

## Purifikácia extracelulárnych proteínáz *Brevibacterium linens* ATCC 9172

JARMILA TOMASCHOVÁ - WERNER HAMPEL - JAROSLAV ZEMANOVIČ

**SÚHRN.** Článok sa zaoberá purifikáciou extracelulárnych proteínáz produkovaných mikroorganizmom *Brevibacterium linens* ATCC 9172. Je tu uvedený spôsob kultivácie mikroorganizmu, jeho izolácia z kultivačného média, purifikácia a čiastočná separácia gélovou filtráciou, ionovovýmennou a afinitnou chromatografiou.

*Brevibacterium linens* je koryneformná baktéria. Na proteolytické vlastnosti ňou produkovaných proteínáz poukázal už v roku 1930 Steinfatt [1]. Produkuje ako extracelulárne, tak aj intracelulárne proteínázy, ktoré sa významnou mierou podieľajú na tvorbe charakteristickej chutnosti syrov zrejúcich pod mazom ako napr. Romadur, Tilsit, Limburger a Dambo [2-8].

Pre purifikáciu enzýmov je k dispozícii množstvo metód proteínovej chémie. Využíva sa pritom tá skutočnosť, že jednotlivé proteíny (enzýmy) majú rôzne fyzikálne a chemické vlastnosti. Najčastejšie sa z metód používajú: zrážanie neutrálnymi soľami, organickými rozpúšťadlami, gélová filtrácia, iónovovýmenná, hydrofóbná interakčná a afinitná chromatografia.

Tokita a Hosono [9] izolovali proteínázy *Brevibacterium linens* zrážaním síranom amónnym s následnou purifikáciou gélovou filtráciou na Sephadex G-100. Získali jednu proteolyticky aktívnu frakciu. Foissy [5,6,10] pracoval s kmeňom *Brevibacterium linens* ATCC 9174, pričom tiež použil zrážanie síranom amónnym a gélovú filtráciu na Sephadex G-100. Březina a kol. [11] na izoláciu použili zrážanie etanolom, síranom amónnym a dialýzu. Získaný preparát ďalej čistili iónovovýmennou a afinitnou chromatografiou. Hayashi [12] zrážaním síranom amónnym a purifikáciou na kolónach naplnených DEAE-Sephadexom, DEAE-Sephacrylom M, Supherosou 6 získal dve aminopeptidázy. Clansy a Sullivan [8] pracovali s kmeňom *Brevibacterium li-*

---

Ing. Jarmila Tomaschová, Ing. Jaroslav Zemanovič, CSc., Katedra mlieka, tukov a hygieny potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Prof. Dr. Dipl. Ing. Werner Hampel, Katedra biochemickej technológie a mikrobiológie Technická univerzita Viedeň, Getreidemarkt 9/172, 1060 Viedeň, Rakúsko.

nens IDM 376, pričom proteínázy izolovali priamo z povrchovo zrejúceho syra Gubeen a purifikovali ich iónovovýmennou chromatografiou. Rattray a kol. [13] pracovali s kmeňom *Brevibacterium linens* ATCC 9174. Pomocou iónovovymennej a hydrofóbnej chromatografie sa im podarilo vyizolovať jednu serí novú proteínázu.

## 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).

Médium:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,7 g,  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8,9 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4,1 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50,8 mg, 2,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 kvapky,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  64 mg, NaCl 0,6 g, kvasničný extrakt 50 g, sladový extrakt 20 g, roztok stopových prvkov 50 ml.

Roztok stopových prvkov [ $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ]: etyléndiamínotetraoctan disodný 1,5;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,1; kyselina boritá 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3,0;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,5;  $\text{CaCl}_2$  0,1;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01.

Kultivácia prebiehala 24 hodín pri teplote 30 °C a pH 6,5, pri otáčkach 800  $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$  a 55 % sytení kyslíkom.

### *Izolácia proteínáz z kultivačného média*

Z 10 litrov vyfermentovaného média sme centrifugáciou (10 min. 3000  $\text{g}^{-1}$ ) odstránili bunky *Brevibacterium linens*. Supernatant sme prefiltrovali, ultrafiltráciou zahustili (4 °C) na 750 ml a vysušili v sprejovej sušiarni (Büchi 190, Flavil). Ako nosič sme použili  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

### *SDS-PAGE s kopolymerizovanou želatínou*

Upravená elektroforetická metóda podľa Heussena [14].

### *Stanovenie proteolytickej aktivity a obsahu proteínov*

Proteolytickú aktivitu sme stanovovali metódou s ninhydrínovým činidlom [15,16], obsah proteínov Lowryho metódou [16].

### *Afinitná chromatografia s imobilizovanými kovovými iónmi:*

Kolóna:	1,5 x 15 cm
Objem náplne:	17,5 $\text{cm}^3$ IDA- $\text{Cu}^{2+}$ (60 %-né sytenie)
Elučné činidlo:	0,02 M fosfátový tlmivý roztok, pH 7,0 (resp. pH 7,5 a 8,0) s 0,5M NaCl

Gradient:	0-0,15 M NH <sub>4</sub> Cl v elučnom činidle
Elučná rýchlosť:	0,3 ml.min <sup>-1</sup>
Teplota:	6 °C
Frakcia:	3 ml

#### Gélová filtrácia:

Kolóna:	1,5 x 15 cm
Objem náplne:	17,5 cm <sup>3</sup> IDA-Cu <sup>2+</sup> (60 %-né sytenie)
Elučné činidlo:	0,02 M Tris-HCl, pH 7,5
Elučná rýchlosť:	0,08 ml.min <sup>-1</sup>
Teplota:	6 °C
Frakcia:	2 ml

#### Iónovovýmenná chromatografia:

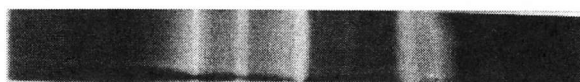
Kolóna:	1,5 x 15 cm resp. 3,5 x 15 cm
Objem náplne:	19,5 ml resp. 28,8 ml DEAE-Sepharosa CL-6B
Elučné činidlo:	0,02 M Tris-HCl, pH 7,5
Gradient:	0-0,5 M NaCl v elučnom činidle
Elučná rýchlosť:	0,3 ml.min <sup>-1</sup>
Teplota:	6 °C
Frakcia:	2 ml resp. 3 ml

### Výsledky a diskusia

Po kultivácii mikroorganizmu *Brevibacterium linens* ATCC 9172, centrifugácii, ultrafiltrácii a sprejovom sušení média, sme získali teplotne stabilný práškový preparát, ktorý sa stal východiskovým produktom pre našu ďalšiu prácu.

Na polyakrylamidovom géli s kopolymerizovanou želatínou sme objavili päť výrazných proteolyticky aktívnych pásov a niekoľko menej výrazných (obr. 1.), ktoré sme sa pokúsili od seba oddeliť rôznymi chromatografickými metódami.

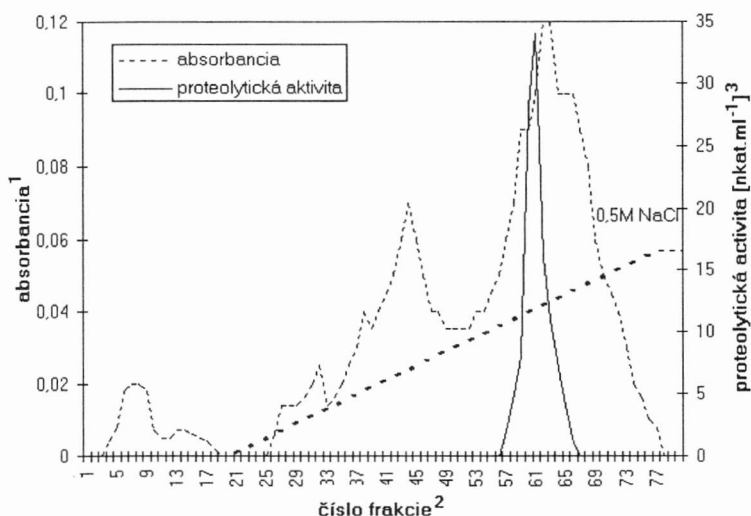
Ako prvú metódu sme použili afinitnú chromatografiu s imobilizovanými kovovými iónmi. Táto umožňuje rozdelenie rôznych proteínov (čiže aj enzýmov) s veľmi podobnými molekulovými hmotnosťami, izoelektrickými bodmi



OBR. 1. Rozdelenie proteínáz *Brevibacterium linens* ATCC 9172 na SDS-PAGE s kopolymerizovanou želatínou.  
FIG. 1. Separation of proteinases *Brevibacterium linens* ATCC 9172 by SDS-PAGE with copolymerised gelatine.

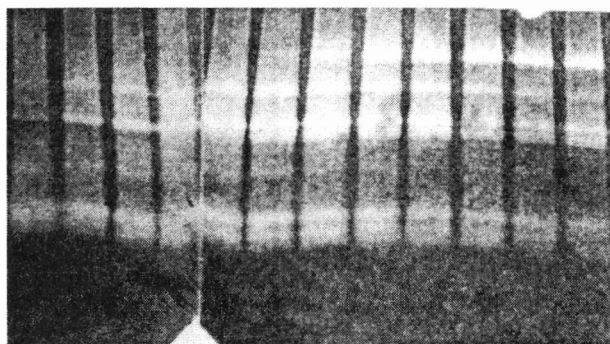
a primárnymi štruktúrami, ale s rozdielmi v sekundárnej a terciárnej štruktúre. Vzorku sme najprv odsolili dialýzou a naniesli na kolónu naplnenú s IDA- $\text{Cu}^{2+}$ . Touto metódou a za uvedených podmienok sa nám nepodarilo proteínázy naviazať na gél. Všetky proteínázy sa nám objavili v prvých dvoch elučných frakciách.

Ďalšou nami použitou metódou je iónovovýmenná chromatografia, ktorou sa delia proteínázy na základe ich rozdielneho náboja.



OBR. 2. Delenie proteínáz *Brevibacterium linens* ATCC 9172 na kolóne 1,5 x 15 cm s náplňou DEAE-Sepharosy CL-6B.  
FIG. 2. Separation of proteinases *Brevibacterium linens* ATCC 9172 on the column 1,5 x 15 cm packed with DEAE-Sepharse CL-6B.

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

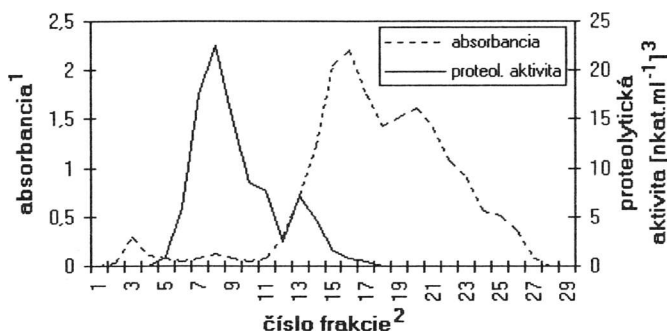


OBR. 3. SDS-PAGE s kopolymerizovanou želatínou proteolyticky aktívnych frakcií získaných delením vzorky na kolóne s náplňou DEAE-Sepharosy CL-6B.

FIG. 3. SDS-PAGE with copolymerised gelatine of proteolytic active fractions as a result of the sample separation on a column packed with DEAE-Sepharse CL-6B.

Ako vidíme z obr. 2. a 3., pri použití kolóny 1,5 x 15 cm s náplňou 19,5 cm<sup>3</sup> DEAE-Sepharosy CL-6B a vzorkou odsolenou pomocou dialýzy, sa nám vzorku na kolónu naviazať podarilo, ale rozdelenie na jednotlivé proteínázy sme nedosiahli. Získali sme len jednu proteolyticky aktívnu frakciu (dvojnásobné prečistenie so znovuzískaním 94 % pôvodnej aktivity).

Proteolyticky aktívne frakcie sme zliali, skoncentrovali na objem 0,8 ml a vzorku aplikovali na kolónu 1,5 x 15 cm s náplňou Biogélu A-0,5 m a pokúsili sa proteínázy rozdeliť na základe ich molekulovej hmotnosti. Výsledky vidíme na obr. 4.



OBR. 4. Delenie proteínáz *Brevibacterium linens* ATCC 9172 na kolóne s náplňou Biogelu A-0,5 m.

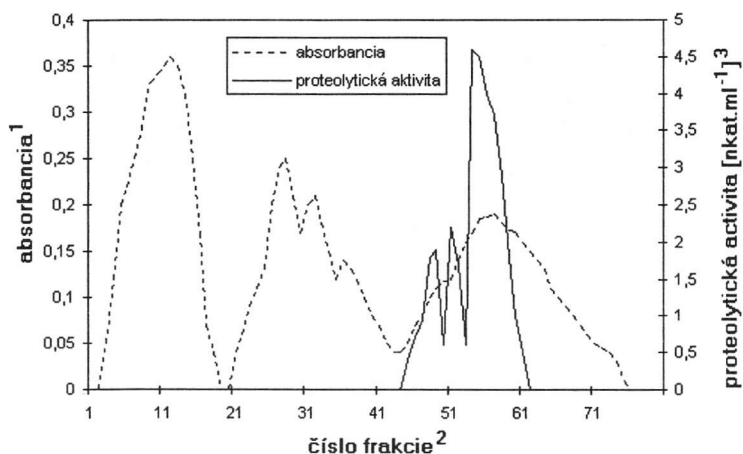
FIG. 4. Separation of proteinases *Brevibacterium linens* ATCC 9172 on a column packed with Biogel A-0,5 m.

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

Touto metódou sme dosiahli rozdelenie proteínáz do dvoch proteolyticky aktívnych frakcií a to s vysokou a nízkou molekulovou hmotnosťou. V prvej sa nachádza 75 % aktivity so stupňom prečistenia 20,5. V druhej frakcii (cca 25 % zistenej aktivity) proteínázy eluovali s veľkým množstvom sprievodných proteínov. V eluáte sa dokázalo len 54 % pôvodnej aktivity, čo poukazuje na to, že sa pravdepodobne zároveň odstránili aj dôležité aktivátory proteínáz. Podobné výsledky získal delení na Sephacryle S-300 Buchinger [17], ktorý stanovil molekulovú hmotnosť niekoľkých proteínáz na 40, 130, 220 a 280 kDa.

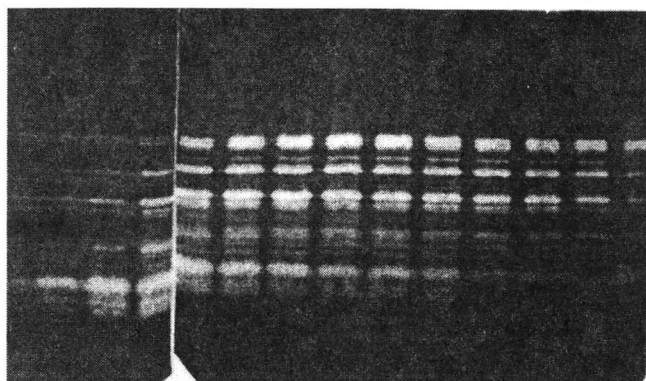
Odsolené a gélovou filtráciou čiastočne purifikované proteínázy sme ďalej čistili iónovovýmennou chromatografiou na kolóne 3,5 x 15 cm s náplňou DEAE-Sepharosy CL-6B. Získali sme tri proteolyticky aktívne frakcie so zvýšením stupňa prečistenia oproti gélovej filtrácii o 5,0, 5,3 resp. 6,0 (obr. 5.).

SDS-PAGE s kopolymerizovanou želatínou však ukázala, že sa nám jednotlivé proteínázy prelínali (obr. 6.), čiže nepodarilo sa nám ani touto metódou úplne od seba jednotlivé proteínázy oddeliť.



OBR. 5. Delenie proteináz *Brevibacterium linens* ATCC 9172 na kolóne 3,5 x 15 cm s náplňou DEAE-Sepharosy CL-6B.  
FIG. 5. Separation of proteinases *Brevibacterium linens* ATCC 9172 on the column 3,5 x 15 cm packed with DEAE-Sepharose CL-6B.

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



OBR. 6. SDS-PAGE s kopolymerizovanou želatínou proteolyticky aktívnych frakcií získaných delením zmesi proteináz na kolóne s náplňou DEAE-Sepharosy CL-6B.  
FIG. 6. SDS-PAGE with copolymerised gelatine of proteolytic active fractions from sample separation on a column packed with DEAE-Sepharose CL-6B.

## Záver

Pokusy o purifikáciu a separáciu extracelulárnych proteináz *Brevibacterium linens* ATCC 9172 ukázali, že použité chromatografické techniky vedú len k čiastočnej purifikácii a separácii jednotlivých proteináz. Najlepšie výsledky sme dosiahli so vzorkou čistenou gélovou filtráciou a následnou iónovovýmennou chromatografiou, kde sme dosiahli rozdelenie proteináz do troch proteo-

lytický aktivných frakcií. Jedinou technikou, ktorou sa nám podarilo úplne rozdeliť 5 majoritných proteináz, bola SDS-PAGE s kopolymerizovanou želatínou.

## Literatúra

1. STEINFATT, F.: Über *Brevibacterium linens* und sein Beziehungen zu einigen Begleitmikroorganismen in Milch. Milchwirtsch. Forsch., 9, 1930, s. 1-50.
2. TORGERSEN, H. - SORGHANG, T.: Peptide hydrolases of *Brevibacterium linens*. FEMS Microbiol. Lett., 4, 1978, s. 151-153.
3. HAZASHI, K. - REVELL, D. F. - LAW, B. A.: Effect of partially purified extracellular serine proteinases produced by *Brevibacterium linens* on the accelerated ripening of Cheddar Cheese. J. Dairy Sci., 73, 1990, s. 579-583.
4. FOISSY, H.: Kinetik properties of *Brevibacterium linens* aminopeptidase. In: 20. Int. Dairy Congr. Brief Communications. Paris, Milchwissenschaft 1978, s. 479-480.
5. FOISSY, H.: Some properties of aminopeptidase from *Brevibacterium linens*. FEMS Microbiol. Lett., 3, 1978, s. 207-210.
6. FOISSY, H.: Aminopeptidase from *Brevibacterium linens*. Production and purification. Milchwissenschaft, 33, 1978, s. 221-223.
7. HOLTZ, CH. - DOEYER, N. - KUNZ, B.: Occurrence and physical properties of plasmids in *Brevibacterium linens*. Milchwissenschaft, 47, 1992, s. 705-707.
8. CLANCY, M. - OSULLIVAN, M.: Partial purification and characterisation of a proteinase from *Brevibacterium linens*. Ir. J. agric. Fd Res., 32, 1993, s. 185-194.
9. TOKITA, F. - HOSONO, A.: Extracellular protease produced by *Brevibacterium linens*. I. Production and some properties of the extracellular protease. Nippon Chikusan Gakuhai-Ho, 43, 1972, s. 151-153.
10. FOISSY, H.: Aminopeptidase from *Brevibacterium linens*. Activation and inhibition. Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 166, 1978, s. 164-166.
11. BŘEZINA, P. - MUSIL, P. - KOPEČNÝ, J. - PLOCKOVÁ, M. - RAUCH, P.: Isolation and properties of proteinases and aminopeptidases of *Brevibacterium linens*. Sb. VŠCHT v Praze E 61, 1 Potraviny, 1987, s. 149-160.
12. HAYASHI, K.: Purification and characterization of two aminopeptidases produced by *Brevibacterium linens*. J. gen. Microbiol., 135, 1989, s. 2027-2034.
13. RATTRAY, F. P. - BOCKELMANN, W. - FOX, F. P.: Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. Appl. env. Microbiol., 61, 1995, s. 3454-3456.
14. HEUSSEN, C. - DOWDLE, E. B.: Electrophoretical analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerised substrates. Analyt. Biochem., 102, 1980, s. 196-202.
15. BERGMAYER, H. U.: Methoden der Enzymatischen Analyse. Weinheim, Verlag Chemie 1974, s. 1052.
16. DAVIDEK, J.: Laboratorní příručka analýzy potravin. 1. vyd. Praha, SNTL 1977. 718 s.
17. BUCHINGER, W.: Charakterisierung der extracellulären Proteinasen von *Brevibacterium linens*. [Diplomová práca.] Wien 1995. 164 s. - Technische Universität.

Do redakcie došlo 20.9.1996.

## **Purification of extracellular proteinases from *Brevibacterium linens* ATCC 9172**

JARMILA TOMASCHOVÁ - WERNER HAMPEL - JAROSLAV ZEMANOVIČ

SUMMARY. The article deals with purification of extracellular proteinases produced by the microorganism *Brevibacterium linens* ATCC 9172. The cultivation of the microorganism, its isolation from the culture media, purification and partial separation with gel filtration, ion exchange, and affinity chromatography are presented.