

20264.2-88



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ  
СОЮЗА ССР

**ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ**  
**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ**  
**АКТИВНОСТИ**

**ГОСТ 20264.2-88**

Издание официальное

Б3.1-88/33

Цена 5 коп.



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ  
Москва

**ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТНЫЕ****Методы определения протеолитической активности**Enzymatic 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°C казеинат натрия в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве, соответствующем 1 мкмолью 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.



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  $\pm 0,1$  единиц pH.

Мешалка магнитная любого типа, обеспечивающая 3000 об/мин.

Термостат любого типа, обеспечивающий температуру нагрева  $40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ .

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

Секундомер по ГОСТ 5072-79.

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

Холодильник бытовой любой марки.

Электроплитка с терморегулятором по ГОСТ 14919-83.

Баня водяная любого типа.

Холодильник ХСВО 10 XC по ГОСТ 25336-82.

Стаканы любого типа и исполнения вместимостью 100, 250, 600, 1000 и 2000 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74.

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

Цилиндры любого исполнения вместимостью 50 и 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74.

Пипетки любого исполнения вместимостью 1, 2, 5 и 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292-74.

Бюretки 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/л.

Кислота сертрафосфорная по ГОСТ 6552-80, раствор с массовой долей кислоты 85% и раствор концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

Кислота борная по ГОСТ 9656—75, раствор концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

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/дм<sup>3</sup> и 0,2 моль/дм<sup>3</sup>.

Бром по ГОСТ 4109—79.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, раствор концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> и 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

Натрий казеинновокислый (казеиннат натрия).

Натрий углекислый по ГОСТ 83—79, раствор концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup>.

Тирозин.

Кислота трихлоруксусная (ТХУ).

Фенолфталеин по ГОСТ 5850—72.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

#### П р и м е ч а н и я:

1. Все реактивы должны быть марки х. ч. или ч. д. а., кроме трихлоруксусной кислоты, которая используется марки 9.
2. Допускается использование импортной посуды и приборов с аналогичными техническими характеристиками.

### 2.3. Подготовка к испытанию

#### 2.3.1. Приготовление универсального буферного раствора У<sub>б1</sub> концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

Для приготовления универсального буферного раствора У<sub>б1</sub> готовят растворы концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>: 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/дм<sup>3</sup> получают буферные растворы:

- a) pH реакционной смеси  $2,5 \pm 0,2$  и  $5,5 \pm 0,2$  (для кислых протеиназ);
- б) pH реакционной смеси  $7,2 \pm 0,2$  (для нейтральных протеиназ);
- в) pH реакционной смеси  $9,5 \pm 0,2$  (для щелочных протеиназ).

#### 2.3.2. Приготовление универсального буферного раствора У<sub>б2</sub> концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup>.

Для приготовления универсального буферного раствора У<sub>б2</sub> готовят растворы А, В и С концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup> и смешивают их в равных соотношениях.

#### 2.3.3. Приготовление универсального буферного раствора У<sub>б3</sub> концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup>

Универсальный буферный раствор Уб<sub>3</sub> готовят смешиванием девяти объемов дистиллированной воды с одним объемом буферного раствора Уб<sub>1</sub>.

### 2.3.4. Приготовление реактива Фолина (основной раствор)

Для приготовления основного раствора Фолина в круглодонную колбу с пришлифованным обратным холодильником вместимостью 2000 см<sup>3</sup> наливают 700 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, добавляют 100,00 г вольфрамокислого натрия и 25,00 г молибденокислого натрия. Затем приливают 50 см<sup>3</sup> ортофосфорной кислоты с массовой долей 85% и 100 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> (при необходимости фильтруют через трубку Аллана, 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/дм<sup>3</sup> по фенолфталеину. Реактив Фолина должен быть концентрацией 2 моль/дм<sup>3</sup> по кислоте. Если кислотность реактива Фолина больше 2 моль/дм<sup>3</sup>, то его разбавляют дистиллированной водой, если меньше — реагент 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 Аисона 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<sub>1</sub> с соответствующим pH реакционной смеси. Затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, 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 (рН 2,5)**

2,000 г воздушно-сухого казеината натрия растворяют в 90 см<sup>3</sup> буферного раствора Уб<sub>3</sub> с рН 5,5. Затем раствор доводят до рН 2,5 добавлением 3,0-3,5 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>.

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

Затем раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят объем до метки буферным раствором Уб<sub>1</sub> с рН 2,5.

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

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

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

Затем раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят объем до метки буферным раствором Уб<sub>1</sub> соответствующего рН.

**Примечания:**

1. Для сокращения времени растворения казеината натрия раствор готовят при нагревании до температуры 70°C 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<sup>3</sup> субстрата и помещают их в ультратермостат при температуре 30°C.

Примерно через 10 мин в каждую пробирку приливают по 2 см<sup>3</sup> раствора ферmenta (предварительно термостабилизированного при 30°C 3-4 мин), пробирки встряхивают и оставляют на гидро-

лиз ровно на 10 мин при температуре 30°C. Через 10 мин добавляют в обе пробирки по 4 см<sup>3</sup> 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°C еще в течение 20 мин. Затем смесь фильтруют в сухие пробирки. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен. Отбирают в пробирки с предварительно налитыми туда 5 см<sup>3</sup> раствора углекислого натрия концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup> по 1 см<sup>3</sup> фильтрата, перемешивают и быстро приливают по 1 см<sup>3</sup> рабочего раствора реагента Фолина. Дают реакционной смеси постоять 20 мин. После реакции растворы приобретают голубую окраску, интенсивность которой определяют фотоэлектрическим колориметром против контроля.

Контрольный опыт готовят, прибавляя реагенты в обратной последовательности: для этого в контрольную пробирку наливают 2 см<sup>3</sup> ферментного раствора того же разведения, как и в опыте, добавляют 4 см<sup>3</sup> ТХУ, выдерживают в ультратермостате при температуре 30°C в течение 10 мин, а затем вносят 2 см<sup>3</sup> субстрата. Через 20 мин нахождения в термостате раствор фильтруют, отбирают в сухую пробирку с предварительно налитыми туда 5 см<sup>3</sup> раствора углекислого натрия концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup> 1 см<sup>3</sup> фильтрата, перемешивают, добавляют 1 см<sup>3</sup> рабочего раствора реагента 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 см<sup>3</sup> стандартного раствора. Этот эквивалент необходимо установить для каждой новой партии реагента Фолина и каждого фотоэлектрического колориметра.

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

Раствор 1. В мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> вносят 1 см<sup>3</sup> исходного раствора тирозина и доводят объем до метки раствором соляной кислоты концентрацией 0,2 моль/дм<sup>3</sup>. Концентрация тирозина ( $c_1$ ) при этом составляет  $0,2 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> или 0,02 мкмоль/см<sup>3</sup>.

Последующие растворы готовят аналогичным образом:

рассмотрение 2: 2 см<sup>3</sup> исходного раствора  $c_2 = 0,4 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> или 0,04 мкмоль/см<sup>3</sup>;

рассмотрение 3: 4 см<sup>3</sup> исходного раствора  $c_3 = 0,8 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> или 0,08 мкмоль/см<sup>3</sup>;

рассмотрение 4: 5 см<sup>3</sup> исходного раствора  $c_4 = 1,0 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> или 0,10 мкмоль/см<sup>3</sup>;

рассмотрение 5: 7,5 см<sup>3</sup> исходного раствора  $c_5 = 1,5 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> или 0,15 мкмоль/см<sup>3</sup>;

рассмотрение 6: 10 см<sup>3</sup> исходного раствора  $c_6 = 2,0 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> или 0,20 мкмоль/см<sup>3</sup>;

рассмотрение 7: 15 см<sup>3</sup> исходного раствора  $c_7 = 3,0 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> или 0,30 мкмоль/см<sup>3</sup>.

Затем берут 7 пробирок, вносят в каждую по 1 см<sup>3</sup> раствора тирозина разной концентрации и добавляют при постоянном перемешивании по 5 см<sup>3</sup> раствора углекислого натрия концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup> и 1 см<sup>3</sup> рабочего раствора Фолина.

Контрольный опыт готовят также, но вместо раствора тирозина берут 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Дают реакционной жидкости постоять в течение 20 мин.

Интенсивность окраски измеряется фотоэлектрическим колориметром против контрольной пробы в диапазоне длины 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/см<sup>3</sup>, на оси ординат — соответствующие значения оптической плотности ( $D$ ).

По градуировочной характеристике находят тирозиновый эквивалент, соответствующий оптической плотности 1 мкмоля тирозина в 1 см<sup>3</sup>.

#### 2.4. Обработка результатов

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

$$PC = \frac{D \cdot 4}{T \cdot 10 \cdot m} \cdot 1000, \quad (1)$$

где  $D$  — оптическая плотность исследуемого раствора;

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

ТЭ — тиорозиновый эквивалент, определяемый по градуировочной характеристике, см<sup>3</sup>/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°C, 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/дм<sup>3</sup> и 0,5 моль/дм<sup>3</sup>.

Натрий двууглекислый по ГОСТ 2156—76, раствор концентрацией 0,2 моль/дм<sup>3</sup>.

Трихлоруксусная кислота (ТХУ), раствор концентрацией 0,3 моль/дм<sup>3</sup>.

Натрия гидроокись, раствор концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>.

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 см<sup>3</sup>, 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<sup>3</sup> наливают 45 см<sup>3</sup> раствора углекислого натрия концентрацией 0,2 моль/дм<sup>3</sup> и 5 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> и приливают 140 см<sup>3</sup> 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°C; pH при этой температуре доводят до 10,5 добавлением (если необходимо) раствора гидроокиси натрия концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>. Далее раствор субстрата из конической колбы переводят в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup>, охлаждают проточной водой до 20°C 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<sup>3</sup> раствора казеина и выдерживают в ультратермостате при температуре 40°C в течение 5 мин.

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

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

По истечении времени гидролиза в каждую из пробирок, начиная с первой (контрольной), добавляют по 5 см<sup>3</sup> 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°C 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<sup>3</sup> фильтрата, затем медленно приливают в каждую по 5 см<sup>3</sup> раствора углекислого

натрия концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup> и по 1 см<sup>3</sup> рабочего раствора Фолина, непрерывно перемешивают, выдерживают в ультратермостате (для развития окраски) при температуре 40°C 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

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

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 миллиграмм 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. биол. наук; А. В. Гарбузов, канд. биол. 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 I
ГОСТ 20292-74	2.2
ГОСТ 24104-80	2.2
ГОСТ 25336-82	2.2

# С. СЕЛЬСКОЕ И ЛЕСНОЕ ХОЗЯЙСТВО

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)

---

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

(НУС № 4 1990 г.)

Редактор *Н. В. Бобкова*

Технический редактор *И. Н. Дубина*

Корректор *Е. А. Богачкова*

Сдано в наб. 21.03.88 Подл. в печ. 03.05.88 1,0 усл. п. л. 1,0 усл. кр.-отт. 0,73 уч.-изд. ж.  
Тираж 8 000 Цена 5 юн.

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