

## Proteinázy *Brevibacterium linens*

JARMILA TOMASCHOVÁ - JAROSLAV ZEMANOVIČ

Súhrn. Prehľadný článok sa zaoberá extracelulárnymi a intracelulárnymi proteinázami *Brevibacterium linens*, možnosťami ich produkcie submerznou kultiváciou s následnou izoláciou a purifikáciou. Sú uvádzané biochemické vlastnosti získaných enzýmov, ako aj poznatky o hydrolytickom štiepení kazeínu týmito proteinázami.

### *Brevibacterium linens*

*Brevibacterium linens* je coryneformná baktéria, na ktorej proteolytické vlastnosti Steinfatt [1] poukázal už v roku 1930. Je to mikroorganizmus produkujúci extracelulárne ako aj intracelulárne proteinázy, ktoré sa významne podieľajú na procese tvorby charakteristickej chutnosti syrov zrejúcich pod mazom ako napr. Romadur, Tilsin, Gubeen, Limburger, Danbo, Gruyere [2,3,4,5,6,7,8]. U kmeňa SSM-47 sa v cytoplazmatickej membráne dokonca dokázala aj prítomnosť niekoľkých glykoproteináz [9].

### Produkcia proteináz

Optimálne podmienky pre rast mikroorganizmu ešte nemusia byť identické s podmienkami pre maximálnu tvorbu enzýmov. Vzťah medzi zložením kultivačného média a produkciou proteináz je veľmi zložitý, a preto sa zvyčajne stanovuje empiricky. Do úvahy treba vziať aj podmienky a spôsob kultivácie.

Strauss [10] sa vo svojej práci zaoberala porovnaním rastu a rýchlosti tvorby proteináz rôznych kmeňov *Brevibacterium linens* za účelom nájdania kmeňa s čo najvyššou produkciou proteináz. V médiu obsahujúcom vaječný albumín, baktopeptón, minerálne soli, stopové prvky a vitamíny kultivovala päť rôznych kmeňov *Brevibacterium linens*. Ako najlepší sa ukázal *Brevibacterium linens* ATCC 9172. Ďalej pracovala už len s týmto kmeňom a hľadala

---

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

optimálne zloženie kultivačného média pre maximálnu produkciu proteínáz pri čo najkratšej dobe kultivácie a za použitia čo najlacnejších substrátov. Mikroorganizmus kultivovala v laboratórnom fermentore Cf-2000. Ako dobrý zdroj uhlíka sa ukázal kazeín spolu so sladovým extraktom, za dosiahnutia proteolytickej aktivity 70 U/ml na N,N-dimetylkazeín, avšak pri dobe kultivácie až 150 hodín, čo pre prax nie je veľmi výhodné. Preto ako zdroje uhlíka použila kvasničný extrakt spolu so sladovým extraktom resp. kukuričným gluténom. Kultivácia trvala len 20 resp. 30 hodín, ale za zníženia proteolytickej aktivity na 36 U/ml resp. 33 U/ml. Hlavne kukuričný glutén sa javí ako vhodný zdroj pre priemyselnú kultiváciu mikroorganizmu za účelom produkcie proteínáz.

Vytvorením optimálnych podmienok pre rast a produkciu proteínáz sa zaoberal aj Weimer [11]. Ako vhodné pre produkciu extracelulárnych proteínáz sa ukázalo médium s prídavkom 1 % peptónu, 1 % kvasničného extraktu, 1 % NaCl, 1 %  $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ , 1,5 % glukózy a 3 % kazeínu. Na produkciu intracelulárnych sa osvedčil prídavok 1 % peptónu, 1 % kvasničného extraktu, 1 % NaCl, 1 %  $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ , 0,5 % glukózy a 1 % kazeínu.

Tokita a Hosono [12] opísali kultivačné médium obsahujúce 2 % kazeín, 1 % peptónu, 1 % kvasničného extraktu, 1 % NaCl a 1 %  $K_2HPO_4$ , pričom najväčší titer enzýmov získali po 1 až 2 dňoch kultivácie.

Kultiváciou *Brevibacterium linens* sa zaoberali Juhás a kol. [13]. Ako vhodné induktory tvorby proteínáz boli zistené: vaječný albumín, kukuričný glutén a odtučnené sušené mlieko.

Zemanovič a kol. [27] sledovali rast a produkciu proteínáz *Brevibacterium linens* LF 200 pri rôznej aktivite vody ( $a_w$ ), ktorá bola upravovaná prídavkom NaCl, resp. glukózy. V médiu s klesajúcou hodnotou  $a_w$  upravenou chloridom sodným nebol rast výrazne ovplyvnený do hodnoty 0,971. Inhibícia rastu sa prejavila pri  $a_w = 0,945$ . Produkcia proteínáz poklesla pri  $a_w = 0,971$  o 23 %. Pri úprave aktivity vody glukózou sa spomalenie rastu zistilo pri hodnote 0,980 a výrazná inhibícia pri  $a_w = 0,961$ .

## Proteínázy

Foissy [18], Torgensen a Sorhaug [2] a Sorhaug [18] za pomoci elektroforetických zymogramových techník zistili produkciu 14 až 18 intracelulárnych (alfa-naftylacetát a alfa-naftylbutyrát esterázy, tributyrináza, alkohol-, laktát-, sukcinát-, glukóza-6-fosfát-, 6-fosfoglukonát-, izocitrát-, alanín- a glutamát-dehydrogenázy, tetrazoliumoxidáza, kataláza, peroxidáza a proteínáza) a 3 extracelulárnych enzýmov (alfa-naftylacetát esteráza, arylamidáza a proteínáza).

Tokita a Hosono [12] izolovali proteínázy *Brevibacterium linens* zrážaním síranom amónnym, ktoré ďalej purifikovali gélovou filtráciou na Sephadex G-100. Získali jednu proteolyticky aktívnu frakciu, ktorej optimálne podmienky boli 25 °C a pH 7 až 10. Záhrev nad teplotu 50 °C enzým úplne inaktivoval.

Foissy [5,6,14] skoncentroval proteínázy *Brevibacterium linens* ATCC 9174 na rotačnej vákuovej odparke pri 28 °C a dialýzou oproti vode. Po zrážaní síranom amónnym (50 % sýtenie) bola zrazenina rozpustená v tlmivom fosfátovom roztoku o pH 8 a po dialýze oproti tomuto roztoku nasledovala samotná purifikácia na kolóne plnenej Sephadexom G-100. Proteolyticky aktívne frakcie opäť zrazil síranom amónnym (80 % sýtenie), zrazeninu rozpustil v 1,0 mM TRIS-hydroxy-metylaminometán-tri-citrátovom tlmivom roztoku o pH 7,5. Po dialýze oproti tomuto roztoku nasledovala gélová preparatívna elektroforéza na akrylamide. Konečný preparát bol 31-krát čistejší ako kultivačné médium. Takto sa mu podarilo vyizolovať leucínaminopeptidázu stabilnú pri teplote 28 °C a pH 9 až 10 s molekulovou hmotnosťou 95 kDa. Enzým bol aktivovaný prídavkom kobaltu a inhibovaný ťažkými kovmi, redukčnými činidlami, EDTA a prídavkom niektorých aminokyselín ako napr. His a Ser (95 % inhibícia) a kyselinou glutámovou (50 % inhibícia).

Březina a kol. [15] izolovali z kultivačného média tri aminopeptidázy a štyri proteázy zrážaním etanolom, síranom amónnym, dialýzou a lyofilizáciou. Získaný enzýmový preparát ďalej čistili ionexovou chromatografiou na DEAE-celulóze a afinitnou chromatografiou na HMDA-celulóze. pH a teplotné rozmedzie, v ktorom sú stabilné nimi izolované enzýmy mikroorganizmu *Brevibacterium linens* 200 sú pre proteínázy teplota 50 °C a pH 5 až 8, pre aminopeptidázy teplota 30 °C a pH 7 až 9. Na proteázy mali  $Zn^{2+}$  a  $Mg^{2+}$  aktivačný účinok, kým trypsínové inhibítory (SDS, PMFS) a ióny  $Ca^{2+}$  a  $Ni^{2+}$  spôsobili pokles proteolytickej aktivity. Na aminopeptidázy pôsobili ako aktivátory SDS a ióny  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  o koncentrácii 10 mM a ako inhibítory EDTA,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ .

Hayashi [16] získal z kultivačného média dve aminopeptidázy zrážaním síranom amónnym, ktoré purifikoval na sérii kolón: DEAE-Sephadex, DEAE-Triacryl M a Supherosa 6. Označil ich A a B. Obe boli pri teplote 40 °C a pH 9,3 stabilné. Koncentrácia NaCl a KCl do 2 M nemala na stabilitu enzýmov vplyv. Molekulovú hmotnosť vyizolovaných proteínáz *Brevibacterium linens* určil za pomoci gélovej chromatografie na Supherose na 150 a 110 kDa a pomocou SDS-Page elektroforézy na 36 a 26 kDa. Išlo teda o tetraméry.

Ďalej sa Hayashimu [17] podarilo izolovať z filtrátu kultivačného média päť rôznych proteáz. Označil ich A, B, C, D a E. Všetky boli stabilné pri pH 11. A a B boli tepelne- a kyselinolabilnejšie ako C, D a E.

Clansy a Sullivan [8] sa zaoberali proteínázami produkovanými kmeňom *Brevibacterium linens* IDM 376, ktorý izolovali z povrchovo zrejúceho syra Gubeen. Po kultivácii médium spracovali nasledovne: centrifugácia pri 5000 g počas 15 minút, ultrafiltrácia cez celulózoacetátový filter, dialýza oproti 0,02 M fosforečnane sodnom, iónovovýmenná chromatografia na kolóne plnenou DEAE-celulózou DE 52, dialýza oproti destilovanej vode, koncentrácia ultrafiltráciou. Takto prečistený enzým bol použitý pri nasledujúcej charakterizácii. Extracelulárna proteínáza mala maximálnu proteolytickú aktivitu na azokažeín pri pH 7,5, pričom proteolytická aktivita s narastajúcim pH mierne

klesala a pri pH 11,0 mala ešte 65 % jej pôvodnej hodnoty. Po 24-hodinovom uskladnení pri teplote 21 °C si enzým zachoval ešte 85 % aktivity v rozsahu pH 4 až 11. Ako optimálna sa ukázala teplota 67,5 °C. Pri teplote 70 °C sa zaznamenal pokles na 35 % maximálnej aktivity. Z týchto údajov usúdili, že izolovali termostabilnú proteínázu. Proteínáza bola inhibovaná n-etylmalemidom o koncentrácii vyššej ako 10 mM. Čiastočná inhibícia sa pozorovala aj po viac ako 10 mM prídavku beta-merkaptóetanolu a cysteínu. Molekulovú hmotnosť stanovili pomocou gélovej filtrácie na kolóne plnenej Sephadexom G-75 na 18,5 kDa.

Juhasz a kol. [13] izolovali extracelulárnu proteínázu *Brevibacterium linens*. Proteínázy najprv skoncentrovali dialýzou cez filter YM 30 (Amicon), a potom separovali na kolóne Sephacrylu S-200. Molekulovú hmotnosť proteolyticky aktívnych frakcií určili pomocou SDS-Page elektroforézy na 20, 52 a 55 kDa. Proteínázy boli pri teplote 30 °C a alkalickom pH stabilné 4 hodiny, ale 60 minútový záchrev na 50 °C spôsobil 90 % pokles aktivity.

### Hydrolytické štiepenie a vznik horkých peptidov

Hydrolýza proteínov je katalyzovaná kyselinami, zásadami, alebo za pomoci proteolytických enzýmov. Enzymová katalýza je veľmi účinná a uskutočňuje sa za miernejších biologických podmienok, čím je možné zachovať nutričnú kvalitu aminokyselín. Preto sa tieto hydrolyzáty čoraz častejšie využívajú v krmovinárskom, ale hlavne potravinárskom priemysle [19].

Mlieko ako prirodzená strava všetkých novorodencov je výborným zdrojom proteínov. 80 % týchto proteínov tvoria kazeíny. Je známe, že pripravené kazeínové hydrolyzáty a produkty štiepenia, ktoré vznikajú v gastrointestinálnom trakte majú podobné nutričné vlastnosti a absorbujú sa lepšie ako zmes voľných aminokyselín. Fosforylované a defosforylované kazeínové hydrolyzáty sa preto používajú ako zdroje aminokyselín pre ľudí s určitými chorobami trávenia. Výskumy dokonca dokázali pozitívne fyziologické a biologické funkcie niektorých peptidov získaných hydrolýzou mliečnych proteínov [20]. Na druhej strane sa napr. pri výrobe syrov v procese zrenia môžu vznikať horké peptidy, ktoré sú zvyčajne nežiadúce, majú nepriaznivý vplyv na chuťnosť konečného výrobku a je potrebné ich odstrániť [19,21,22,23]. Preto je veľmi dôležité poznať stupeň hydrolýzy, výsledné produkty hydrolýzy, ako aj možnosti ovplyvnenia procesu. Za účelom získania týchto poznatkov sa robia pokusy na definovaných substrátoch a s definovanými enzýmami [19].

Stanovením stupňa hydrolýzy proteínov v potravinách sa zaoberal Adler-Nissen [24]. Základom stanovenia je reakcia primárnych aminoskupín hydrolyzátu s trinitrobenzénsulfónovou kyselinou za vzniku zafarbenia, ktorého absorbanca sa merala pri 340 nm.

Frings a kol. [25] sa zaoberali degradáciou kazeínu pôsobením proteínáz piatich rôznych kmeňov *B. linens*. Na kvantifikáciu enzymovej hydrolýzy pou-

žili HPLC na obrátených fázach. Výsledky ukázali, že proteínázy *B. linens* ATCC 9174 a DSM 20426 sú schopné úplne štiepiť alfa<sub>S1</sub>- a beta-kazeín, kým kmene DSM 20425, DSM 20158 a LBT 102 uprednostňovali len beta-kazeín. HPLC ukázala, že väčšina štiepných produktov mali hydrofilný charakter. Tieto výsledky sú významné hlavne z hľadiska zrenia syrov bez tvorby horkých peptidov, keďže je známe, že existuje úzky vzťah medzi horkosťou a priemerovou hydrofobicitou peptidov [26].

Predpokladá sa, že horkosť zapríčiňuje koncové zoskupenie -Leu-Phe-OH ako aj interakcia pepsínu so syridlom a niektorými enzýmami mliečnych baktérií [28].

Odstránenie horkej chuti pri výrobe syrov možno dosiahnuť použitím vhodnej mikroflóry. Zistilo sa napríklad, že *Streptococcus cremoris* E<sub>8</sub> spôsobuje rozklad horkých zlúčenín. Takisto proteínázy rôznych kmeňov streptokokov prispievajú k likvidácii horkej chuti syrov. Ale horkosť možno odstrániť aj napr. aplikáciou pankreatínu pri spracovaní mlieka na syry [28]. Na urýchlenie zrenia syrov s mazom na povrchu a bez tvorby horkej chuti sa používajú extracelulárne aminopeptidázy *Brevibacterium linens* [2]. Dôležitou vlastnosťou tohto mikroorganizmu je totiž pomalá degradácia kazeínu až na aminokyseliny [21].

## Literatúra

1. STEINFATT, F.: Über BL und sein Beziehungen zu einigen Begleitmikroorganismen in Milch. Milchwirtschaftliche Forschungen, 9, 1930, s. 1-50.
2. TORGENSEN, H. - SORHANG, T.: Peptide hydrolases of *Brevibacterium linens*. FEMS Microbiol. Lett., 4, 1978, s. 151-153.
3. HAYASHI, 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. (Paris) Brief Communications, 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. - O SULLIVAN, M.: Partial Purification and Characterisation of a Proteinase from *Brevibacterium linens*. Irish Journal of Agricultural and Food Research, 32, 1993, s. 185-194.
9. VARBANEC, L. - LICHOSERSTOV, L.M. - MEDVEDEV, S.A. - ZACHAROVA, I.J.: Vydelenie i charakteristika glykoproteinov iz cytoplazmatičeskoj membrany *Brevibacterium linens*. Mikrobiologia, 1981, s. 211-216.
10. STRAUSS, S.: Optimierung der Proteasebildung durch *Brevibacterium linens*. Dizertačná práca, TU Viedeň, 1994, 135 s.
11. WEIMER, B.C.: Optimalization of growth and proteolytic enzyme production in *Brevibacterium linens*. Dizertačná práca, Utah State University, 1990, s. 130.

12. TOKITA, F. - HOSONO, A.: Extracellular protease produced by *Brevibacterium linens*. I. Production and some properties of the extracellular protease. Nippon Chikusan Gakkaishi, 43, 1972, s. 151-153.
13. JUHASZ, O. - KNOŠKOVÁ, D. - ZEMANOVIČ, J. - ŠKÁRKA, B.: Extracellular proteinases from *Brevibacterium linens*. Purification and characterization. Collect. Czech. Chem. Commun., 50, 1990, s. 841-845.
14. FOISSY, H.: Aminopeptidase from *Brevibacterium linens* Activation and inhibition. Z. Lebensm. Unters. - Forsch., 166, 1978, s. 164-166.
15. BREZINA, 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.
16. HAYASHI, K.: Purification and characterization of two aminopeptidases produced by *Brevibacterium linens*. J. Gen. Microbiol., 135, 1989, s. 2027-2034.
17. HAYASHI, K.: Culture conditions of *Brevibacterium linens* for Production of Proteolytic Enzymes. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37, 1990, s. 737-739.
18. SORHAUG, T.: Comparison of peptide hydrolases from six strains of *Brevibacterium linens*. Milchwissenschaft, 36, 1981, s. 137-139.
19. ADLER-NISSEN, J.: Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied science publishers, London and New York, 1976, s. 427.
20. LEMIEUX, L. - AMIOT, J.: High-performance liquid chromatography of casein hydrolysates phosphorylated and dephosphorylated. I. Peptide mapping. Journal of chromatography, 519, 1990, s. 299-321.
21. BREZINA, P. - CIKÁNEK, D. - PLOCKOVÁ, M. - SCHOVÁNKOVÁ, I. - KOPEČNÝ, J.: Vlastnosti a degradace hořkých peptidů v sýrech. Mlékařské listy, 14, 1988, s. 303-304.
22. ADLER - NISSEN, J.: Bitterness intensity of protein hydrolysates - chemical and organoleptic characterisation. Frontiers of flavor, In: 5th International flavor conference, Elsevier science publishers B. V., Amsterdam, 1988, s. 63-77.
23. HARVALKAR, V.R. - ELLIOTT, J.A.: Isolation of Bitter and Adstringent fraction from Cheddar Cheese, J. Dairy Sci., 54, 1970, s. 8-11.
24. ADLER - NISSEN: Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agric. Food Chem., 27, 1979, s. 1256-1262.
25. FRINGS, E. - HOLTZ, CH. - KUNZ, B.: Studies about casein degradation by *Brevibacterium linens*. Milchwissenschaft, 48, 1993, s. 130-133.
26. KYUNG-HYUN, S. - HYONG-JOO, L.: Bitter peptides derived from  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein digested with alkaline protease from *Bacillus subtilis*. Korean J. Food Sci. Technol., 20, 1988, s. 479-480.
27. ZEMANOVIČ, J. - VALÍK, L. - GÖRNER, F.: Vplyv aktivity vody na rast a tvorbu proteínů *Brevibacterium linens*. Bulletin PV, 31, 1992, s. 249-256.
28. PRÍBELA, A.: Horké látky ovocia a zeleniny. Poľnohospodárska veda, VEDA, Bratislava, 1980, 159 s.

Do redakcie došlo 29.5.1995

#### Proteinases of *Brevibacterium linens*

JARMILA TOMASCHOVÁ - JAROSLAV ZEMANOVIČ

Summary. The survey deals with extracellular and intracellular proteinases of *Brevibacterium linens*, with the possibilities of their production by submerged cultivation with a followed isolation and purification. The biochemical properties and information about casein hydrolysis by obtained enzymes are presented.