

AGNIESZKA GŁOWACKA, TADEUSZ TRZMIEL

IMMOBILIZACJA SUBTILIZYN Z TRZECH GATUNKÓW BAKTERII: *BACILLUS SUBTILIS*, *B. LICHENIFORMIS* I *B. ALCALOPHILUS*

Streszczenie

W pracy opisano immobilizację subtilizyn: z *B. subtilis* IBTC-3 (typu BPN'), alkalostabilnej z *B. alcalophilus* BP92 oraz Carlsberg z *B. licheniformis* na celulozie Whatman oraz szkle porowatym, wykorzystując metodę diizocyjanianową. Lepsze rezultaty dała immobilizacja na szkle porowatym przy użyciu heksametylenodiizocyjanianu. Aktywność proteolityczna immobilizowanych preparatów wynosiła (37,5-46,7 mJA/g nośnika przy wydajności 33-44%). W pracy określono ponadto właściwości subtilizyny ze szczepu *B. subtilis* IBTC-3 immobilizowanej na szkle porowatym. Uzyskany preparat enzymatyczny wykazywał optymalną aktywność proteolityczną w pH = 10,7 i temperaturze 60-65°C.

Wprowadzenie

Subtilizyny (EC 3.4.21.62) są to proteiny serynowe pozakomórkowo wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Bacillus*. Występują w kilku odmianach różniących się właściwościami fizykochemicznymi (m.in. optymalnym pH, masą cząsteczkową, punktem izoelektrycznym, składem aminokwasowym, a także zdolnością do hydrolizy syntetycznych substratów, m.in. BTEE, ATEE) [8]. Dzieli się je na dwie grupy:

- a) subtilizyny typu Carlsberg (dawniej subtilopeptydazy A), obejmujące serynowe proteiny *B. pumilus* i *B. licheniformis*.
- b) subtilizyny typu BPN' (dawniej subtilopeptydazy B), obejmujące subtilizyny BPN' i Novo, a także serynowe proteiny *B. subtilis* NRRL B-3411 i *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*.

Alkalofilne szczepy z rodzaju *Bacillus*, produkują subtilizyno-podobne proteiny, odbiegające nieco właściwościami od typowych subtilizyn [18]. Enzymy te wyróżniają się wysoce alkalicznym optimum pH działania, sięgającym nawet 11-12. Niektórzy uważają, że enzymy te są pochodnymi subtilizyny Carlsberg. Jednakże właściwości

immunologiczne alkalostabilnej serynowej proteiny wytwarzanej przez *B. alcalophilus* odbiegają od właściwości subtilizyny Carlsberg i BPN' [15].

Pomimo wspomnianych różnic, wszystkie subtilizyny mają identyczne centrum aktywne, w którym seryna, histydyna, kwas asparaginowy tworzą tzw. katalityczną triadę [15]. Cząsteczki subtilizyn zbudowane są z pojedynczych łańcuchów polipeptydowych i są stabilizowane obecnością jonów Ca^{2+} [13].

Subtilizyny znane są z niewrażliwości ich struktury na obecność związków denaturujących [1,3]. Utrzymują aktywność proteolityczną i esterazową w stężonych roztworach mocznika, etanolu czy dioksanu [7,11], nie tracą również aktywności w środowisku silnie alkalicznym, w obecności detergentów, wybielaczy tkanin i środków piorących [6,7,11]. Subtilizyny wykazują szeroką specyficzność substratową. Rozszczepiają ponadto estry różnych N-acetylowanych i N-benzoilowanych L-aminokwasów, tzw. aktywność esterazowa.

W ostatnich latach interesującym kierunkiem rozwoju i modyfikacji procesów biotechnologicznych jest zastępowanie stosowanych w nich wolnych biokatalizatorów ich immobilizowaną formą.

Immobilizowane preparaty enzymów wykazują wiele istotnych zalet w porównaniu z formami natywnymi:

- ułatwiają kontrolę procesu,
- umożliwiają wielokrotne wykorzystanie biokatalizatora,
- pozwalają na otrzymanie produktu nie zanieczyszczonego enzymem (ważne dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego),
- pozwalają na prowadzenie procesów ciągłych,
- immobilizacja enzymu sprzyja celowej zmianie właściwości katalitycznych, w tym jego swoistości, zależności katalitycznej od pH, odporności na działanie czynników denaturujących.

Wprowadzenie i stosowanie immobilizowanych biokatalizatorów otworzyło nowe, wcześniej niedostępne drogi rozwoju enzymologii stosowanej [5].

Celem pracy były badania nad immobilizacją trzech serynowych proteinaz: subtilizyny IBTC-3, wytwarzanej przez bakterie *B. subtilis* IBTC-3, alkalostabilnej z *B. alcalophilus* i subtilizyny Carlsberg z *B. licheniformis* oraz określenie właściwości subtilizyny IBTC-3 immobilizowanej na szkle porowatym metodą diizocyjanianową.

Materialy i metody badań

Odczynniki

Do badań zastosowano następujące odczynniki: hexametylenodiizocyjanian ALDRICH, chlorek cyjanurowy SIGMA, aldehyd glutarowy ALDRICH, trietyloamina

POCH (Gliwice), hemoglobina wołowa BIOMED, ester etylowy N-benzoilo-L-argininy (BAEE) SIGMA, celuloza Whatman, szkło porowate CORMAY (Lublin).

Stosowane enzymy

- Subtilizyna IBTC-3 (typu BPN¹), wytwarzana przez szczep *B. subtilis* IBTC-3 znajdujący się w kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej PŁ. Enzym wyizolowany został z zateżonego filtratu podłoża pohodowlanego bakterii, a następnie wysolony siarczanem amonu w temperaturze 4°C i pH 7,4, a następnie rozpuszczony w 0,1% octanie wapnia i poddany dializie wobec 0,1% roztworu octanu wapnia o pH 6,4 w temperaturze 6°C przez 12 godzin. Kolejny etap obejmował oczyszczanie na DEAE-celulozie w 0,1% roztworze octanu wapnia o pH 6,4 w celu eliminacji białek balastowych, w tym α -amylazy i metaloproteiny. 1cm³ podczyszczanego roztworu enzymu zawierał 7,5 mg białka i wykazywał aktywność proteolityczną 8,5 mjA.
- Proteinaza alkalostabilna z *B. alcalophilus* PB92. Wykorzystano preparat handlowy MAXACAL. 0,5g preparatu rozpuszczano w 25 cm³ 0,1% octanu wapnia. 1 cm³ roztworu enzymu zawierał 1,6 mg białka i wykazywał aktywność proteolityczną 9 mjA.
- Subtilizyna Carlsberg z *B. licheniformis*. Preparat handlowy MAXATASE. 0,5 g preparatu rozpuszczano w 25 cm³ 0,1% octanu wapnia. 1 cm³ roztworu enzymu zawierał 2 mg białka i wykazywał aktywność proteolityczną 10 mjA.

Metody analityczne

Aktywność proteolityczną subtilizyn i ich immobilizowanych preparatów oznaczono metodą Ansona [4], stosując jako substrat zdenaturowaną mocznikiem hemoglobinę wołową.

Za jednostkę aktywności proteolitycznej Ansona [jA] przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach standardowych testu (6 cm³ inkubatu, 100 mg hemoglobiny, temperatura 25°C) hydrolizuje zdenaturowaną hemoglobinę z taką szybkością początkową, że ilość rozpuszczonego w 5% kwasie trójchlorooctowym produktu hydrolizy powstająca w czasie jednej minuty, daje po reakcji z odczynnikiem Folina wartość absorbancji odpowiadającą 1mM tyrozyny.

Aktywność esterazową oznaczono spektrofotometrycznie [12] przy $\lambda = 254$ nm, pH 8,0 i temperaturze 25°C, stosując jako substrat ester etylowy N-benzoilo-L-argininy (BAEE). Aktywność wyrażono w jednostkach esterazowych [jE], określających ilość mikromoli rozłożonego w ciągu jednej minuty substratu, w przeliczeniu na BAEE.

Białko oznaczano metodą Lowry [9].

Termostabilność określono w następujących warunkach preinkubacji: pH 9,0, za-

kres temperatur 20-70°C oraz czas $t = 10$ min. i $t = 60$ min.

Stałą Michaelisa-Menten określono dla hemoglobiny w następujących warunkach: optymalne pH, temperatura 25°C, stężenie substratu 0,1-2%. Wartości K_M i V_{max} wyznaczono z wykresu Lineweavera-Burka.

Immobilizacja enzymów na szkle porowatym lub celulozie metodą diizocyjanianową [2]

1 g nośnika (szkła porowatego o $d_p = 200-315$ μm , $D = 63,2$ nm lub celulozy Whatman) zawieszono w 50 cm^3 acetonu. Następnie dodano $\rho 2$ cm^3 trietyloaminy i hexametylenodiizocyjanianu i mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 45 min w temperaturze pokojowej. Nośnik przemyto 50 cm^3 acetonu, a następnie trzy razy 30 cm^3 wody. Po 1 g uaktywnionego nośnika łączono z 12,5 cm^3 roztworów badanych subtilizyn. Immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C w ciągu 16-18 godzin, mieszając. Immobilizowany enzym oddzielono od roztworu, przemyto trzema porcjami 0,1% octanu wapnia i pozostawiono do suszenia w temperaturze pokojowej na 24 godziny.

Wyniki i dyskusja

Immobilizacja subtilizyn

W tabeli 1. zestawiono wyniki badań nad immobilizacją subtilizyn: z *B. subtilis* IBTC-3, alkalostabilnej z *B. alcalophilus* PB92 oraz Carlsberg z *B. licheniformis* na celulozie Whatman aktywowanej metodą diizocyjanianową. We wszystkich trzech przypadkach aktywność proteinaz na nośniku po immobilizacji jest zbliżona i wynosi 17-19 mJ/g nośnika przy wydajności 15-16% liczonej względem aktywności subtilizyn w roztworach użytych do procesu. Najwięcej białka (52,6 mg) osadziło się podczas immobilizacji subtilizyny IBTC-3, należy jednak brać pod uwagę, że ten enzym był najslabiej oczyszczony – jego aktywność właściwa wynosiła około 1,1 mJ/g białka. Najmniej białka na nośniku osadziło się podczas immobilizacji subtilizyny alkalostabilnej (aktywność właściwa tego enzymu była najwyższa i wynosiła 5,6 mJ/g białka).

W tabeli 2. zamieszczono wyniki badań nad immobilizacją subtilizyn na szkle porowatym aktywowanym metodą diizocyjanianową. Aktywność subtilizyn IBTC-3 i Carlsberg na nośniku po immobilizacji jest zbliżona i wynosi 46-48 mJ/g nośnika przy wydajności 38-44% liczonej względem aktywności w roztworach użytych do procesu. Najslabsze wyniki immobilizacji uzyskano dla subtilizyny alkalostabilnej (37,5 mJ/g nośnika przy wydajności 33,3%). Ilość białka wiązanego z nośnikiem była zdecydowanie mniejsza (11-22 mg/g nośnika) aniżeli podczas immobilizacji na celulozie Whatman. Najwięcej białka (22 mg) osadziło się podczas immobilizacji subtilizyny IBTC-3, natomiast najmniej podczas immobilizacji subtilizyny alkalostabilnej (11 mg/g nośnika).

Tabela 1

Immobilizacja na celulozie metodą diizocyjanianową.
Immobilization on cellulose with diisocyanate method.

Enzym Enzyme	Aktywność proteolityczna Proteolytic activity [mJA/g]	Wydajność Yield [%]	Białko Protein [mg/g]	Wydajność Yield [%]
Subtilizyna IBTC-3 Subtilisin IBTC-3	17	16	52,6	56
Subtilizyna Carlsberg Subtilisin Carlsberg	19	15,2	43,6	40
Proteinaza alkalostabilna PB92 High-alkaline proteinase PB92	17	15,1	22,8	26

Tabela 2

Immobilizacja na szkle porowatym metodą diizocyjanianową.
Immobilization on porous glass with diisocyanate method.

Enzym Enzyme	Aktywność proteolityczna Proteolytic activity [mJA/g]	Wydajność Yield [%]	Białko Protein [mg/g]	Wydajność Yield [%]
Subtilizyna IBTC-3 Subtilisin IBTC-3	46,7	44	22	16
Subtilizyna Carlsberg Subtilisin Carlsberg	48	38,4	16,7	11,6
Proteinaza alkalostabilna PB92 High-alkaline proteinase PB92	37,5	33,3	11	8,5

Właściwości immobilizowanej subtilizyny IBTC-3

W tabeli 3. oraz na rysunkach 1 i 2 prezentujemy właściwości preparatu immobilizowanej subtilizyny IBTC-3 na szkle porowatym aktywowanym heksametylenodiiizocyjanianem. Wybór tego preparatu podyktowany był jego wysoką aktywnością proteolityczną (46,7mJA/g nośnika), jak również ciekawymi właściwościami katalitycznymi w kierunku syntezy estru etylowego kwasu fenylooctowego (wyniki w trakcie opracowań). W celu porównania przedstawiamy również właściwości natywnej subtilizyny IBTC-3.

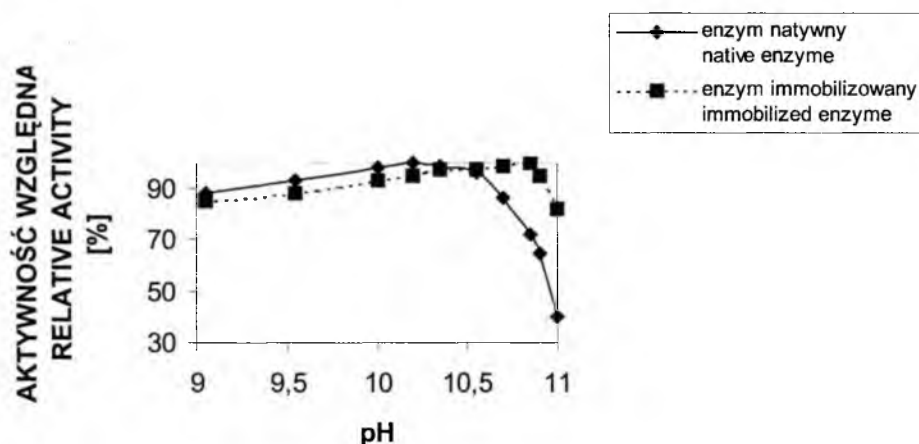
Tabela 3

Właściwości preparatów subtilizyny z *Bacillus subtilis* IBTC-3.

The properties of subtilisin preparations from *Bacillus subtilis* IBTC-3.

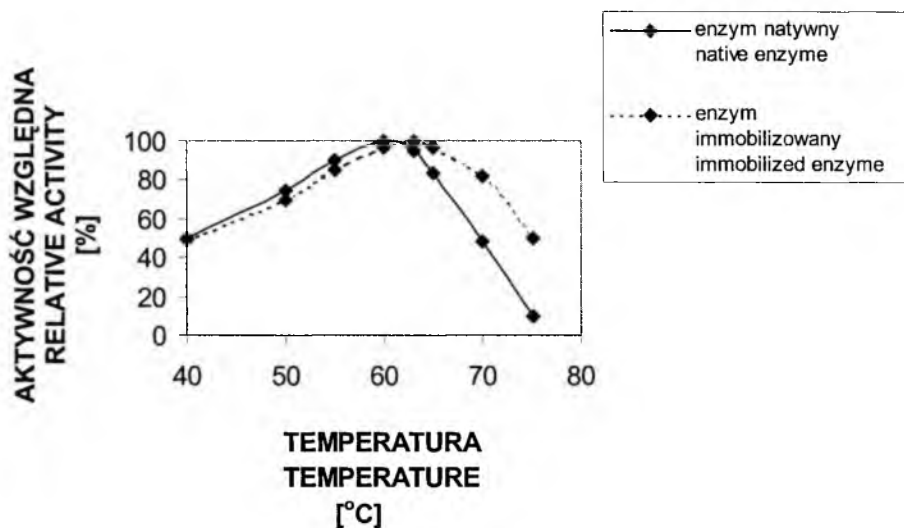
Parametry Parameters	Preparat natywny * Native preparation	Preparat immobilizowany Immobilized preparation
Optymalne pH Optimum pH	10,2	10,7
Optymalna temperatura Optimum temperature [°C]	60	60-65
Aktywność proteolityczna Proteolytic activity [mJA/g]		
-pH optymalne	600	46,7
-pH 7,3	522	41,90
Aktywność esterazowa Esterase activity [jE/g.]	7,39	2,41
Zawartość białka Protein content [mg/g]	283	22
K _M dla hemoglobiny K _M for hemoglobin [M]x10 ⁻⁵	1,80	9,2
Czas półtrwania (tygodnie) Half-life,(weeks)	—	29

* dla preparatu stałego po wysoleniu siarczanem sodowym



Rys. 1. Wpływ pH na aktywność proteolityczną immobilizowanej subtilizyny IBTC-3.

Fig. 1. Effect of pH value on the proteolytic activity of immobilized subtilisin IBTC-3.



Rys. 2. Wpływ temperatury na aktywność proteolityczną immobilizowanej subtilizyny IBTC-3.

Fig. 2. Effect of the temperature on the proteolytic activity of immobilized subtilisin IBTC-3.

Prezentowane wyniki wskazują, że dla immobilizowanej subtilizyny ze szczepu *B. subtilis* IBTC-3 optymalne pH działania wobec hemoglobiny wynosi $\text{pH} = 10,7$, a więc wzrosło o 0,5 jednostki w porównaniu z formą natywną. Również optymalna temperatura działania subtilizyny po immobilizacji uległa przesunięciu w kierunku wyższych wartości (z 60°C do 65°C), co pośrednio świadczy o jej większej termostabilności.

Zjawiskiem niekorzystnym towarzyszącym procesowi immobilizacji subtilizyny ze szczepu *B. subtilis* IBTC-3 na szkle porowatym z wykorzystaniem metody diizocyanianowej jest wzrost wartości K_M wobec hemoglobiny z $1,89 \cdot 10^{-5}$ [M] do $9,2 \cdot 10^{-5}$ [M], co świadczy o zmniejszeniu się powinowactwa immobilizowanej proteiny w stosunku do związków wielkocząsteczkowych. Stosunek aktywności proteolitycznej do esterazowej natywnego enzymu wynosi 81, a po immobilizacji tylko 19. Może to sugerować, że związki wielkocząsteczkowe (np. hemoglobina) mają utrudniony dostęp do centrum aktywnego immobilizowanej subtilizyny w porównaniu do związków niskocząsteczkowych (np. BAEE), w stosunku do których przejawia ona swoją aktywność esterazową.

Podsumowanie

Przedstawione wyniki badań potwierdzają, że subtilizyny są enzymami trudnymi do immobilizacji. Przypuszcza się, że przyczyna utraty właściwości katalitycznych

niektórych cząsteczek tych enzymów, znajduje się w naturze budowy przestrzennej subtilizyn. Z uwagi na brak mostków disulfidowych -S-S- [10], rolę stabilizującą jej przestrzenną strukturę, pełnią wiązania jonowe $-NH_3^+ \cdots OOC^-$ [19]. W przypadku stosowania większości metod kowalencyjnego wiązania białka enzymatycznego z nośnikiem, immobilizacja zachodzi prawie wyłącznie poprzez wolne grupy aminowe enzymu, co prawdopodobnie niszczy część wiązań jonowych i powoduje destabilizację struktury enzymu i w konsekwencji jego inaktywację. Aktywacja nośnika heksametylenodiiizocyjanianem powoduje, iż obok grup $-NH_2$, enzym wiąże się z nośnikiem również poprzez grupy $-OH$ [2, 17]. Można założyć, że cząsteczki subtilizyny związane przez grupy $-OH$ są nadal aktywne, natomiast te związane przez $-NH_2$ ulegają w przeważającej części inaktywacji.

Metoda z użyciem szkła jako nośnika umożliwiła otrzymanie z dużą powtarzalnością preparatów immobilizowanych subtilizyn: IBTC-3, Carlsberg i alkalostabilnej o aktywności proteolitycznej (37,5-48 mJ/g nośnika). Wydajność procesu liczona względem aktywności proteolitycznej jest zadowalająca (33,3-44% teoretycznej).

LITERATURA

- [1] Brown M.F., Schleich T.: *Biochemistry*, **4**, 1975, 3069.
- [2] Chen L., Tsao G.T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1974, 1463.
- [3] Christensen P.N., Holm P., Snder.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **55**, 1978, 109.
- [4] Davis N.C., Smith E.L.: *Methods of Biochemical Analysis, (Assay of Proteolytic Enzymes)*, New York, 1958.
- [5] Jęgorowa N., Samuǳłowa W.: *Biotechnologia, (Immobilizowane Enzymy)*, Poznań, **7**, 1992.
- [6] Keay L.: *Proc. IV IFS-Ferment. Technol. Today*, Kyoto, Japan, 1972, 289.
- [7] Keay L., Moser P.W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 1969, 600.
- [8] Keay L., Moser P.W., Wildi B.S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 1970, 12.
- [9] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.I.: *J. Biol. Chem.* **193**, 1951, 265.
- [10] Markland F.S., Kurihara M., Smith E.L.: *J. Biol. Chem.* **247**, 1972, 5602.
- [11] Ottesen M., Svendsen J.B.: *Methods in Enzymology*, (by Perlman G.E., Lorand L.), 1970.
- [12] Rick W.: *Methods of Enzymatic Analysis, (Trypsin)*, (by Bergmayer, H.U.), New York, London: Acad. Press, **2**, 1974.
- [13] Roig M.G., Rashid D.H., Kennedy J.F.: *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, **55**, 1995, 95.
- [14] Stanffer C.E., Treptow, R.W.: *Biochem. Biophys. Acta*, **295**, 1973, 457.
- [15] Stryer L.: *Biochemia*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1997, 218.
- [16] Takii Y., Kuriyama N., Suzuki Y.: *Appl. Microbiol. Biotech.*, **34**, 1991, 57.
- [17] Triwien M.: *Immobilizowanyje Fermienty. Biotechnologia* **7**, Moskwa, 1987.
- [18] Tsai Y.C., Lin S.F., Yamazaki M., Tamura G.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **883**, 1986, 439.
- [19] Wright Ch.S., Alden R.A., Kraut J.: *Nature*, **221**, 235, 1969.

THE IMMOBILIZATION OF SUBTILISINS FROM THREE BACTERIA SPECIES: *BACILLUS SUBTILIS*, *B. LICHENIFORMIS* AND *B. ALCALOPHILUS*

S u m m a r y

In the study the immobilization of subtilisins (from *B. subtilis* IBTC-3 (type BPN'), high-alkaline from *B. alcalophilus* BP92, Carlsberg from *B. licheniformis*) on Whatman cellulose and porous glass with diisocyanate method was carried out. The immobilization on porous glass activated by hexamethylene diisocyanate gave better results than on Whatman cellulose. The proteolytic activity of immobilized preparations was 37,5-46,7 mJA/g of support with 33-44% yield.

The properties of subtilisin from strain *B. subtilis* IBTC-3 immobilized on porous glass were investigated. The obtained enzymatic preparation showed optimum proteolytic activity at pH = 10,7 and at 60-65°C. ❖