная любого типа, обеспечивающая 3000 об/мин.

Термостат любого типа, обеспечивающий температуру нагрева 40±0,2°С.

Колориметр фотоэлектрический лабораторный по ГОСТ 12083—78, обеспечивающий измерения в интервалах длин волн 630—670 нм с погрешностью ±1% (по коэффициенту пропускания) или 0,01 *D* (по оптической плотности).

Секундомер по ГОСТ 5072—79.

Термометры 0—150°С по ГОСТ 215—73 с ценой деления 1°С.

Холодильник бытовой любой марки.

Электроплитка с терморегулятором по ГОСТ 14919—83.

Баня водяная любого типа.

Холодильник ХСВО 10 ХС по ГОСТ 25336—82.

Стаканы любого типа и исполнения вместимостью 100, 250, 600, 1000 и 2000 см³ по ГОСТ 25336—82.

Стаканчики для взвешивания СВ-19/9 или СВ-24/10 по ГОСТ 25336—82.

Колбы типов П и Кн любого исполнения вместимостью 100, 250, 500, 1000 см³ по ГОСТ 25336—82.

Колбы типов К—1—2000—45/40 ТС, К—2—200—45/40 ТС по ГОСТ 25336—82.

Колбы мерные исполнения 1 или 2, любого класса точности, наливные вместимостью 50, 100, 200, 250, 500, 1000 и 2000 см³ по ГОСТ 1770—74.

Пробирки П1—16—150 ХС, П2—16—180 ХС по ГОСТ 25336—82.

Цилиндры любого исполнения вместимостью 50 и 100 см³ по ГОСТ 1770—74.

Пипетки любого исполнения вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292—74.

Бюретки по ГОСТ 20292—74.

Воронки стеклянные типа В по ГОСТ 25336—82.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026—76.

Кислота уксусная по ГОСТ 61—75, раствор концентрацией 0,1 моль/дм³.

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552—80, раствор с массовой долей кислоты 85% и раствор концентрацией 0,1 моль/дм³.

Кислота борная по ГОСТ 9656—75, раствор концентрацией 0,1 моль/дм³.

Натрий вольфрамовокислый 2-водный по ГОСТ 18289—78.

Натрий молибденовокислый по ГОСТ 10931—74.

Литий сернокислый.

Кислота соляная по ГОСТ 3118—77, концентрированная, раствор концентрацией 1 моль/дм³ и 0,2 моль/дм³.

Бром по ГОСТ 4109—79.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, раствор концентрацией 1 моль/дм³ и 0,1 моль/дм³.

Натрий казеиновокислый (казеинат натрия).

Натрий углекислый по ГОСТ 83—79, раствор концентрацией 0,5 моль/дм³.

Тирозин.

Кислота трихлоруксусная (ТХУ).

Фенолфталеин по ГОСТ 5850—72.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Примечания:

1. Все реактивы должны быть марки х. ч. или ч. д. а, кроме трихлоруксусной кислоты, которая используется марки ч.

2 Допускается использование импортной посуды и приборов с аналогичными техническими характеристиками.

2.3. Подготовка к испытанию

2.3.1. *Приготовление универсального буферного раствора* $Уб_1$ *концентрацией 0,1 моль/дм³.*

Для приготовления универсального буферного раствора $Уб_1$ готовят растворы концентрацией 0,1 моль/дм³: уксусной кислоты (раствор А), ортофосфорной кислоты (раствор В) и борной кислоты (раствор С) и смешивают их в равных соотношениях. Получают буферный раствор *с* pH 1,8. Добавляя к этой смеси различные объемы раствора гидроокиси натрия концентрацией 1 моль/дм³ получают буферные растворы:

а) pH реакционной смеси 2,5±0,2 и 5,5±0,2 (для кислых протеиназ);

б) pH реакционной смеси 7,2±0,2 (для нейтральных протеиназ);

в) pH реакционной смеси 9,5±0,2 (для щелочных протеиназ).

2.3.2. *Приготовление универсального буферного раствора* $Уб_2$ *концентрацией 0,5 моль/дм³.*

Для приготовления универсального буферного раствора $Уб_2$ готовят растворы А, В и С концентрацией 0,5 моль/дм³ и смешивают их в равных соотношениях.

2.3.3. *Приготовление универсального буферного раствора* $Уб_3$ *концентрацией 0,01 моль/дм³*

Универсальный буферный раствор $Уб_3$ готовят смешиванием девяти объемов дистиллированной воды с одним объемом буферного раствора $Уб_1$.

2.3.4. *Приготовление реактива Фолина (основной раствор)*

Для приготовления основного раствора Фолина в круглодонную колбу с пришлифованным обратным холодильником вместимостью 2000 см³ наливают 700 см³ дистиллированной воды, добавляют 100,00 г вольфрамовокислого натрия и 25,00 г молибденовокислого натрия. Затем приливают 50 см³ ортофосфорной кислоты с массовой долей 85 % и 100 см³ концентрированной соляной кислоты. Смесь кипятят на слабом огне на асбестовой сетке в течение 10 ч. Кипячение допускается прерывать.

В охлажденную смесь добавляют 150,00 г сернокислого лития, 50 см³ дистиллированной воды и пять капель брома. Открытую колбу кипятят на слабом огне под тягой в течение 15—20 мин, чтобы удалить избыток паров брома. Раствор должен иметь желтую окраску. После охлаждения раствор доводят дистиллированной водой до 1000 см³ (при необходимости фильтруют через трубку Аллина, заполненную стеклянной ватой).

Приготовленный раствор хранят в склянке из темного стекла в холодильнике. Через 2—3 мес хранения следует добавить в него 1—2 капли брома и снова прокипятить в течение 15—20 мин Показателем непригодности раствора считается его помутнение и изменение окраски из желтой в зеленую.

Концентрацию реактива Фолина проверяют титрованием разбавленного 1 : 10 реактива Фолина раствором гидроокиси натрия концентрацией 0,1 моль/дм³ по фенолфталеину. Реактив Фолина должен быть концентрацией 2 моль/дм³ по кислоте. Если кислотность реактива Фолина больше 2 моль/дм³, то его разбавляют дистиллированной водой, если меньше — реактив для работы не пригоден.

Рабочий раствор Фолина готовится разведением основного раствора 1 : 2 (одна часть реактива Фолина и две части дистиллированной воды) для определения активности модифицированным методом Ансона и 1 : 3 (одна часть реактива Фолина и три части дистиллированной воды) для определения активности методом ФОЛП.

2.3.5. *Приготовление раствора ферментного препарата*

0,100—1,000 г исследуемого препарата (в зависимости от предполагаемой активности), тщательно растирают в стаканчике стеклянной палочкой с небольшим количеством буферного раствора $Уб_1$ с соответствующим pH реакционной смеси. Затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят этим же буферным раствором объем жидкости до метки и перемешивают. Из этого раствора готовят не менее двух разведений в зависимости от предполагаемой активности, используя этот же буферный раствор.

Каждое разведение испытуемого раствора анализируют в двух повторностях. Для испытания берут две параллельные навески препарата.

Раствор ферментного препарата готовят непосредственно перед определением.

2.3.6. *Приготовление раствора с массовой долей казеината натрия 2% (субстрат).*

2.3.6.1. *Для кислых протеиназ (pH 2,5)*

2,000 г воздушно-сухого казеината натрия растворяют в 90 см^3 буферного раствора Уб$_3$ *с* pH 5,5. Затем раствор доводят до pH 2,5 добавлением 3,0—3,5 см^3 раствора соляной кислоты концентрацией 1 моль/дм^3.

Добавление соляной кислоты (до pH 3,0) следует проводить быстро при интенсивном перемешивании раствора. При дальнейшем подкислении раствора до pH 2,5 кислота вносится по каплям.

Затем раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки буферным раствором Уб$_1$ *с* pH 2,5.

Примечание. При подкислении раствора казеината натрия соляной кислотой первоначально (при значении pH в диапазоне 5,1—3,0) наблюдается образование мелких хлопьев, которые исчезают при дальнейшем добавлении соляной кислоты до pH 2,5.

2.3.6.2. *Для кислых (pH 5,5), нейтральных (pH 7,2) и щелочных (pH 9,5) протеиназ*

2,000 г воздушно-сухого казеината натрия растворяют в 90 см^3 Уб$_1$ соответствующего pH, после чего раствор доводят до pH 5,5 (для кислых протеиназ) добавлением нескольких капель раствора соляной кислоты концентрацией 1 моль/дм^3, а до pH 7,2 (нейтральных) и 9,5 (щелочных) добавлением нескольких капель раствора гидроокиси натрия концентрацией 1 моль/дм^3.

Затем раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки буферным раствором Уб$_1$ соответствующего pH.

Примечания:

1. Для сокращения времени растворения казеината натрия раствор готовят при нагревании до температуры 70°С на магнитной мешалке.
2. Срок хранения раствора в холодильнике в плотно закрытой склянке не более 3 сут.

2.3.7. *Проведение испытания*

Берут три пробирки (одна контрольная, две опытные).

В опытные пробирки наливают по 2 см^3 субстрата и помещают их в ультратермостат при температуре 30°С.

Примерно через 10 мин в каждую пробирку приливают по 2 см^3 раствора фермента (предварительно термостатированного при 30°С 3—4 мин), пробирки встряхивают и оставляют на гидро-

лиз ровно на 10 мин при температуре 30°С. Через 10 мин добавляют в обе пробирки по 4 см³ раствора ТХУ, чтобы прервать ферментативную реакцию и осадить белок и высокомолекулярные продукты гидролиза. Быстро перемешивают смесь и для обеспечения полного осаждения выдерживают пробирки со смесью при температуре 30°С еще в течение 20 мин. Затем смесь фильтруют в сухие пробирки. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен. Отбирают в пробирки с предварительно налитыми туда 5 см³ раствора углекислого натрия концентрацией 0,5 моль/дм³ по 1 см³ фильтрата, перемешивают и быстро приливают по 1 см³ рабочего раствора реактива Фолина. Дают реакционной смеси постоять 20 мин. После реакции растворы приобретают голубую окраску, интенсивность которой определяют фотоэлектрическим колориметром против контроля.

Контрольный опыт готовят, прибавляя реактивы в обратной последовательности: для этого в контрольную пробирку наливают 2 см³ ферментного раствора того же разведения, как и в опыте, добавляют 4 см³ ТХУ, выдерживают в ультратермостате при температуре 30°С в течение 10 мин, а затем вносят 2 см³ субстрата. Через 20 мин нахождения в термостате раствор фильтруют, отбирают в сухую пробирку с предварительно налитыми туда 5 см³ раствора углекислого натрия концентрацией 0,5 моль/дм³ 1 см³ фильтрата, перемешивают, добавляют 1 см³ рабочего раствора реактива Фолина.

Колориметрирование проводят фотоэлектрическим колориметром в диапазоне длин волн 630—670 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Значения оптической плотности должны лежать в диапазоне 0,07—0,45 для кислых протеиназ и 0,2—0,6 для нейтральных и щелочных протеиназ

При отклонении оптической плотности от указанной необходимо подобрать такое разведение препарата, чтобы оптическая плотность укладывалась в данные пределы.

2.3.8. *Построение градуировочной характеристики*

Для вычисления протеолитической активности строят градуировочную характеристику по тирозину и по ней вычисляют тирозиновый эквивалент (ТЭ), то есть ту оптическую плотность, которую бы дал 1 мкмоль тирозина в 1 см³ стандартного раствора. Этот эквивалент необходимо установить для каждой новой партии реактива Фолина и каждого фотоэлектрического колориметра.

Для построения градуировочной характеристики готовят раствор тирозина концентрацией 10^{-3} моль/дм³. Для этого 181,2 мг чистого тирозина растворяют в растворе соляной кислоты концентрацией 0,2 моль/дм³ в мерной колбе вместимостью 1 дм³. Из этого исходного раствора тирозина готовят дальнейшие разведения следующим образом.

Раствор 1. В мерную колбу вместимостью 50 см³ вносят 1 см³ исходного раствора тирозина и доводят объем до метки раствором соляной кислоты концентрацией 0,2 моль/дм³. Концентрация тирозина (c_1) при этом составляет $0{,}2 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ или 0,02 мкмоль/см³.

Последующие растворы готовят аналогичным образом:

раствор 2 : 2 см³ исходного раствора c_2 — $0{,}4 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ или 0,04 мкмоль/см³;

раствор 3 : 4 см³ исходного раствора c_3 — $0{,}8 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ или 0,08 мкмоль/см³;

раствор 4 : 5 см³ исходного раствора c_4 — $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ или 0,10 мкмоль/см³;

раствор 5 : 7,5 см³ исходного раствора c_5 — $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ или 0,15 мкмоль/см³;

раствор 6 : 10 см³ исходного раствора c_6 — $2{,}0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ или 0,20 мкмоль/см³;

раствор 7 : 15 см³ исходного раствора c_7 — $3{,}0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ или 0,30 мкмоль/см³.

Затем берут 7 пробирок, вносят в каждую по 1 см³ раствора тирозина разной концентрации и добавляют при постоянном перемешивании по 5 см³ раствора углекислого натрия концентрацией 0,5 моль/дм³ и 1 см³ рабочего раствора Фолина.

Контрольный опыт готовят также, но вместо раствора тирозина берут 1 см³ дистиллированной воды. Дают реакционной жидкости постоять в течение 20 мин.

Интенсивность окраски измеряется фотоэлектрическим колориметром против контрольной пробы в диапазоне длин волн 630—670 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Следует приготовить растворы из двух навесок тирозина и провести два параллельных опыта способом, указанным выше.

По средним данным, полученным из двух опытов, строится градуировочная характеристика, имеющая линейную зависимость.

На оси абсцисс откладывают значение концентрации (c) мкмоль/см³, на оси ординат — соответствующие значения оптической плотности (D).

По градуировочной характеристике находят тирозиновый эквивалент, соответствующий оптической плотности 1 мкмоля тирозина в 1 см³.

2.4. Обработка результатов

Протеолитическую активность ($ПС$), ед/г, вычисляют по формуле

$$ПС = \frac{D \cdot 4}{ТЭ \cdot 10 \cdot m} \cdot 1000, \qquad (1)$$

где D — оптическая плотность исследуемого раствора;

4 — отношение объемов реакционной смеси и раствора фермента после добавления ТХУ;

ТЭ — тирозиновый эквивалент, определяемый по градуировочной характеристике, см³/мкмоль;

10 — время гидролиза субстрата, мин;

m — масса ферментного препарата, взятая на протеолиз, мг;

1000 — переводной коэффициент полученных единиц на 1 г ферментного препарата.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое значение активностей, полученных при анализе двух параллельных навесок препарата.

Относительное допускаемое расхождение между значениями активностей двух параллельных навесок не должно превышать 5%. Результат округляют до первого десятичного знака.

Предел возможных значений относительной погрешности измерений протеолитической активности при доверительной вероятности $P=0{,}95$ составляет 5%.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТОДОМ ФОЛП (для определения щелочных протеиназ при pH 10,5)

За единицу протеолитической активности принята способность фермента катализировать гидролиз 1 г белка (казеина) в строго определенных условиях: температуре 40°С, pH 10,5 и времени гидролиза 1 ч

3.1. Аппаратура, материалы, реактивы, растворы

Применяемая аппаратура и материалы по п. 2 2.

Казеин по Гаммерстену.

Натрий углекислый по ГОСТ 83—79, раствор концентрацией 0,2 моль/дм³ и 0,5 моль/дм³.

Натрий двууглекислый по ГОСТ 2156—76, раствор концентрацией 0,2 моль/дм³.

Трихлоруксусная кислота (ТХУ), раствор концентрацией 0,3 моль/дм³.

Натрия гидроокись, раствор концентрацией 1 моль/дм³.

Реактив Фолина по п. 2.3.4.

3.2. Подготовка к испытанию

3.2.1 *Приготовление раствора ферментного препарата*

0,100—1,000 г исследуемого препарата (в зависимости от предполагаемой активности) тщательно растирают с небольшим количеством дистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Из этого раствора готовят не менее двух разведений в зависимости от предполагаемой активности.

Каждое разведение испытуемого раствора анализируют в двух повторностях.

Для испытания берут две параллельные навески препарата.

Раствор ферментного препарата готовят непосредственно перед определением.

3.2.2. *Приготовление карбонатно-бикарбонатного буферного раствора с pH 10,7*

Для приготовления буферного раствора в мерную колбу вместимостью 200 см^3 наливают 45 см^3 раствора углекислого натрия концентрацией 0,2 моль/дм^3 и 5 см^3 раствора двууглекислого натрия. Объем доводят до метки дистиллированной водой.

3.2.3. *Приготовление раствора с массовой долей казеина 1% (субстрат)*

2,000 г казеинового порошка переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3 и приливают 140 см^3 карбонатно-бикарбонатного буферного раствора с концентрацией водородных ионов pH 10,7. Колбу ставят на магнитную мешалку и раствор перемешивают в течение 30 мин, затем, продолжая перемешивать, колбу с субстратом помещают в водяную баню и нагревают до температуры 40°С; pH при этой температуре доводят до 10,5 добавлением (если необходимо) раствора гидроокиси натрия концентрацией 1 моль/дм^3. Далее раствор субстрата из конической колбы переводят в мерную колбу вместимостью 200 см^3, охлаждают проточной водой до 20°С и объем субстрата доводят до метки карбонатно-бикарбонатным буферным раствором. Срок хранения субстрата в холодильнике не более 3 сут в плотно закрытой склянке

3.3. Проведение испытания

В 3 пробирки (одна контрольная) наливают по 5 см^3 раствора казеина и выдерживают в ультратермостате при температуре 40°С в течение 5 мин.

В первую пробирку (контрольную) добавляют 2,5 см^3 дистиллированной воды, в последующие — по 2,5 см^3 испытуемого раствора ферментного препарата.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и выдерживают в ультратермостате в течение 60 мин при температуре 40°С.

По истечении времени гидролиза в каждую из пробирок, начиная с первой (контрольной), добавляют по 5 см^3 раствора ТХУ, чтобы прервать ферментативную реакцию и осадить белок и высокомолекулярные продукты гидролиза.

Смесь быстро перемешивают и для полноты осаждения выдерживают в течение 15 мин при температуре 40°С в ультратермостате Затем растворы фильтруют через фильтровальную бумагу и в фильтрате определяют количество прогидролизованного белка по тирозину. Для этого берут три пробирки и в каждую (начиная с контрольной) наливают по 2 см^3 фильтрата, затем медленно приливают в каждую по 5 см^3 раствора углекислого

натрия концентрацией 0,5 моль/дм³ и по 1 см³ рабочего раствора Фолина, непрерывно перемешивают, выдерживают в ультратермостате (для развития окраски) при температуре 40°С в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры, затем фотометрируют при длине волны 630—670 нм при использовании кювет с толщиной поглощающего свет слоя 5 мм.

Оптическую плотность испытуемых растворов измеряют по отношению к контрольной пробе (воде).

Значение оптической плотности для ферментных препаратов должно находиться в диапазоне 0,15—0,70.

В случае отклонения оптической плотности от указанной необходимо подобрать такое разведение препарата, чтобы оптическая плотность укладывалась в данные пределы.

3.4. Обработка результатов

Протеолитическую активность (*ПС*), ед/г, вычисляют по формуле

$$ПС = \frac{4{,}7 \cdot D + 0{,}1}{m} \cdot 1000, \qquad (2)$$

где D — значение оптической плотности испытуемых растворов;

m — масса ферментного препарата в фильтрате, взятом для развития окраски мг;

4,7 и 0,1 — постоянные коэффициенты, полученные экспериментально, г/ч;

1000 — переводной коэффициент милиграмм в граммы.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое значение активностей, полученных при анализе двух параллельных навесок препарата.

Относительное допускаемое расхождение между значениями активностей двух параллельных навесок не должно превышать 5%. Результат округляют до первого десятичного знака.

Предел возможных значений относительной погрешности измерений протеолитической активности при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ составляет 5%.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Министерством медицинской и микробиологической промышленности СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

А. Н. Саприн, д-р. биолог. наук; **А. В. Гарбузов**, канд. биолог. наук; **В. М. Лаврухина**

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 02.03.88 № 440

3. Срок первой проверки — 1992 г.

Периодичность проверки — 5 лет

4. **ВЗАМЕН ГОСТ 20264.2—74**

5. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта
ГОСТ 61—75	2.2
ГОСТ 83—79	2.2, 3.1
ГОСТ 215—73	2.2
ГОСТ 1770—74	2.2
ГОСТ 2156—76	3.1
ГОСТ 3118—77	2.2
ГОСТ 4109—79	2.2
ГОСТ 4328—77	2.2
ГОСТ 5072—79	2.2
ГОСТ 5850—72	2.2
ГОСТ 6552—80	2.2
ГОСТ 6709—72	2.2
ГОСТ 9656—75	2.2
ГОСТ 10931—74	2.2
ГОСТ 12026—76	2.2
ГОСТ 12083—78	2.2
ГОСТ 14919—83	2.2
ГОСТ 18289—78	2.2
ГОСТ 20264.0—74	Раздел 1
ГОСТ 20292—74	2.2
ГОСТ 24104—80	2.2
ГОСТ 25336—82	2.2

Группа С09

Изменение № 1 ГОСТ 20264.2—88 Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 21.12.89 № 3952

Дата введения 01.07.90

Пункт 2.2. Заменить ссылку: ГОСТ 24104—80 на ГОСТ 24104—88; исключить ссылку: ГОСТ 5850—72.

(Продолжение см. с. 296)

(Продолжение изменения к ГОСТ 20264.2—88)

Пункт 2.4. Экспликация к формуле. Заменить единицу и слова: $см^3$/мкмоль на мкмоль/$см^3$; «m — масса ферментного препарата, взятая на протеолиз, мг» на «m — масса ферментного препарата, взятая на протеолиз (расчет ведется на 1 $см^3$ ферментного раствора), мг».

(ИУС № 4 1990 г.)

Редактор *Н. В. Бобкова*
Технический редактор *И. Н. Дубина*
Корректор *Е. А. Богачкова*

Сдано в наб. 21.03.88 Подп. в печ. 03.05.88 1,0 усл. п. л. 1,0 усл. кр.-отт. 0,75 уч.-изд. л.
Тираж 8 000 Цена 5 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123840, Москва, ГСП, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 2068

gost.e-ecolog.ru