

## Imunochemické stanovení kvasničných proteas v pivu

Ing. LADISLAV FUKAL, Ing. ALENA KOWALCZYKOVÁ a Ing. Jan KÁŠ, CSc., katedra biochemie a mikrobiologie VŠCHT, Praha

663.41:577.152.34

### ÚVOD

Existence intracelulární proteolytické aktivity u kvasinek je známa již z konce 19. století [1]. O výskytu proteolytických enzymů z pivovarských kvasinek v pivu však není v odborné literatuře mnoho údajů [2, 3]. Vzhledem k tomu, že v mladíně i v hotovém pivu je značná koncentrace aminokyselin a nízkomolekulárních peptidů, nepředpokládá se, že by při hlavním kvašení či dokvašování probíhala sekrece proteas z živých kvasničných buněk. Proteolytické enzymy se dostávají z kvasinek do piva spíše při jejich autolýze [2, 3]. Mnohem více autorů se zabývalo proteasami z autolýzátů čistých kvasničných kultur ať již pekařského droždí či pivovarských kvasnic [4–7]. Avšak teprve v minulém desetiletí se s rozmachem sloupcové chromatografie podařilo separovat a charakterizovat intracelulární proteolytické enzymy z autolýzátu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Jejich přehled je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled intracelulárních proteolytických enzymů z autolýzátu *Saccharomyces cerevisiae*

Proteolytický enzym	Relativní molekulová hmotnost	Citace
endoproteinasa A	41 700	[8, 10–14]
endoproteinasa B		[8, 11]
karboxypeptidasa Y		[9, 10, 15]
(dříve endoproteinasa C)	61 000	[16, 23, 24]
karboxypeptidasa S		[17]
dipeptidasa	120 000	[22]
aminopeptidasy — I	640 000	[18, 19, 22]
— II	200 000	[20, 22]
— III	(85 000)	
	34 000	[20–22]

Kvasničné proteasy jsou predominantně lokalizovány v buněčných vakuolách, zatímco jejich specifické bílkovinné inhibitory [12, 25] se nacházejí v cytosolu [26, 27]. V posledních letech bylo ukázáno, že biologickou funkcí proteolytických enzymů kvasinek není jen štěpení proteinů ve vakuolách a extravakuolární degradace proteinů jako součást metabolického obratu bílkovin, ale též glukosou indukovaná inaktivace cytoplasmatické malátde-

hydrogenasy a fruktoso-1,6-bis-fosfatasy [28–31], inaktivace tryptofansyntetasy proteinasou A a B [32, 33], inaktivace uridinnukleosidasy proteinasou A [13], aktivace chitinsyntetasy proteinasou B [34, 35] a mnoho jiných více či méně specifických proteolytických aktivací, inaktivací a modifikací enzymů, jakožto součást regulačních mechanismů, které adaptují buněčný metabolismus na změny nutričních podmínek [36–40].

Saheki et al. [12, 41] navrhli pro vzájemné vztahy mezi proteinasami A, B a karboxypeptidasou Y a jejich inaktivními komplexy se specifickými bílkovinnými inhibitory schéma, podle něž působí proteinasa A aktivně na neaktivní komplexy obou dalších proteas a proteinasa B zase aktivuje neaktivní komplex proteinasy A s inhibitorem. Uvedené aktivace spočívají v proteolytickém štěpení inhibitorů.

Výjimečná je v oblasti kvasničných proteas práce Maddoxe a Hougha [42], kteří provedli srovnání proteas z lyzovaných buněk, z lyzovaného protoplastu a extracelulárních proteas *Saccharomyces carlbergensis*. Proteolytické enzymy sekretované živými kvasinkami jsou glykoproteiny stejně jako proteasy z autolýzátu, ale optimální hodnotou pH a termostabilitou jsou podobné spíše proteasám z lyzovaného protoplastu.

Při stanovení proteolytické aktivity v pivech upravených enzymovými stabilizačními preparáty se často diskutuje o původu prokázané proteolytické aktivity a spolehlivosti dosažených výsledků. Z těchto důvodů jsme se zabývali možností specifického stanovení kvasničných proteas v pivu. Z konfrontace našich výsledků stanovení papainu v pivu imunochemickými metodami [43] s výsledky metody užívající ke stanovení proteas bílkovinný substrát značený radionuklidem [44] vyplynulo, že některá piva vykazují nízkou proteolytickou aktivitu, která nepochází z enzymových stabilizátorů.

### MATERIÁL A METODY

#### Materiál

Pivovarské kvasinky byly získány ze spilek pivovarů Staropramen a Budvar. Agarosa, Sephadex G-100 a DEAE-Sephadex A-50 byly získány od firmy Pharmacia, Uppsala, Švédsko; agar od firmy Difco, Detroit, USA; „hide powder azure“ (HPA) a N-benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPA) od firmy Calbiochem, Luzern, Švýcarsko.



N-tosyl-DL-arginin-p-nitroanilid (TAPA) byl syntézován Ing. E. Kasáříkem, CSc. z VÚFB v Praze. Vzorčky pív byly získány z maloobchodní sítě.

### Desintegrace

Desintegrace kvasničných buněk byla provedena těmito způsoby:

a) 1 kg kvasničné pasty byl suspendován v 450 ml chloroformu při 25 °C. Po 1 h bylo přidáno 450 ml destilované vody, pH bylo upraveno na 7,0 a suspenze pak ponechána 18 h při 25 °C.

b) 10% suspenze kvasinek ve fyziologickém roztoku byla desetkrát střídavě zmrazována při -4 °C a rozmrazována při 30 °C.

c) 10% suspenze kvasinek ve fyziologickém roztoku byla desintegrována na homogenizátoru Manton-Gaulin za použití systému s periodickým recyklem.

Po provedených desintegracích byly suspenze odstředěny při 3000 × g 40 minut. Hodnota pH supernatantu byla upravena na 5,0 a po 18 h stání při teplotě 25 °C byla vzniklá sraženina odstraněna centrifugací. K supernatantu byl přidán síran amonný do 95 % nasycení při pH 5,0. Po 2 h stání byl precipitát odstředěn a rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a potom dialyzován proti 0,01 M fosfátovému pufru s 0,1 M NaCl při 4 °C.

### Gelová chromatografie

2 ml vzorku kvasničného extraktu byly aplikovány na sloupec Sephadexu G-100 1,5 × 80 cm v koloně Pharmacia K 16/90. Eluce byla prováděna 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,0 při eluční rychlosti 18 ml · h<sup>-1</sup>.

### Ionexová chromatografie

10 ml vzorku kvasničného extraktu bylo naneseno na sloupec DEAE-Sephadexu A-50 2,5 × 15 cm v koloně Pharmacia R 25/45. K eluci byl použit gradient NaCl 0 — 1 mol · l<sup>-1</sup> v 0,05 M Tris-HCl pufru.

### Stanovení proteolytické aktivity

Byly modifikovány metody stanovení proteolytické aktivity s hemoglobinem denaturovaným močovinou [45], s HPA [46], s BAPA [47] a TAPA [48] tak, aby koncentrace vzorku proteas v reakční směsi byla vždy stejná a aby reakce probíhala v oblasti saturace substrátem.

### Imunizace

Imunizace byly provedeny na samcích králíčího plemene Novozélandský bílý. 1 ml extraktu kvasinek či chromatografické frakce byl injikován králíkovi s 1 ml kompletního Freundova adjuvans subkutánně a intramuskulárně celkem dvakrát s dvoutýdenní přestávkou. Imunizace byla provedena na šesti králících. Vznikl protilátka byl kontrolován v průběhu imunizace Ouchterlonyho difúzní metodou. Nakonec byly králíci vykrveni, krev nechána srazit a centrifugací získané antisera uchovávala při -20 °C.

### Imunochemické metody

Byly použity imunochemické difúzní metody v gelové vrstvě, a to dvojitá difúze [49], jednoduchá radiální difúze [50], imunoelktroforéza [51] a dvoudimenzionální imunoelktroforéza [52].

Dvojitá difúze: 1,6 g agaru bylo rozpuštěno ve 100 ml 0,05 M veronalového pufru pH 8,4 na vroucím vodní lázni. Roztok byl nalit na skleněné desky tak, aby vznikla po celé ploše stejně vysoká vrstva gelu. Po nanesení antisera a antigenu do vykrojených jamek byly desky umístěny do vlhké komůrky. Difúze antisera a antigenu probíhala 18 h při laboratorní teplotě.

Jednoduchá radiální difúze: K jednomu dílu 2,6 % roz-

toku agaru či agarosy v 0,05 M veronalovém pufru pH 8,4 byl při teplotě 50 °C přidán jeden díl vhodně naředěného antisera. Ze vzniklého roztoku byly připraveny vrstvy gelu na skleněných deskách. Po nanesení antigenu do vykrojených jamek probíhala difúze 24 h. Plocha kruhových precipitátů byla měřena IDP měřítkem (Sevac, Praha).

**Imunoelktroforéza:** Do vrstvy 1,6 % agarosy v 0,05 M veronalovém pufru pH 8,4 na skleněné destičce byly podle šablony vykrojeny kanálky a jamky. Do jamek nanesený antigen byl elektroforeticky rozdělen podél kanálků (souprava na imunoelktroforézu IEP-2, Sevac, Praha; potenciální spád 8 V · cm<sup>-1</sup> po dobu 2,5 h). Precipitační linie vzniknou po difúzi antisera z kanálků proti elektroforeticky rozdělené směsi antigenů.

**Dvoudimenzionální imunoelktroforéza:** Nejprve byly komponenty vzorku rozděleny elektroforeticky v jednom směru (1 % agarosa v 0,02 M veronalovém pufru pH 8,6, 60 — 90 minut, 8 — 10 V · cm<sup>-1</sup>). Potom byl na skleněnou destičku s proužkem gelu obsahujícím elektroforeticky rozdělený vzorek nalit roztok 1 % agarosy s vhodným množstvím antisera tak, aby do vzniklého gelu obsahujícího antiserum mohla být provedena elektroimunodifúze ve směru kolmém na předcházející elektroforézu (2 V · cm<sup>-1</sup>, 15 — 20 h, 15 °C, Multiphore, LKB).

Zpracování destiček s gelem po imunodifúzi či elektroforéze: Přebytké bílkoviny byly z gelu vypírány ve fyziologickém roztoku 20 h i déle. Vrstva gelu byla po zabalení destiček do vlhkého filtračního papíru krátkodobě zatížena a potom usušena fénem. Precipitační zóny byly barveny amidočerní (1 g amidočerni, 20 ml kyseliny octové, 40 ml ethylalkoholu, 40 ml destilované vody). Přebytké barvivo bylo z gelu vypíráno v roztoku 2 % kyseliny octové.

### VÝSLEDKY A DISKUSE

Při řešení problematiky proteolytické aktivity v pívu jsme chtěli zjistit, do jaké míry se mohou na ní podílet proteasy pivovarských kvasinek, eventuálně tento faktor přímým důkazem vyloučit. Bylo proto nutné použít imunochemické metody. Pro přípravu antisera nezbytného k imunochemickému stanovení bylo třeba proteasy kvasinek izolovat. Vzhledem k tomu, že v přítomnosti aminokyselin v médiu nenastává sekrece extracelulárních proteas kvasinkami, zaměřili jsme pozornost na izolaci intracelulárních proteas. Izolační postup v zásadě sledoval tuto hlavní linii: desintegrace buněk, aktivace proteas, popřípadě jejich uvolnění z buněčných struktur, sražení bílkovinného komplexu v supernatantu síranem amonným, dialýza sraženiny, ultrafiltrace, gelová, popřípadě ionexová chromatografie.

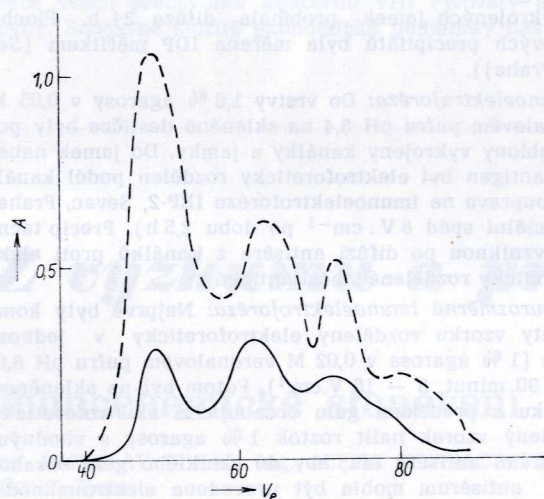
Tabulka 2. Stanovení proteolytické aktivity kvasničného extraktu

Substrát	Absorbance (nm)	Změna absorbance po reakční době	
		30 min	120 min
hemoglobin	280	0,223	0,509
HPA	595	0,120	0,290
BAPA	410	0,0	0,0
TAPA	410	0,0	0,0

Měřením proteolytické aktivity kvasničného extraktu s různými substráty byla zjištěna nevhodnost použití nízkomolekulárních syntetických substrátů pro tyto účely (tabulka 2), a to i v přítomnosti aktivátorů (cystein, EDTA, CaCl<sub>2</sub>) v reakční směsi. Překvapivá je též menší citlivost stanovení proteolytické aktivity kvasničného

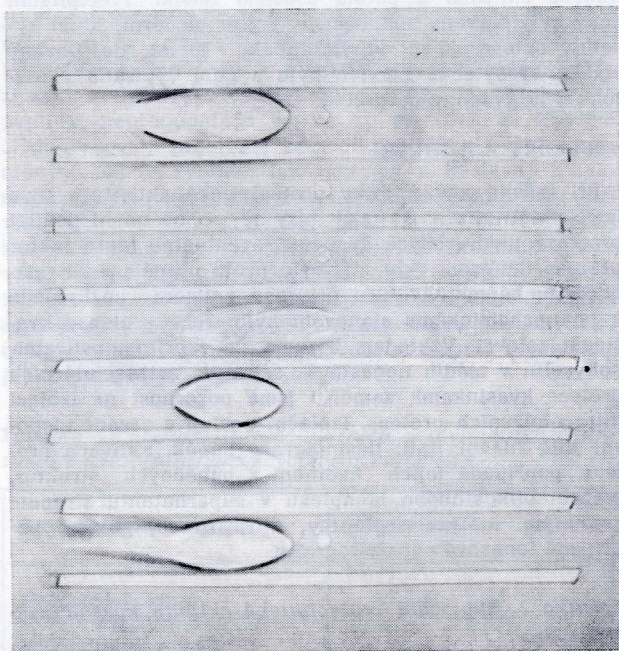


extraktu s HPA oproti stanovení s hemoglobinem, což kontrastuje s vysokou citlivostí stanovení aktivity některých proteas s tímto chromogenním substrátem [46].



Obr. 1. Eluční křivky chromatografického dělení kvasničného extraktu na koloně Sephadexu G-100

A = absorbance při 280 nm;  $V_e$  = eluční objem (ml); ---- = bílkovina; — = proteolytická aktivita stanovená s hemoglobinem



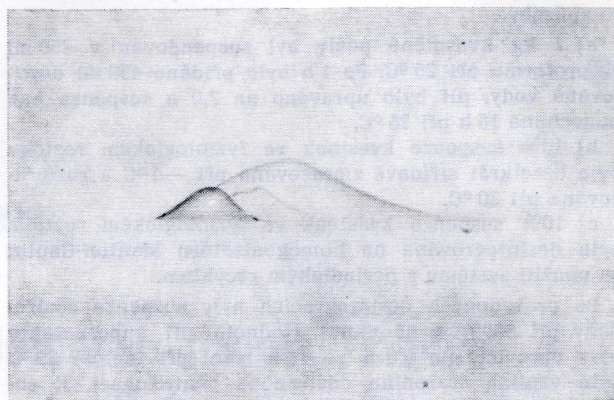
Obr. 2. Rozdělení antigenů extraktu pivovarských kvasinek imunoelktroforézou

Shora dolů: extrakt — frakce č. 6 (z dělení extraktu na sloupci Sephadexu G 100) — frakce č. 5 — frakce č. 4 — frakce č. 3 — frakce č. 2 — frakce č. 1

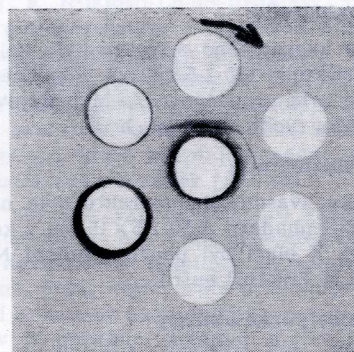
Z kvasničného extraktu byly gelovou chromatografií na Sephadexu G-100 izolovány tři proteolytické frakce (obr. 1). Optimální hodnoty pH pro hydrolýzu hemoglobinového substrátu těmito frakcemi jsou 3, 5 a 8. Maddox a Hough [42] uvádějí hodnoty optimálního pH pro štěpení hemoglobinu čtyřmi proteasami z autolýzáta kvasinek 2,9; 6,3; 6,6; 8,2.

Kvasničný extrakt i jednotlivé frakce po chromatografii byly použity k imunizaci králíků. Imunochemickou

metodou podle Ouchterlonyho bylo ověřeno, že získaná antiséra neposkytují precipitační linie s mladinou, sladinou, papainem, bromelainem, ficinem ani s trypsinem a pepsinem. Metodou imunoelktroforézy (obr. 2) a

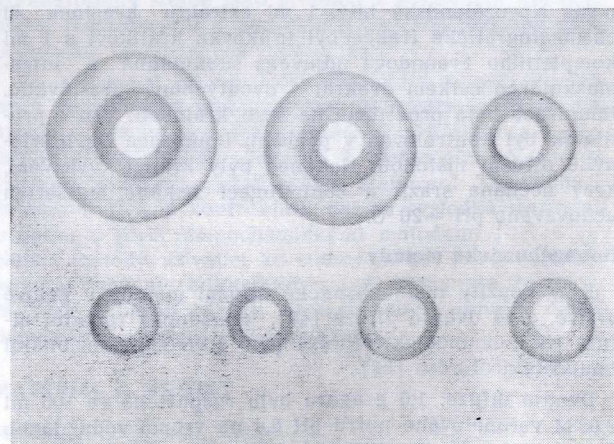


Obr. 3. Rozdělení antigenů extraktu pivovarských kvasinek dvourozměrnou imunoelktroforézou (2,5 % anti-sérum)



Obr. 4. Ukázka stanovení citlivosti a speciifičnosti detekce antigenů extraktu pivovarských kvasinek metodou dvojité difúze

Centrální jamka: anti-sérum. Obvodové jamky: extrakt — extrakt 1 : 100 — extrakt 1 : 1000 — 0,5 % roztok papainu — 0,5 % roztok bromelainu



Obr. 5. Ukázka kvantitativního stanovení antigenů extraktu pivovarských kvasinek metodou jednoduché radiální difúze (5 % anti-sérum)

Horní řada: extrakt — extrakt 1 : 2 — extrakt 1 : 10  
Dolní řada: 3 různé chromatografické frakce a extrakt 1 : 50



dvourozměrné imunoelktroforézy [obr. 3] byl zjištěn počet antigenních komponentů v kvasničném extraktu a jejich rozdělení do jednotlivých frakcí získaných chromatografií.

Dále byla zkoušena kvalita získaných antisér zjištěním mezi stanovení imunochemických metod dvojité difúze [obr. 4] a jednoduché radiální difúze [obr. 5] při stanovení autolyzovaných buněk. Oběma metodami bylo možno prokázat autolýzu odpovídající 0,1 % koncentraci buněk, což je asi  $1,7 \cdot 10^6$  buněk v 1 ml.

Prostřednictvím uvedených dvou metod pak byly analyzovány vzorky piva na přítomnost kvasinkových intracelulárních antigenů, především proteas. Pozitivní precipitační reakci se všemi antiséry dávalo po přesrážení síranem amonným (zkonzentrováno 20krát) pouze pivo jednoho pivovaru. Kromě dvou pak dávala analyzovaná lahvová piva ostatních 12 pivovarů pozitivní reakci s antisérem proti surovému extraktu kvasinek po 14 dnech inkubace při 28 °C, kdy se v pivech pomnožily a auto-lyzovaly kvasinky.

Podle zjištění Kusunoseho et al. [53] jsou některé proteasy kvasinek vázány na jejich buněčnou stěnu. Tyto proteasy se nepodařilo uvolnit z buněčných stěn po autolýze kvasinek ani působením detergentů, ani mechanicky, ani působením přidaných proteolytických enzymů, ale jen účinkem komerčního preparátu Zymolase-60 000 lyzujícího buněčnou stěnou kvasinek. Při izolaci extraktu kvasinek pro imunizaci v předkládané práci nebyly zřejmě tyto proteasy uvolněny. Proteolytickým preparátem nestabilizované 10 % pivo, které při stanovení s  $^{125}\text{I}$ -serovým albuminem vykazuje proteolytickou aktivitu [44], však nedává pozitivní reakci s antisérem proti intracelulárním antigenům kvasinek. Tento nesoulad lze vysvětlit tím, že zjištěná proteolytická aktivita je způsobena proteasami vázanými na buněčnou stěnu, proti nimž použité antisérum neobsahovalo protilátky, resp. bylo málo citlivé. Je třeba rovněž vzít v úvahu problémy s aktivací proteas po desintegraci kvasničných buněk při izolačním postupu [54, 57].

Podle některých našich výsledků z prací zabývajících se faktory ovlivňujícími imunoreaktivitu a proteolytickou aktivitu papainu [55, 56] je možné usuzovat, že vnějšími faktory vzniklé změny v terciární struktuře kvasničných proteas by mohly ovlivňovat jejich katalytickou aktivitu a imunoreaktivitu nestejnou měrou.

Závěrem je možno konstatovat, že podíl proteas pivovarských kvasinek na proteolytické aktivitě piva byl potvrzen, avšak spolehlivé uplatnění nových citlivých technik stanovení enzymových aktivit i aplikace imunochemických technik ve složitém a především variabilním prostředí piva si vyžádá ještě mnoho experimentálního úsilí. Při technologii používané v našich předních pivovarech nepřichází proteolytická aktivita z kvasinek prakticky v úvahu. Kvasinková proteolytická aktivita byla detekována jen v pivech některých menších pivovarů a jen v letním období.

## Poděkování

Děkujeme paní Mileně Prosické a Dr. Eduardu Paluskovi, CSc. z Ústavu hematologie a krevní transfuse v Praze za provedené imunizace králíků.

## Literatura

- GERET L., HAHN M.: Chem. Ber. **31**, 1898, s. 202
- HAZIRNAJA M. V.: Izv. Vyšších Učeb. Zavedenii, Piščevaja Technol. č. 4, 1963, s. 76
- HOUGH J. S., BRIGGS D. E., STEVENS R.: V „Malting and Brewing Science“, Londýn 1971, s. 485
- WILLSTAETTER R., GRASSMAN W.: Z. Physiol. Chem. **153**, 1926, s. 250
- MACRAE F. T.: Biochem. J. **27**, 1933, s. 1229
- FÉLIX F., LABOUESSE - MERCOUROFF J.: Biochim. Biophys. Acta **21**, 1956, s. 303
- FÉLIX F., BROUILLET N.: Biochim. Biophys. Acta **122**, 1968, s. 127
- HATA T., HAYASHI R., DOI E.: Agr. Biol. Chem., **31**, 1967, s. 150
- DOI E., HAYASHI R., HATA T.: Agr. Biol. Chem. **31**, 1967, s. 160
- HATA T., TAYASHI R., DOI E.: Agr. Biol. Chem. **31**, 1967, s. 357
- LENNEY J. F., DALBEC J. M.: Arch. Biochem. Biophys. **120**, 1967, s. 42
- SAHEKI T., MATSUDA Y., HOLZER H.: Eur. J. Biochem. **47**, 1974, s. 325
- MAGNI G., PALLOTTA G., NATALINI P., RUGGIERI S., SANTARELLI I., VITA A.: J. Biol. Chem. **253**, 1978, s. 2501
- MEUSSDOERFFER F., TORTORA P., HOLZER H.: J. Biol. Chem. **255**, 1980, s. 12087
- AIBARA S., HAYASHI R., HATA T.: Agr. Biol. Chem. **35**, 1971, s. 658
- HAYASHI R., MOORE S., STEIN W. H.: J. Biol. Chem. **248**, 1973, s. 2296
- WOLF D. H., WEISER U.: Eur. J. Biochem. **73**, 1977, s. 553
- HERRMANN V., KNACK I., ROEHM K. H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 1978, s. 47
- METZ G., ROEHM K. H.: Biochim. Biophys. Acta **429**, 1976, s. 933
- MATSUDA T., HAYASHI R., HATA T.: Agr. Biol. Chem. **39**, 1975, s. 499
- TJEDER A.: Acta Chem. Scand. **20**, 1966, s. 1442
- FREY J., ROEHM K. H.: Biochim. Biophys. Acta **527**, 1978, s. 31
- HAYASHI R., AIBARA S., HATA T.: Biochim. Biophys. Acta **212**, 1970, s. 359
- SVENDSEN I., MARTIN B. M., VISWANATHA T., JOHANSEN J. T.: Carlsberg Res. Commun. **47**, 1982, s. 15
- BETZ H., HINZE H., HOLZER H.: J. Biol. Chem. **249**, 1974, s. 4515
- MATERN H., BETZ H., HOLZER H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **60**, 1974, s. 1051
- LENNEY J. F., MATILE P., WIEMKEN A., SCHELLENBERG M., MEYER J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **60**, 1974, s. 1378
- SAHEKI T., HOLZER H.: Tokaj J. Exp. Clin. Med. **1**, 1976, s. 115
- NEEFF J., HAEGELE E., NAUHAUS J., HEER U., MECKE D.: Eur. J. Biochem. **87**, 1978, s. 489
- GANCEDO C.: J. Bacteriol. **107**, 1971, s. 401
- MOLANO J., GANCEDO C.: Eur. J. Biochem. **44**, 1974, s. 213
- KATSUNUMA T., SCHOETT E., ELSAESSER S., HOLZER H.: Eur. J. Biochem. **42**, 1974, s. 621
- SAHEKI T., HOLZER H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **53**, 1973, s. 552
- CABIB E., ULANE R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **50**, 1973, s. 186
- HOLZER H., BETZ H., EBNER E.: Curr. Top. Cell. Regul. **9**, 1975, s. 103
- HOLZER H.: Trends Biochem. Sci. **1**, 1976, s. 178
- SWITZER R. L.: Annu. Rev. Microbiol. **31**, 1977, s. 135
- BECK I., FINK G. R., WOLF D. H.: J. Biol. Chem. **255**, 1980, s. 4821
- MECHLER B., WOLF D. H.: Eur. J. Biochem. **121**, 1981, s. 47
- SAHEKI T., HOLZER H.: Biochim. Biophys. Acta **384**, 1975, s. 203
- MADDOX I. S., HOUGH J. S.: Biochem. J. **117**, 1970, s. 843
- FUKAL L., KÁŠ J., PALUSKA E.: Sborník VŠCHT v Praze E53, 1982, s. 147
- RAUCH P., FUKAL L., KÁŠ J.: Proceedings of the First European Conference on Food Chemistry, Vienna 1981, publ. 1982, s. 240
- ANSON M. L.: J. Gen. Physiol. **22**, 1938, s. 79
- RINDERKNECHT H., GEOKAS M. C., SILVERMAN P., HAVERBACK B. J.: Clin. Chim. Acta **21**, 1968, s. 197
- ERLANGER B. F., KOKOWSKY N., COHEN W.: Arch. Biochem. Biophys. **95**, 1961, s. 271
- KASAFIREK E., CHAVKO M., BARTÍK M.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. **36**, 1971, s. 4070
- OUCHTERLONY O.: Arkiv Kemi **1**, 1949, s. 43
- MANCINI G., CARBONARA A. O., HEREMANS J. F.: Immunochemistry **2**, 1965, s. 235
- SCHEIDEGGER J. J.: Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol. **7**, 1955, s. 103
- CLARKE H. G. M., FREEMAN T.: V „Prot. Biol. Fluids“, Peeters S. H. (Ed.), **14**, s. 503, Elsevier, Amsterdam 1967
- KUSUNOSE M., NAKANISHI T., MINAMIURA N., YAMAMOTO T.: Agric. Biol. Chem. **44**, 1980, s. 2779
- SCHWENCKE J.: Anal. Biochem. **118**, 1981, s. 315
- FUKAL L., RAUCH P., KÁŠ J.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **176**, 1983
- FUKAL L., MAREK M., KÁŠ J.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **176**, 1983
- BEHALOVÁ B., BERAN K.: Folia Microbiol. **24**, 1979, s. 455
- J. Biochem. **27**, 1972, s. 520



**Fukal, L. - Kowalczyková, A. - Káš, J.: Imunochemické stanovení kvasničných proteas v pivu.** Kvas. prům. 29, 1983, č. 5, s. 98—102.

Experimentální práce navazuje na literární přehled dosavadních znalostí o kvasničných intracelulárních proteasách. Nejprve byl izolován extrakt z pivovarských kvasinek. Tímto extraktem a dále proteolytickými frakcemi z jeho dělení gelovou a ionexovou chromatografií byly imunizováni králíci. Získaná antiséra byla použita k rozlišení antigenů ve frakcích kvasničného autolysátu a ke stanovení kvasničných intracelulárních antigenů v pivu, a to prostřednictvím imunochemických metod v gelové vrstvě jako jsou imuno elektroforéza, dvou- rozměrná imuno elektroforéza, dvojité difúze a jednoduchá radiální difúze.

V závěru je diskutován případ, kdy enzymově nestabilizované pivo vykazovalo proteolytickou aktivitu, a přesto imunochemické stanovení bylo negativní. Dosažené výsledky prokázaly, že výskyt kvasničných proteas v pivu není běžný.

**Фукал, Л., Ковальчикова, А., Каш, Я.: Иммунохимическое установление дрожжевых протеаз в пиве.** Квас. прум. 29, 1983, № 5, стр. 98—102.

Экспериментальная работа продолжает тему литературного обзора по современным сведениям о дрожжевых интрацеллюлярных протеазах. Сначала изолировали экстракт из пивоваренных дрожжей. Этим экстрактом и далее протеолитическими фракциями из его разделения при помощи гелевой и ионнообменной хроматографии была проведена иммунизация кроликов. Полученные антисыворотки были применены для определения антигенов в фракциях дрожжевого автолизата и для установления дрожжевых интрацеллюлярных антигенов в пиве, и то посредством иммунохимических методов в слое геля, как иммуноэлектрофорез, двумерный иммуноэлектрофорез, двойная диффузия и простая радиальная диффузия. В заключение обсуждается случай, когда энзимно нестабилизированное пиво показывало протеолитическую активность, несмотря на то, что иммунохимическое определение было отрицательное. Достиженные результаты доказали, что наличие дрожжевых протеаз в пиве не является явлением обычным.

**Fukal, L. - Kowalczyková, A. - Káš, J.: Immunochemical Determination of Yeasts' Proteases in Beer.** Kvas. prům. 29, 1983, No. 5, p. 98—102.

Experimental work is focused on a determination of intracellular proteases in yeasts. An extract of brewing yeasts was isolated at first. This extract was divided into proteolytic fractions by gel and ion-exchange chromatography.

The proteolytic fractions were used for the immunization of rabbits. The antisera obtained were used for a distinction of antigens in the fractions of yeast autolysate and for a determination of intracellular antigens of yeasts in beer. Immunochemical methods such as immunoelectrophoresis, two-dimensional immunoelectrophoresis, double diffusion, and single radial diffusion for the distinction of antigens were applied. At the end, one example is discussed: The beer without enzymatic stabilization showed the proteolytic activity despite of the negative immunochemical determination. The results proved that the presence of yeast proteases in beer is not usual.

**Fukal, L. - Kowalczyková, A. - Káš, J.: Imunochemische Bestimmung der Hefeproteasen im Bier.** Kvas. prům. 29, 1983, No. 5, S. 98—102.

Vor den Ergebnissen der experimentalen Arbeit wird eine Recherche Übersicht der bisherigen Erkenntnisse über intrazelluläre Hefeproteasen angeführt. Zuerst wurde der Extrakt aus Brauereihefen isoliert. Mit diesem Extrakt und mit den proteolytischen Fraktionen aus seiner Auftrennung mittels Gel- und Ionexchromatographie wurden Kaninchen immunisiert. Die gewonnenen Antisera wurden zur Unterscheidung der Antigene in den Fraktionen des Hefe-Autolysats und zur Bestimmung der intrazellulären Hefe-Antigene im Bier angewandt, und zwar bei Applikation immunochemischer Methoden in der Gelschicht wie Immunoэлектрофорез, 2-Dimensionen-Immunoэлектрофорез, doppelte Diffusion und einfache Radialdiffusion. Zum Schluß wird ein Fall diskutiert, wo ein enzymatisch nicht stabilisiertes Bier proteolytische Aktivität aufwies und die immunochemische Bestimmung dennoch negativ ausfiel. Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse beweisen, daß das Vorkommen von Hefeproteasen in Bier nicht üblich ist.