

Purifikácia a separácia extracelulárnych proteináz *Brevibacterium linens* ATCC 9172

JARMILA TOMASCHOVÁ - WOLFGANG BUCHINGER
- JAROSLAV ZEMANOVIČ - WERNER HAMPEL

SÚHRN. Článok sa zaoberá purifikáciou a separáciou extracelulárnych proteináz produkovaných mikroorganizmom *Brevibacterium linens* ATCC 9172 za pomoci iónovo-výmennej chromatografie a natívnej preparatívnej PAGE elektroforézy.

Brevibacterium linens je koryneformná baktéria s typicky oranžovo-žltým sfarbením. Produkuje esterázy, amylázy, lipázy, peptidázy ako aj proteinázy [1]. V našej práci sme sa zamerali na proteinázy. Tie totiž zohrávajú významnú úlohu pri tvorbe charakteristickej chutnosti povrchovo zrejúcich syrov ako Tilsit, Limburger, Gubeen, Milleens atď. [2]. Ako uvádzajú práce [3,4], purifikáciou proteináz rôznych kmeňov *Brevibacterium linens* sa zaoberali už mnohí. Z purifikačných techník najviac používali ultrafiltráciu, vysolovanie, gélovú filtráciu, iónovo-výmennú chromatografiu a hydrofóbnú interakčnú chromatografiu. Tieto techniky boli vyskúšané aj pri kmeni *Brevibacterium linens* ATCC 9172 (ultrafiltrácia, gélová filtrácia, iónovo-výmenná, hydrofóbná a afinitná chromatografia) [3]. Nepodarilo sa však nimi od seba jednotlivé proteinázy oddeliť. V tejto práci sme sa zamerali na predčistenie týchto proteináz iónovo-výmennou chromatografiou a ich separáciu natívnou preparatívnou PAGE elektroforézou na zariadení Prep Cell 491 (Bio Rad, CA, USA).

Ing. Jarmila TOMASCHOVÁ, Ing. Jaroslav ZEMANOVIČ, CSc., Katedra mlieka, tukov a hygieny požívatin, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.
Prof. Dr. Dipl. Ing. Werner HAMPEL, Dipl. Ing. Wolfgang BUCHINGER, Ústav biochemickej technológie a mikrobiológie TU, Getreidemarkt 9, 1060 Viedeň, Rakúsko.

Materiál a metódy

Použitý mikroorganizmus:

Brevibacterium linens ATCC 9172 sme získali zo zbierky Ústavu biochemickej technológie a mikrobiológie Technickej univerzity vo Viedni.

Kultivácia mikroorganizmu:

Na kultiváciu sme použili Laboratórny fermentor CF-2000 (f. Chemap, Švajčiarsko). Kultivácia mikroorganizmu [3] prebiehala 24 hodín pri teplote 30 °C a pH 6,5, pri otáčkach 800 ot.min⁻¹ a 55 % sýtení kyslíkom.

Izolácia proteínáz z kultivačného média:

10 litrov vyfermentovaného média sme centrifugovali (10 min.3000 g⁻¹), supernatant prefiltrovali, ultrafiltráciou zahustili (4 °C) na 750 ml (Filtron Minisette Cell, f. Filtron, Techn. Corp., Clinton, MA, USA, Filtron Membranefilter, Membrantype Alpha MW 10 kDa) a vysušili v sprejovej sušiarňi (Büchi 190, Flavil). Ako nosič sme použili Cellite 545.

Stanovenie proteolytickej aktivity a obsahu proteínov:

Proteolytickú aktivitu sme stanovili pri 38 °C a pH 7,5 na azokazeín [6] a obsah proteínov metódou podľa Bradforda [7].

Iónovo-výmenná chromatografia:

Vzorku proteínáz sme po sprejovom sušení rozpustili v 20 ml 0,01 mol.l⁻¹ Tris-HCl tlmivého roztoku o pH 8,0, odfiltrovali Cellite 545 a vzorku dialyzovali cez noc oproti tomu istému roztoku pri teplote 4 °C. Po skoncentrovaní na objem 5 ml na Amicon-10 (Amicon, Beverly, USA) sme vzorku naniesli na kolónu 3,5 x 15 cm naplnenú vymieňačom iónov DEAE-Sephacrose CL-6B a napojenú na Bio-Rad Econo System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, NSR). Nenadviazané proteíny sme eluovali 0,01 mol.l⁻¹ Tris-HCl s prídavkom 0,2 mol.l⁻¹ NaCl o pH 8,0 a nadviazané zložky lineárnym gradientom NaCl (0,2 - 0,5 mol.l⁻¹) v tlmivom roztoku. Zbierali sme 5 ml frakcie, v ktorých sme stanovili obsah proteínov, zmerali absorbcanciu pri 280 nm a stanovili proteolytickú aktivitu.

SDS-PAGE elektroforéza s kopolymerovanou želatínou:

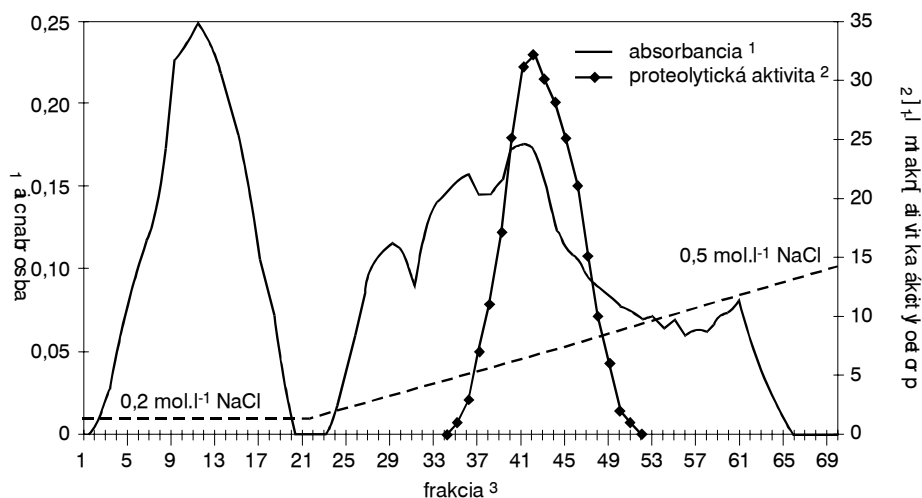
Použili sme upravenú elektroforetickú metódu podľa Heussena [5]. Pracovali sme s gélmami s 12,4 % T a 2,5 % C.

Natívna preparatívna PAGE elektroforéza:

Pracovali sme na zariadení Prep Cell Model 491 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). 4 cm vysoký 12,4 % T, 2,5 % C deliaci a 4 cm vysoký koncentrujúci gél sme formovali v rúrke o priemere 37 mm podľa návodu výrobcu. Proteolyticky aktívne frakcie z iónovo-výmennej chromatografie sme zliali, dialyzovali cez noc oproti elučnému roztoku pri teplote 4 °C a skoncentrovali na Amicon-10 (Amicon, Beverly, USA) na 1 ml. Takto spracovanú vzorku sme zmiešali s tlmivým roztokom na vzorky (0,0625 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8, 10 % glycerol, 0,025 % brómfenolová modrá) v pomere 1:4 a naniesli na povrch koncentrujúceho gélu. Elektroforézu sme robili pri konštantných 12 V v chladiacom boxe (6 °C) a za chladenia elektródového tlmivého roztoku (0,025 mol.l⁻¹ Tris, 0,192 mol.l⁻¹ glycín, pH 8,3) ľadom cez recirkulačnú pumpu. Proteínázy sme eluovali 0,05 mol.l⁻¹ Tris-HCl tlmivým roztokom o pH 8,0 rýchlosťou 0,7 ml.min⁻¹. Zbierali sme 4 ml frakcie, v ktorých sme stanovovali proteolytickú aktivitu.

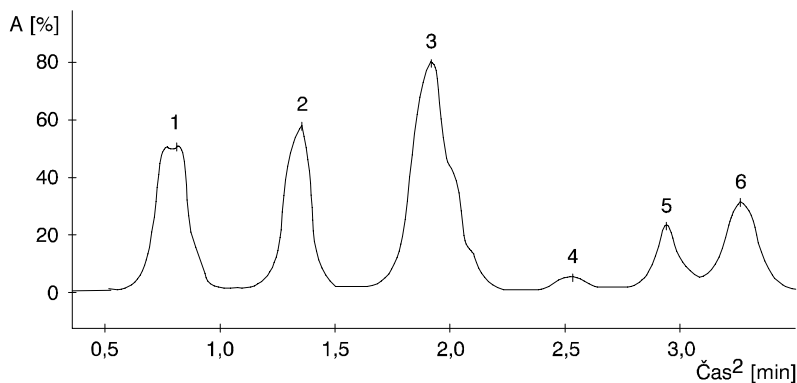
Výsledky a diskusia

Po kultivácii a spracovaní média postupom uvedeným v Materiáloch a metódach sme získali teplotne stabilný práškový preparát. Ako nosič pri sprejovom sušení sme použili vo vode nerozpustný Cellite 545, čiže po regenerácii vzorky 0,05 mol.l⁻¹ Tris-HCl tlmivým roztokom o pH 8,0 stačilo nosič odfiltrovať. Po dialýze sme vzorku predčistili od sprievodných látok použitím iónovo-výmennej chromatografie. Ako vidíme na obr. 1., touto metódou sme získali jeden proteolyticky aktívny pík, pričom sa zachovalo 92 % z pôvodnej proteolytickej aktivity a špecifická aktivita sa zvýšila 3,5-násobne. Získané proteolyticky aktívne frakcie sme zliali, dialyzovali oproti 0,05 mol.l⁻¹ Tris-HCl o pH 8,0 a 20 ml nadávkovali na gél SDS-PAGE elektroforézy s kopolymerovanou želatínou. Gél sme potom vyhodnotili denzitometricky (TLC-Scanner II, CAMAG, Švajčiarsko). Výsledky vidíme na obr. 2. Mikroorganizmus *Brevibacterium linens* ATCC 9172 teda za daných podmienok kultivácie produkuje 6 proteínáz. Najvyššie proteolytické aktivity majú proteínázy 1, 2 a 3 a to 21 %, 19 % a 38 % z celkovej proteolytickej aktivity. Ako uvádza práca [3], vyskúšali sme mnohé techniky za účelom separácie týchto proteínáz, no podarilo sa nám to iba za pomoci SDS-PAGE elektroforézy. Preto sme sa v ďalšej našej práci zamerali na preparatívnu natívnu PAGE elektroforézu. Východiskovou vzorkou boli proteínázy predčistené iónovo-výmennou chromatografiou. Pracovali sme pri podmienkach uvedených v Materiáloch a metódach. Aby sme minimalizovali



OBR. 1. Purifikácia proteínáz *Brevibacterium linens* ATCC 9172
iónovo-výmennou chromatografiou na DEAE-Sepharose CL-6B.
FIG. 1. Purification of proteinases from *Brevibacterium linens* ATCC 9172
by ionexchange chromatography on DEAE-Sepharose CL-6B.

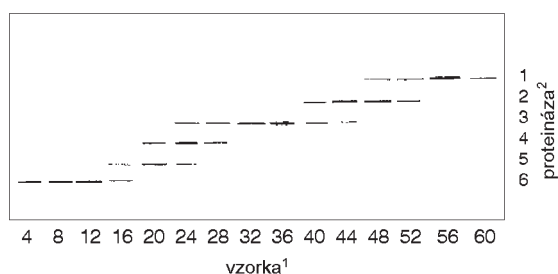
1 - absorbancy, 2- proteolytic activity, 3 - fraction.



OBR. 2. Densitogram elektroforeticky rozdelených proteínáz
Brevibacterium linens ATCC 9172 pomocou SDS-PAGE elektroforézy.
FIG. 2. Densitogram of electrophoretically distributed proteinases
of *Brevibacterium linens* ATCC 9172 by SDS-PAGE electrophoresis.

A - absorbancy, 2 - time, 1 to 6 - proteinases.

autolyzačné procesy, pracovali sme pri teplote 6 °C. Výsledky delenia sme sledovali analytickou SDS-PAGE elektroforézou s kopolymerovanou želatínou. Ako vidíme na obr. 3., touto metódou sa nám podarilo jednotlivé proteínázy od seba oddeliť. Hoci sa zdajú byť proteínázy 2, 4 a 5 nie úplne oddelené, je to len zdanlivé, pretože na gél sme nadávkovali len každú štvrtú elučnú frakciu. Získané proteínázy poslúžia na ďalšiu charakterizáciu, a to najmä v oblasti špecifického účinku pri enzýmovej hydrolyze α_s -kazeínu.



OBR. 3. SDS-PAGE elektroforéza s kopolymerizovanou želatínou šiestich frakcií proteínáz *Brevibacterium linens* ATCC 9172 získaných delením na natívnej preparatívnej PAGE elektroforéze.

FIG. 3. SDS-PAGE electrophoresis with copolymerized gelatine of six fractions of proteinases *Brevibacterium linens* ATCC 9172 separated using native preparative PAGE electrophoresis.

1 - sample, 2 - proteinase.

Záver

Zmes proteínáz produkovaných baktériou *Brevibacterium linens* ATCC 9172, predčistených iónovo-výmennou chromatografiou, sa nám podarilo rozdeliť pomocou natívnej preparatívnej PAGE elektroforézy na šesť samostatných frakcií, z ktorých však štvrtá je zanedbateľná z dôvodu minimálneho podielu na celkovej proteolytickej aktivite. V priebehu práce sme pracovali pri teplote 6 °C. Za daných podmienok sme nezistili degradáciu sledovaných frakcií. Touto šetrnou a rýchlou metódou sme nahradili niekoľko časovo a materiálno náročných operácií, ktoré sa inak bežne používajú.

Literatúra

1. FOISSY, H.: Examination of *Brevibacterium linens* by an electrophoretic zymogram technique. J. gen. Microbiol., 80, 1974, s. 197-207.
2. CLANCY, M. - O'SULLIVAN, M.: Partial purification and characterisation of a proteinase from *Brevibacterium linens*. Ir. J. agric. Fd. Res., 32, 1993, s. 185-194.
3. TOMASCHOVÁ, J. - ZEMANOVIČ, J. - HAMPEL, W.: Purifikácia extracelulárnych proteínáz *Brevibacterium linens* ATCC 9172. Bull. potrav. Výsk., 35, 1996, č. 4, s. 193-200.
4. TOMASCHOVÁ, J. - ZEMANOVIČ, J.: Proteínázy *Brevibacterium linens*. Bull. potrav. Výsk., 34, 1995, č. 1-2, s. 25-30.
5. HEUSSEN, C. - DOWDLE, E. B.: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerised substrates. Analyt. Biochem., 102, 1980, s. 196-202.
6. CHARNEY, J. - TOMARELLI, R. M.: A colorimetric method for the detection of the proteolytic activity of duodenal juice. J. biol. Chem., 177, 1947, s. 501-505.
7. BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem., 72, 1976, s. 248-254.

Do redakcie došlo 11. 4. 1997.

Purification and separation of extracellular proteinases of *Brevibacterium linens* ATCC 9172

TOMASCHOVÁ, J. - BUCHINGER, W. - ZEMANOVIČ, J. - HAMPEL, W.:
Bull. potrav. Výsk., 36, 1997, p. 21-26.

SUMMARY. The article deals with purification and separation of extracellular proteinases produced by *Brevibacterium linens* ATCC 9172, utilizing ionexchange chromatography and native preparative PAGE electrophoresis.