

# Porovnání metod stanovení aktivity proteolytických enzymů mikrobiálního původu

579 663

RNDr. MARIE STRNADOVÁ<sup>a</sup>, RNDr. HELENA KUČEROVÁ<sup>a</sup>, RNDr. LIBUŠE VÁCHOVÁ, CSc.<sup>a</sup>, Ing. ZUZANA SCHWARZOVÁ<sup>a</sup>, RNDr. FRANTIŠKA PALEČKOVÁ<sup>b</sup>, RNDr. ZBYNĚK ČECHMÁNEK<sup>b</sup>, RNDr. HANA HÁJKOVÁ<sup>b</sup>, Ing. PAVEL VYSKOČIL, CSc.<sup>b</sup> a RNDr. JIŘÍ CHALOUPKA, DrSc.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha, <sup>b</sup>Agrogen, JZD AK Slušovice

**Klíčová slova:** proteolytické enzymy, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, jednotka aktivity, biotechnologie enzymů, metody stanovení

## 1. ÚVOD

Extracelulární proteolytické enzymy mikrobiálního původu se široce používají v různých průmyslových odvětvích, především v chemickém průmyslu, ale i v potravinářství a dalších oblastech [1, 2, 3]. Jejich produkce zaujímá podstatnou část objemu průmyslově vyráběných enzymů. Jako hlavní producenti proteas se uplatňují různé druhy rodu *Bacillus*, především *Bacillus subtilis*, vylučující neutrální a alkalickou proteinazu (subtilizin), používanou v pracích práscích. Zajímavou proteinazu produkovanou bacily představuje i neutrální proteinasa thermolysin, jejíž využití k syntéze peptidických sladidel se experimentálně ověřuje. V praxi se při výrobě sýrů uplatňují i kyselé proteiny vylučované různými druhy rodu *Rhizopus*, které se svými vlastnostmi podobají chymosinu a slouží proto jako jeho částečná náhrada při výrobě sýrů.

Při stanovení proteolytické aktivity se používají nejrůznější metody. Z hlediska vyjadřování aktivity v kataltech by bylo nejvhodnější použití specifických nízkomolekulárních peptidových substrátů zakončených chromogenní skupinou, např. p-nitroanilidem, které jsou štěpeny pouze v jednom místě. Tyto substráty však některé proteiny nehydrolyzují a mimo to jsou často pro běžné stanovení nedostupné. Proto se obvykle užívají bílkovinné substráty, především kasein nebo azokasein, ale i hemoglobin, azokol a další. Po zastavení reakce trichloroctovou kyselinou (TCA) se stanovuje obsah hydrolytických produktů v TCA filtrátu. Při rutinním stanovení proteolytické aktivity se často využívá i schopnosti některých proteas koagulovat mléko a zjišťuje se doba, za níž se vzorek mléka srazí. Protože bílkoviny jsou proteolytickými enzymy hydrolyzovány na krátké peptidy, popř. až na aminokyseliny, vzniká problém definice enzymové jednotky. V praxi se používá celá řada jednotek a proto porovnání hodnot udávaných jednotlivými autory je často obtížné a někdy i nemožné, pokud se jako jednotka udává např. pouze přírůstek optické hustoty filtrátu nebo supernatantu po odstranění precipitované bílkoviny. I v Československu se jak ve výzkumu, tak i v praxi často setkáváme s problémem stanovení proteolytické aktivity a jejího vyjádření v definovaných jednotkách. Proto považujeme práci zaměřenou tímto směrem za aktuální.

V této práci jsme se pokusili jednotlivé metody porovnat a určit převodní koeficienty nejběžněji používaných jednotek. Soustředili jsme se při tom

na stanovení aktivit neutrálních a alkalických proteas, které jsou v praxi nejběžnější. Pokusy jsme prováděli s neutrální proteinasou z *Bacillus megaterium*, subtilizinem (alkalická proteinasa z *Bacillus subtilis*) a směsným preparátem z *Bacillus subtilis*, který obsahoval neutrální a alkalickou proteinazu v poměru 3:2. Jako základní definici jednotky jsme použili její vymezení v katalogu Sigma 1990 (s. 886), z něhož uvádíme i hodnoty specifických aktivit typické neutrální proteiny (thermolysinu) a alkalické proteiny (subtilizinu).

## 1.1 Definice jednotky proteolytické aktivity

Jedna jednotka aktivity enzymu hydrolyzuje za minutu při pH 7,5 a při 37 °C kasein na degradační produkty, které dávají barevný ekvivalent 1,0 μmolu (181 μg) tyrosinu (barevná reakce s reagens Folin-Ciocalteu).

**Specifická aktivita thermolysinu** (z *Bacillus thermolysinus* rokko)

Krystalický a lyofilizovaný enzym: 50–100 jednotek na mg bílkoviny ( $E^{1\%}_{280}$ ).

**Specifická aktivita subtilisinu Carlsberg** (z *Bacillus subtilis*)

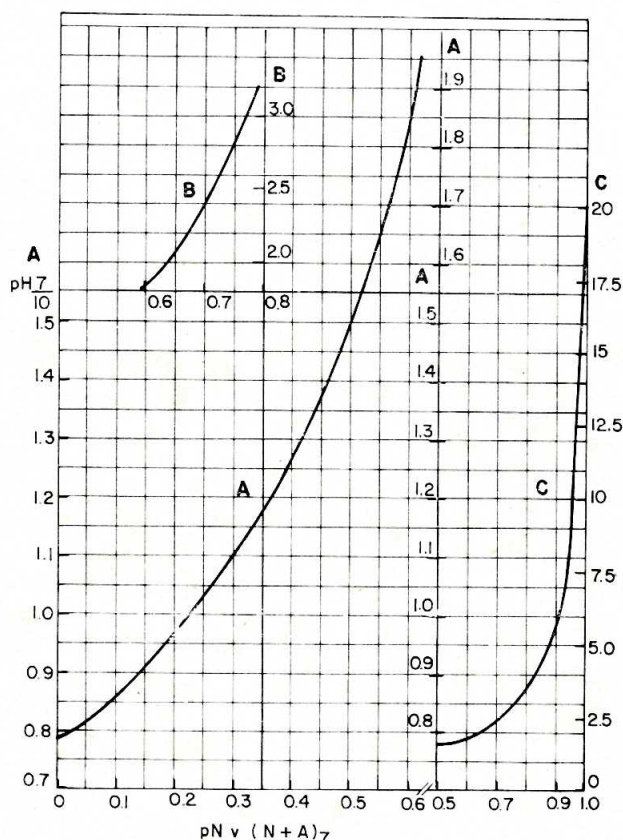
Krystalický a lyofilizovaný enzym: 7–15 jednotek na mg suchého preparátu.

## 2. STANOVENÍ PROTEOLYTICKÉ AKTIVITY HYDROLÝZOU KASEINU

### 2.1 Stanovení neutrální a alkalické proteiny *Bacillus subtilis* vedle sebe

*Bacillus subtilis*, který je nejvýznamnějším producentem průmyslově využívaných bakteriálních proteas syntetizuje a vylučuje dvě proteiny: neutrální, s optimálním pH mezi 7–7,5 a alkalickou, s optimálním pH kolem 10. Zatímco aktivita neutrální proteiny při pH vyšším než 8 rychle klesá, alkalická proteinasa si zachovává většinu aktivity i při neutrálním pH. Oba enzymy jsou produkovány téměř současně — v postexponenční fázi růstu a na počátku stacionární fáze. Pro informační stanovení souhrnné proteolytické aktivity stačí stanovit aktivitu ve vzorku při pH 7,0–7,5, pro přesné stanovení obou enzymů je nutno měřit hydrolyzu bílkovinného substrátu při pH 7,0 a 10,0 a k výpočtu použít nomogramu znázorněného na obrázku 1. Jako substrát se při stanovení obou proteas používá 1% roztok kaseinu podle Hammarstena. Kunitzova modifikace této metody je uvede-





Obr. 1. Nomogram pro výpočet aktivity neutrální a alkalické proteinasy  
pH 7/10 poměr aktivity měřený při pH 7 a 10; pN podíl aktivity neutrální (N) proteinasy při pH 7 ve vzorku obsahujícím neutrální a alkalickou proteinasu  $(N + A)_7$ . Velká písmena A, B, C určují příslušnost stupnic k jednotlivým křivkám

na např. v metodické příručce Keila a Šormové [4]. Proteolytická aktivita se vyjadřuje obvykle v tyrosinových jednotkách v 1 ml vzorku enzymu (TU/ml) — definice viz 1.1.

Při výpočtu aktivity neutrální (N) a alkalické (A) proteinasy se z poměru aktivit při pH 7 a 10 nejprve (podle nomogramu) vypočítá podíl aktivity neutrální proteinasy (pN) ve směsi obou enzymů při pH 7  $(N + A)_7$ . Aktivita neutrální proteinasy při pH 7 se vypočte podle vztahu

$$N_7 = (N + A)_7 \cdot pN$$

kde  $(N + A)_7$  je aktivita neutrální a alkalické proteinasy stanovená při pH 7

pN je podíl aktivity neutrální proteinasy ve směsi stanovené při pH 7 (zjistí se z nomogramu na obr. 1)

Aktivita alkalické proteinasy při pH 10 se vypočte ze vztahu

$$A_{10} = \frac{(N + A)_7 - [N_7]}{0,78}$$

kde  $(N + A)_7$  a  $[N_7]$  jsou definovány výše.

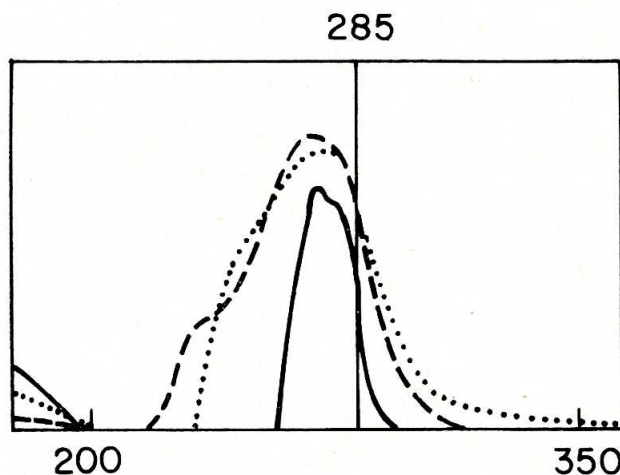
Faktor 0,78 udává reziduální aktivitu alkalické proteinasy při pH 7,0.

**Příklad:** při pH 7 byla naměřena proteolytická aktivita odpovídající 1,7 TU/ml, při pH 10 1,0 TU/ml. Podíl aktivity neutrální proteinasy při pH 7 (pN)

odpovídá podle nomogramu 0,565: potom  $N_7 = 1,7 \times 0,565 = 0,96$  TU/ml.  $A_{10} = [1,70 - 0,96] / 0,78 = 0,95$  TU/ml.

## 2.2 Porovnání tyrosinových jednotek stanovených fenolovým reagens a absorbancí v ultrafialové části spektra

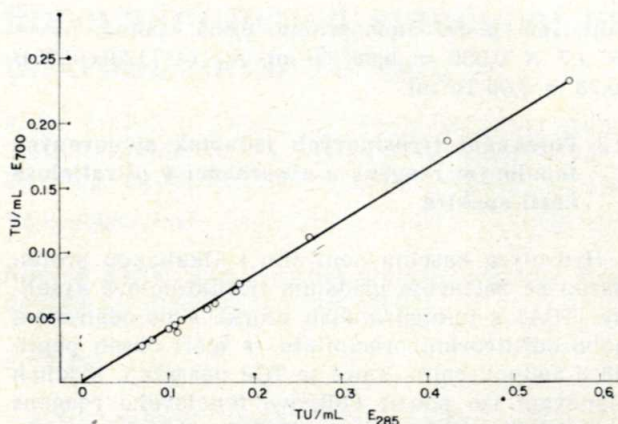
Hydrolýza kaseinu neutrální i alkalickou proteinasou se zastavuje přidáním trichloroctové kyseliny (TCA) k inkubovanému vzorku a po odstředění nebo odfiltrování precipitátu se měří obsah peptidů a aminokyselin, které se TCA nesrážejí. K jejich stanovení lze použít Folinova fenolového reagens a měřit barevnou reakci při 700 nm nebo se stanovuje přímo jejich absorbance v ultrafialové části spektra při 275–285 nm. Jako standard se v obou případech používá roztok tyrosinu (viz definice 1.1). Při stanovení proteolytické aktivity v preparátech nekontaminovaných hydrolytickými produkty nukleových kyselin se měří absorbance při 275 nebo 285 nm. V přítomnosti většího množství silně absorbujících látek při 260 nm je možno měřit absorbanci v TCA filtrátu nebo supernatantu při 285 nm, ovšem za cenu menší přesnosti, protože absorpční maximum tyrosinu je v oblasti 275–280 nm. Absorpční spektrum tyrosinu a hydrolyzátu kaseinu alkalickou proteinasou (subtilisinem), případně neutrální proteinasou není zcela identické — obr. 2. Při porovnávání hodnot TU/ml stanove-



Obr. 2. Absorpční spektrum tyrosinu (plná čára), hydrolyzátu kaseinu subtilizinem (přerušovaná čára) hydrolyzátu kaseinu metaloproteinase (tečkovaná čára), osa x: vlnová délka v nm; osa Y: relativní absorbance.

ných na základě absorbance TCA supernatantu při 275 nm a 285 nm v průběhu hydrolýzy kaseinu subtilisinem jsme zjistili, že absorbance těchto vzorků při 275 nm byly v průměru 1,3krát vyšší než při 285 nm. Hodnoty absorbance tyrosinového standardu byly však při 275 nm 1,83krát vyšší než při 285 nm. Při výpočtu tyrosinových jednotek pomocí tyrosinového standardu je proto hodnota 1 TU/ml při  $E_{275}$  o 30 % nižší než při  $E_{285}$ . Obsah TU/ml určený fenolovým reagens a absorbancí v ultrafialové oblasti se může poněkud lišit, což platí zvláště při





Obr. 3. Porovnání tyrosinových jednotek (TU) stanovených Folinovým reagens s absorbcí při 285 nm. Jako enzym byla použita neutrální metaloproteinasa *Bacillus megaterium*.  $E_{285}$ -absorbance měřena přímo při 285 nm;  $E_{700}$ -absorbance měřena po reakci s Folinovým činidlem při 700 nm

měření absorbance při 285 nm. Obrázek 3 znázorňuje vztah mezi TU metaloproteinasy stanovenými pomocí fenolového reagens a přímé absorbance při 285 nm. Ze směrnice vyplývá převodní koeficient  $TU_{285} : TU_{700} = 0,400$ . Jedna tyrosinová jednotka stanovená absorbcí při 285 nm tedy odpovídá pouze 0,4 jednotkám stanoveným pomocí fenolového reagens a naopak jedna  $TU_{700} = 2,5 TU_{285}$ . Při odečtu absorbance v TCA supernatantu při 275 nm by odpovídající hodnoty převodního koeficientu byly  $TU_{275} : TU_{700} = 0,60$  a  $TU_{700} : TU_{275} = 1,67$ . Při stanovení aktivity směsi neutrální a alkalické proteinasy v poměru 1,6 : 1 se hodnoty převodního koeficientu poněkud lišily:  $TU_{275} : TU_{700} = 0,71 \pm 0,09$  a  $TU_{700} : TU_{275} = 1,41 \pm 0,19$ . Převodní koeficienty pro směs obou enzymů při měření absorbance při 285 byly následující:  $TU_{285} : TU_{700} = 0,52 \pm 0,06$  a  $TU_{700} : TU_{285} = 1,92 \pm 0,22$ .

### 2.3 Delftská metoda

Proteinasa působí na 1,2% roztok kaseinu o pH 8,5, rozpuštěného ve vodě o tvrdosti 2,68 mmol/l za přítomnosti 2% tripolyfosfátu sodného. Reakce se po 40 minutách inkubace při 40 °C zastaví přidáním TCA. 1 Delftská jednotka (Dj) se rovná aktivitě enzymu, který proti kontrole zvýší absorbanci (extinkci) při  $E_{275}$  o 0,004, tj. 1000 Dj o 0,400. Výpočet Delftských jednotek se provádí podle vzorce  $Dj = E_{275} \times \text{ředění} \times 11 \times 4,545$ .

Delftská metoda je tedy založena na stejných principech jako již zmíněná Kunitzova modifikace Ansonovy metody. Je však použitelná především pro stanovení alkalické proteinasy, např. subtilisinu, protože se pH kaseinu nastavuje na hodnotu 8,5. Neutrální proteinasa má při tomto pH velmi sníženou aktivitu a proto použije-li se Delftská metoda k vyjádření aktivity směsi neutrální a alkalické proteinasy jako je tomu u enzymového preparátu z *Bacillus subtilis*, stanoví se především aktivita serinové proteinasy. Proto pro měření aktivity ve směsi obou enzymů je výhodnější použít dvojího

stanovení při pH 7,0 a 10,0. Určitou nevýhodou Delftské metody je i to, že se při výpočtu jednotek nepoužívá standard (např. roztok tyrosinu), ale pouze přepočítávací faktor. Při porovnávání tyrosinových a Delftských jednotek jsme určili převodní koeficient  $1TU[E_{275}] = 150 \pm 29 Dj$  a  $1Dj = 0,0067 [E_{275}]$ .

## 3. METODY ZALOŽENÉ NA SRÁŽENÍ MLÉČNÝCH BILKOVIN

### 3.1 Stanovení aktivity neutrální metaloproteinasy

Neutrální metaloproteinasy vyvolávají při stanovení enzymové aktivity pomocí kaseinového substrátu nejprve zvýšení zákalu inkubované směsi, který se postupně opět rozpouští. Zřetelné zakalení kaseinu je indikátorem jeho dostatečné hydrolýzy, a proto se obvykle reakce v tomto okamžiku zastaví přidáním TCA. Na obr. 4 je znázorněno porovnání průběhu přírůstků zákalu při  $E_{600}$  nm s kinetikou degradace kaseinu měřenou přírůstkem látek v TCA supernatantu absorbujících při 285 nm. Jako enzym jsme použili neutrální metaloproteinasu z *Bacillus megaterium* o aktivitě 0,07–0,42 TU/ml. Šipky, které označují okamžik, kdy zákal dosáhl maxima, udávají, že hodnota  $E_{285}$  se ve všech případech pohybovala v rozmezí 0,55–0,65. Naproti tomu však absolutní hodnota nejvyššího přírůstku  $E_{600}$  dosahovala v přítomnosti 0,42 TU/ml pouze asi jedné třetiny hodnoty zákalu vyvolané enzymem o aktivitě 0,07 TU/ml. Je to důsledkem rychlého rozpouštění precipitovaných micel para-K-kaseinu [5], jejich intenzivní hydrolýzou. Je proto třeba vznik zákalu bedlivě sledovat a reakci zastavit dříve, než se zákal počne snižovat a rychlost hydrolýzy kaseinu poklesne.

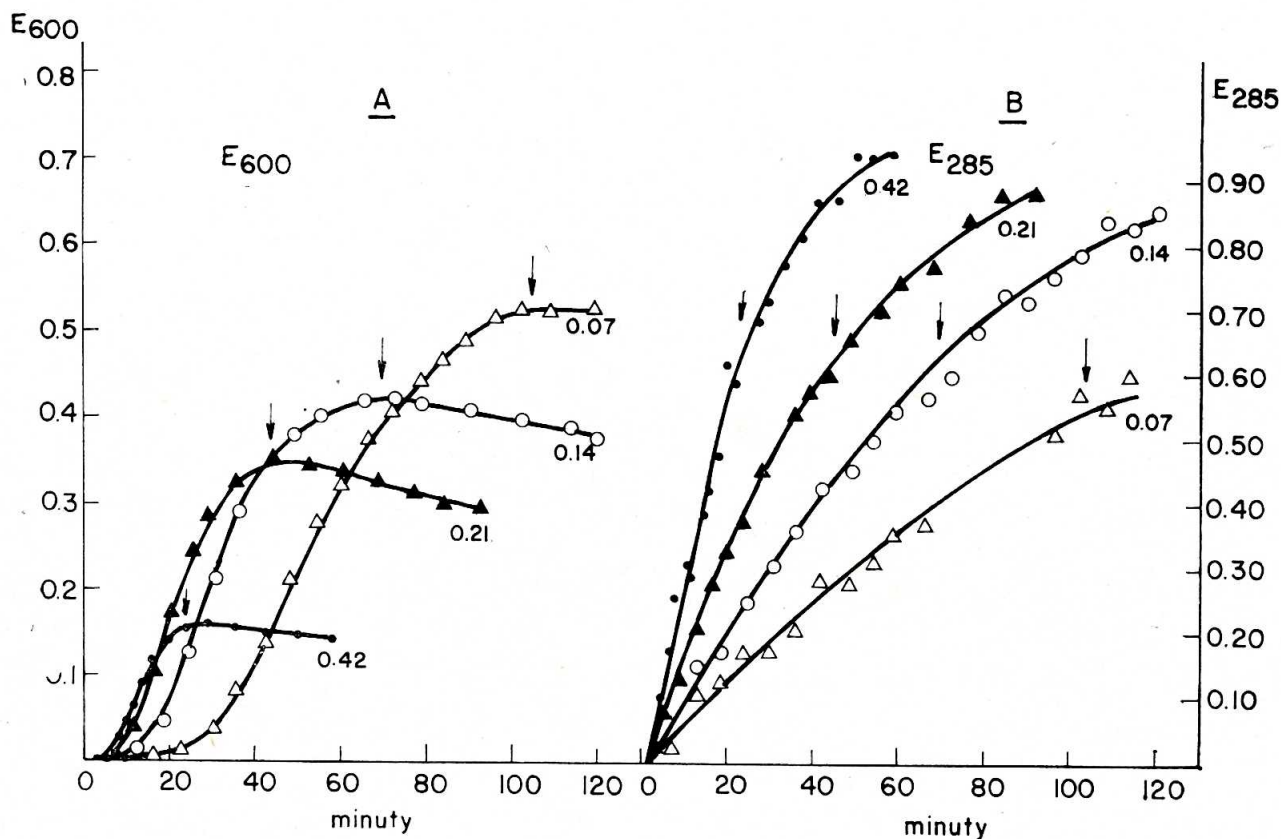
Neutrální a alkalická proteinasa však kalí kasein s různou intenzitou, což je nutno si uvědomit zvláště tehdy, je-li mírou aktivity enzymu doba vzniku zákalu, jako je tomu při Srinivasanově metodě.

### 3.2 Stanovení proteolytické aktivity Srinivasanovou metodou (postup používaný v provozu Agrojen, JZD Slušovice)

Substrát se připraví smícháním 100 ml čerstvého plnotučného mléka se 2 ml 10% roztoku  $CaCl_2$  a rozdělí se po 5 ml do zkumavek. Po vytemperování ve vodní lázni na 37 °C (15 min) se přidá 1 ml vzorku proteinasy (popř. naředěného) a v okamžiku přidání se spustí stopky. Za stálého míchání (protřepávání ve vodní lázni) se stanoví okamžik prvního srážení mléka. Vzorek enzymu se naředí tak, aby doba koagulace činila kolem 100 s. Aktivita vzorku v SRN jednotkách =  $720 \cdot 5/t \cdot m$ , kde 720 = definiční faktor, 5 = množství substrátu v ml,  $t$  = okamžik prvního srážení v sekundách,  $m$  = množství vlastního vzorku v 1 ml přidávaného enzymového preparátu.

Ve čtyřech pokusech, v nichž jsme stanovovali aktivitu v SRN jednotkách ve vzorcích neutrální a alkalické proteinasy, zředěné na stejnou hodnotu





Obr. 4. Vztah mezi zákalem a absorbcí TCA filtrátu při 285. Kasein byl hydrolyzován při pH 7,2 neutrální metaloproteinásou z *Bacillus megaterium*. A — zákal měřený absorbcí při 600 nm; B — absorbance TCA filtrátu při 285 nm

TU jednotek, vycházely výsledky v SRN jednotkách pro neutrální proteinasu  $2,2 \pm 0,5$ krát vyšší než SRN jednotky pro alkalickou proteinasu.

Postup podle Srinivasana má nesporně výhodu v tom, že je rychlý a nenáročný. Jeho nevýhoda spočívá v tom, že pH reakční směsi je příliš nízké a neodpovídá optimálnímu pH pro neutrální metaloproteinasu a tím méně optimálnímu pH pro alkalickou proteinasu subtilisinového typu. V našich pokusech se v jednotlivých vzorcích pohybovalo pH ve směsi mléko + enzym v rozmezí 6,0–6,5, s průměrem  $6,2 \pm 0,2$ . Tuto metodu je tedy nutno brát jako orientační a může přinést jen hrubou informaci o průběhu a nárůstu enzymové aktivity při fermentaci, ale není vhodná pro její přesnější stanovení.

V preparátu, který obsahoval 60 % aktivity neutrální a 40 % aktivity alkalické proteinasy (vztaheno na jejich optimální pH) odpovídala 1 SRN jednotka  $0,0105 \pm 0,0015$  TU<sub>275</sub> a 1 TU<sub>275</sub> jednotka  $95,2 \pm 15,1$  SRN.

Protože 1 TU<sub>275</sub> = 0,71 TU<sub>700</sub> [Folin-Ciocal-teau].

platí, že 1 SRN jednotka = 0,0075 TU<sub>700</sub>

a 1 TU<sub>700</sub> = 133 SRN

Vzhledem k tomu, že koagulační aktivita neutrální proteinasy byla 2,2krát vyšší než alkalické proteinasy, reprezentuje 1 TU<sub>275</sub> neutrální proteinasy přibližně 122 SRN jednotek a 1 TU<sub>275</sub> alkalické proteinasy 55 SRN. 1 SRN jednotka neutrální proteinasy představuje tedy 0,0082 TU<sub>275</sub> a 1 SRN alkalické proteinasy 0,018 TU<sub>275</sub>.

#### 4. METODY ZALOŽENÉ NA POUŽITÍ BAREVNÝCH NEROZPUSTNÝCH SUBSTRÁTŮ

Některé firmy vyvinuly barevné nerozpustné práškovité substráty, jejichž hydrolyza proteinasami uvolňuje do supernatantu zbarvené degradační produkty. Nejznámější z nich je azokol (Azocoll Calbiochem), jež je použitelný i pro stanovení nepatrných proteolytických aktivit v bezbuněčných extraktech. JZD Slušovice vyvinulo a zavedlo na trh nerozpustný barevný substrát S-Test Proteasa, který je založen na bázi serumalbuminu. Je dodáván ve formě peciček a práce s ním je velmi jednoduchá, protože po zastavení enzymové reakce roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve zředěném acetonu lze z absorbance odečtené v supernatantu přímo vyjádřit aktivitu podle kalibrační křivky v nanokatalech. Dodávaný preparát je vhodný pro stanovení alkalické serinové proteinasy typu subtilizinu, ale neutrální metaloproteinasa jej téměř neštěpí. Pro stanovení obou enzymů by zřejmě bylo vhodnější připravit substrát na bázi kaseinu.

Vzhledem k tomu, že absorbance slepého vzorku je zanedbatelná, je tento preparát zvláště vhodný pro stanovení proteinasy v komplexních médiích, v nichž jsou hodnoty srovnávacího pokusu při stanovení proteinasy Ansonovou metodou vysoké. Při porovnání aktivity subtilizinu při pH 10 odpovídá 1 TU<sub>275</sub> s kaseinem jako substrátem 18,5 nkat (v přepočtu na trypsin) a 1 nkat = 0,054 TU<sub>275</sub>.



## 5. ZÁVĚR

Jednotlivé převodní faktory různých jednotek jsou uvedeny v *tabulce 1*. Tabulka může sloužit k rychlé orientaci, ale v případě, kdy je vyžadováno u příslušného enzymového preparátu udání

jeho aktivity v určitých jednotkách, je nutno použít originální metody. Pro vzorky obsahující směs neutrální a alkalické proteinasy je třeba stanovit oba enzymy zvlášť Kunitzovou (Ansonovou) metodou.

Tabulka 1. Převodní tabulka různých jednotek proteolytické aktivity

TU <sub>275</sub>	1,00	0,71	1,41	1,75	0,67	1,05	0,82	1,82
TU <sub>285</sub>	1,40	1,00	1,97	2,46	0,93	1,47	1,15	2,55
TU <sub>700</sub>	0,71+	0,50+	1,00+	1,25+	0,47+	0,75+	0,58+	1,29+
	0,57++	0,40++	0,80++	1,00++	0,38++	0,60++	0,47++	1,04++
D. j.	150	107	211	263	100	158	123	273
SRN (A+N)+	95	67	134	167	63	100	78	173
A	122	87	172	214	81	128	100	222
N	55	39	77	96	37	59	45	100
nKat+++								
A	18,5	13,1	26,0	32,4	12,4	19,4	15,2	33,7

TU<sub>275</sub>, <sub>285</sub> tyrosinové jednotky stanovené absorbcí v příslušných vlnových délkách ultrafialové části spektra. TU<sub>700</sub> tyrosinové jednotky stanovené fenolovým reagens. D. j. delftské jednotky. Jako substrát byl použit kasein.

SRN — Srinivasanovy jednotky, A, N — alkalická a neutrální proteinasa

+ směs alkalické a neutrální proteinasy v poměru 2:3

++ neutrální proteinasa

Tyrosinové jednotky byly stanovovány při pH 7,2, Delftské při pH 8,5. Při porovnávání Delftských jednotek s TU bylo použito směsi alkalické a neutrální proteinasy a aktivita byla stanovována při pH 8,5.

+++ substrát S-test-Proteasa (barevný serumalbumin). Porovnáváno s hydrolyzou kaseinu při pH 10. Přepočteno podle kalibrační křivky pro stanovení trypsinu.

## Literatura

- [1] AUNSTRUP K.: *Economic microbiol.* 5, 1981, s. 49.
- [2] CHALOUPKA J., et al.: *Kvas. prům.* 32, 1986, s. 191.
- [3] PRIEST F. G.: *Bacteriol. Rev.* 41, 1977, s. 711.
- [4] KEIL B., ŠORMOVÁ Z.: *Laboratorní technika biochemie*. Naklad. ČSAV, Praha 1959, s. 653.
- [5] CARLSON A., HILL G. C., OLSON N. F.: *Enzyme microbiol. technol.* 8, 1986, s. 642.

Lektoroval Ing. Jan Masák, CSc.

Strnadová, M. - Kučerová, H. - Váchová, L. - Schwarzková, Z. - Palečková, F. - Čechmánek, Z. - Hájková, H. - Vyskočil, P. - Chaloupka, J.: Porovnání metod stanovení aktivity proteolytických enzymů mikrobiálního původu. *Kvas. prům.*, 37, 1991, č. 6, s. 168—172.

Byly porovnávány výhody a nedostatky Ansonovy (Kunitzovy), Delftské a Srinivasanovy metody při stanovení neutrální a alkalické proteinasy *Bacillus megaterium* a *Bacillus subtilis*. Byly určeny převodní koeficienty enzymových jednotek stanovených uvedenými metodami.

Стрнадова, М. - Кучерова, Х. - Вахова, Л. - Шварцова, З. - Палечкова, Ф. - Чехманек, З. - Гайкова, Х. - Выхочил, Л. - Халопка, Я.: Сопоставление методов определения активности протеолитических ферментов микробного происхождения. *Квас. прум.* 37, 1991, № 6, стр. 168—172.

Provádili se srovnání metod Ansona (Kunitz),

Сринивасана и Делфтского при установлении активности нейтральной и щелочной протеиназы *Bacillus megaterium* и *Bacillus subtilis*. Были определены переводные коэффициенты ферментативных единиц установленных указанными методами.

Strnadová, M. - Kučerová, H. - Váchová, L. - Schwarzková, Z. - Palečková, F. - Čechmánek, Z. - Hájková, H. - Vyskočil, P. - Chaloupka, J.: Comparison of Methods Measuring Activity of Microbial Proteolytic Enzymes. *Kvas. prům.*, 37, 1991, No. 6, pp. 168—172.

Ansons' (Kunitz), Delft and Srinivasans' methods for measurement of activity of neutral and alkaline proteinase of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* were compared. The relationships between enzyme units estimated by these methods were determined.

Strnadová, M. - Kučerová, H. - Váchová, L. - Schwarzková, Z. - Palečková, F. - Čechmánek, Z. - Hájková, H. - Vyskočil, P. - Chaloupka, J.: Die Vergleichung der Methoden zur Bestimmung der Aktivität der proteolytischen Enzyme mikrobiellen Ursprungs. *Kvas. prům.*, 37, 1991, Nr. 6, S. 168—172.

Die Vergleichungsmethoden von Anson (Kunitz), Srinivasan und die Delft-Methode wurde bei der Bestimmung der neutralen und alkalischen Proteinase *Bacillus megaterium* und *Bacillus subtilis* ausgeführt. Es wurden die Übertragungskoeffizienten von Enzymeinheiten durch angeführten Methoden festgelegt.