

## Vplyv aktivity vody na rast a tvorbu proteináz *Brevibacterium linens*

JAROSLAV ZEMANOVIČ—LUBOMÍR VALÍK—FRIDRICH GÖRNER

Súhrn. Sledoval sa rast a produkcia proteináz *Brevibacterium linens* pri rôznej aktivite vody ( $a_w$ ), ktorá bola upravovaná prídavkom NaCl, resp. glukózy. V médiu s klesajúcou hodnotou  $a_w$  upravenou NaCl nebol rast výrazne ovplyvnený do hodnoty 0,971. Inhibícia rastu sa prejavila pri  $a_w = 0,945$ . Produkcia proteináz 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  $a_w = 0,961$ .

*Brevibacterium linens* je gram-pozitívny, polymorfný, striktne aeróbny, halo-tolerantný mikroorganizmus [1]. V technickej potravinárskej mikrobiológii nachádza uplatnenie v syrárskej technológii, kde sa jeho proteolytické vlastnosti využívajú na zrenie mäkkých a polotvrdých syrov. Okrem toho je potenciálnym producentom priemyselne využiteľných proteináz.

Štúdiu produkcie, izolácie, identifikácie a účinnosti extracelulárnych a intracelulárnych proteolytických enzýmov *B. linens* sa z hľadiska syrárskej technológie venovali viacerí autori. Boyaval a Desmazeaud [2] publikovali obsiahly literárny prehľad o *B. linens* z hľadiska jeho prítomnosti na syroch zrejúcich pod mazom, o jeho taxonómii, nutričných požiadavkách, proteolytických, ako aj lipolytických aktivitách, produkcii prchavých látok a degradácii aminokyselín, ako aj o ďalších možnostiach jeho využitia v syrárskej technológii. Foissy [3—8] sa zamerával najmä na skúmanie intracelulárnych a extracelulárnych enzýmov *B. linens*; izoloval a podrobne opísal 6 extracelulárnych proteináz. Torgensen a Sørhaug [9] sa venovali špeciálne peptidovým hydrolázam. Famelartová a kol. [10] študovali rastové podmienky *B. linens* metódou faktoriálneho plánovania experimentov, pričom poukázali na vplyv obsahu jednotlivých aminokyselín, ako aj určitého množstva kyslíka a vhodnej pH hodnoty v médiu na rast a tvorbu metabolitov *B. linens*. Palo a Anderle [11] a Palo a Bačíková [12]

---

Ing. Jaroslav Zemanovič, CSc., Ing. Lubomír Valík, prof. Ing. dr. Fridrich Görner, DrSc., Katedra mlieka, tukov a hygieny poživatin, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

skúmali možnosti urýchlenia zrenia syrov stimuláciou enzýmovej činnosti *B. linens* zmesou stopových prvkov. Juhász a kol. [13] izolovali a purifikovali proteolytické enzýmy z kultivačného média *B. linens* a pri jednom z nich merali hydrolytickú účinnosť na prírodné substráty: kazeín, hemoglobín, ovalbumín a hovädzí sérový albumín. Z priemyselného hľadiska zistili jeho dobrú stabilitu pri hodnote pH 8 pri 30 °C. Zemanovič a Škárka [14] experimentálne preukázali, že v prípade priemyselného využitia proteináz *B. linens*, je potrebné výrazne zvýšiť ich produkciu, čo možno dosiahnuť mutagenézou a selekciou vhodných kmeňov. Ďalšiemu využívaniu *B. linens* ako producenta priemyselne využiteľných proteináz sa v súčasnosti venujú ďalšie práce.

Zníženie aktivity vody významne ovplyvňuje rast a metabolizmus mikroorganizmov. V prípade halotolerantných mikroorganizmov sa v tomto smere môžu očakávať určité anomálie [15]. Preto sa v prezentovanej práci skúmal vplyv zníženia aktivity vody fermentačného média *B. linens* na jeho rast, a v súvislosti s tým aj na tvorbu proteináz v priebehu kultivácie.

### Materiál a metódy

Použitý kmeň *Brevibacterium linens* LF 200 je zo zbierky mliekárenských kultúr LAKTOFLORA a. s. MILCOM Praha. Po oživení v bujóne obohatenom enzýmovým hydrolyzátom kazeínu (1 %) a laktózou (1 %) sa tento kmeň kultivoval v mliečnom médiu štandardného zloženia: vždy rovnaké sušené odstredené mlieko (MILEX Veľký Meder) — 15 g, kvasničný autolyzát (IMUNA) — 1 g, peptón pre bakteriológiu (IMUNA) — 1 g, destilovaná voda — 150 ml (sterilizácia 0,12 MPa 20 min, pH 7,0–7,2), ako aj v médiu s prídavkom primeraného množstva NaCl alebo glukózy, ktoré sa na zníženie aktivity vody média použilo vzhľadom na jeho konštantné zloženie. Roztoky glukózy a NaCl sa sterilizovali separátne. Ako inokulum sa použilo 1 % 24 h kultúry *B. linens* pomnoženej v bujóne s enzýmovým hydrolyzátom kazeínu. Kultivácia prebiehala za neustálej štandardnej aerácie na trepačke s počtom kmitov  $120 \cdot \text{min}^{-1}$  pri  $26 \pm 1$  °C.

Na získanie úplnej rastovej čiary sa tri banky s príslušným médiom po naočkovaní 1 % aktívnej kultúry začali kultivovať a na celkový počet buniek a ich zhlukov vyšetrovať o ôsmej hodine ráno a s meraním sa v dvojhodinových intervaloch pokračovalo nepretržite do dvadsiatej hodiny. V tomto čase sa rovnako naočkovali a začali inkubovať ďalšie tri banky príslušného média. Meranie celkového počtu buniek a ich zhlukov sa v týchto bankách začalo až na druhý deň ráno o 8.00 h, a podobne ako pri prvej sérii baniek, zahrnulo 48 h

kultivácie. Zlúčením výsledkov meraní rastovej krivky z oboch sérií sa získala plynulá čiara za 48 h.

Počet buniek a ich zhlukov sa stanovil mikroskopicky v 0,01 ml vzorky rozotretej na podložnom sklíčku na ploche  $1\text{ cm}^2$  po vysušení, fixácii plameňom a metanolom a farbení podľa Lewina a Blacka [16]. Izolované bunky sa počítali ako jednotky a v tesných zhlukoch sa celý útvar počítal tiež ako bakteriálna jednotka (BJ) [17].

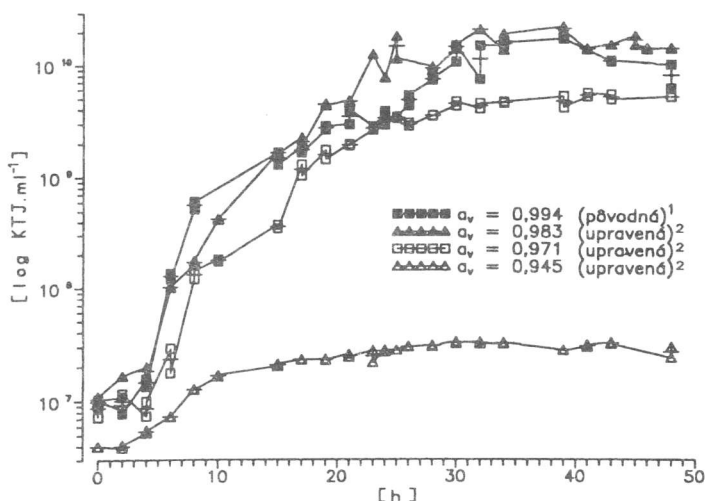
Pôvodné médium malo hodnotu  $a_v = 0,994$ . S primeraným prídavkom NaCl sa hodnota  $a_v$  v médiu znížila na  $a_v = 0,983$  (asi 3,4 % NaCl),  $a_v = 0,971$  (asi 5 % NaCl) a  $a_v = 0,945$  (asi 9 % NaCl). Podobne sa hodnoty  $a_v$  v médiu znižovali prídavkom glukózy;  $a_v = 0,980$  (asi 15 %),  $a_v = 0,961$  (asi 24 %). Aktivita vody sa v pôvodnom a v upravených médiách merala kryoskopicky na základe teploty tuhnutia Beckmannovým teplomerom s presnosťou na  $0,01\text{ }^\circ\text{C}$ . Na výpočet sa použil vzťah podľa Chena [18]:  $2,303 \log a_v = 0,0097 t_t$ , kde  $t_t$  je teplota tuhnutia média. Na kontrolu správnosti uvedeného vzťahu vypočítanej hodnoty  $a_v$  sa použili štandardné roztoky NaCl [19].

Tvorba proteínáz *B. linens* LF 200 sa sledovala v rovnakom médiu ako jeho rast. Ich aktivita sa merala v roztoku kazeínu podľa Hammerstena (Lachema). Nerozložený kazeín ako substrát sa vyzrážal kyselinou trichlóroctovou, zrazenina sa odcentrifugovala a v supernatante sa štiepne produkty stanovili v alkalickom prostredí s ninhydrínom spektrofotometricky pri  $570\text{ nm}$  oproti kontrole. Aktivita proteínáz sa vypočítala použitím kalibračnej čiary pre závislosť množstva aminokyselín od absorbancie po ich reakcii s ninhydrínovou reagensiou [19]. Štandardne naočkované médium sa inkubovalo 48 h pri  $26 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  za neustáleho trepania; merania proteolytickej aktivity proteínáz *B. linens* sa robili v trojhodinových intervaloch. Výsledky sú aritmetické priemery z troch paralelných kultivačných sérií, v každej dvojmo.

## Výsledky a diskusia

Rast *B. linens* v médiu s NaCl so zníženou hodnotou  $a_v$  (obr. 1). V pôvodnom mliečnom médiu ( $a_v = 0,994$ ) trvala lag-fáza po naočkovaní aktívnej kultúry dve až štyri hodiny. Potom nastúpil intenzívny rast do ôsmej až desiatej hodiny. Spomalený, ale ďalej dobrý rast sme pozorovali do 21. až 30. hodiny, keď sa dosiahla maximálna hustota buniek a ich zhlukov  $10^9$  až  $10^{10}$  v 1 ml. V mliečnom médiu, v ktorom sa hodnota  $a_v$  znížila prídavkom NaCl na 0,983, sa zistila podobná rastová krivka, ktorá sa významne nelíšila od predchádzajúcej; aj maximálne hodnoty BJ  $\cdot\text{ml}^{-1}$  boli podobné. V médiu s hodnotou  $a_v$  zníženou na 0,971 sa lag-fáza opäť významne nepredĺžila. Priebeh množenia buniek sa od predchádzajúcich experimentov, čo sa týka tvaru rastovej

krivky, tiež nezmenil, iba počet buniek po ukončení log-fázy rastu bol v priemere nižší o jeden log-poriadok ( $10^9$  BJ . ml<sup>-1</sup>). Významný vplyv na rast *B. linens* sme zaznamenali až v médiu s  $a_v = 0,945$ . Lag-fáza sa ale ani v tomto prípade významne nepredĺžila; znížená hodnota  $a_v$  sa prejavila redukciou počtu buniek a zhukov. Významnejší rast počtu BJ . ml<sup>-1</sup> sme zaznamenali do asi 10. hodiny, potom narastal iba v zlomkoch jednotky log-poriadku; maximálny počet buniek a zhukov bol iba mierne nad hodnotou  $1 \cdot 10^7$  BJ . ml<sup>-1</sup>.

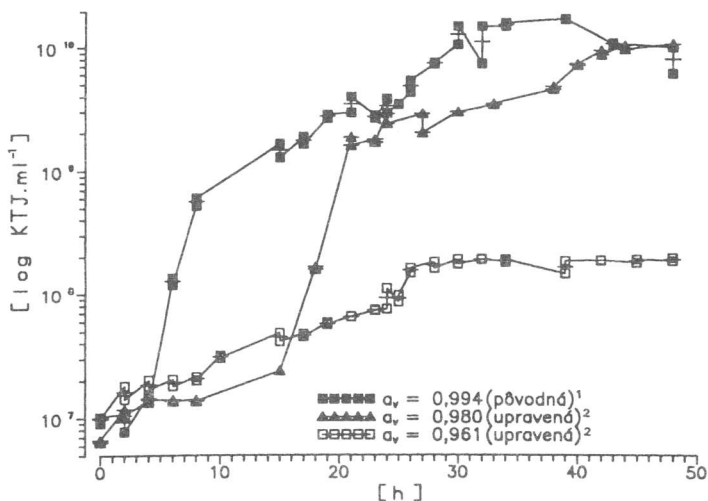


Obr. 1. Rast *Brevibacterium linens* (LAKTOFLORA 200) v mliečnom bujone pri  $26 \pm 1$  °C v závislosti od aktivity vody upravenej NaCl.

Fig. 1. The growth of *Brevibacterium linens* (LAKTOFLORA 200) in lactic medium at the temperature of  $26 \pm 1$  °C in dependence of water activity treated with NaCl. (1 — Original, 2 Treated.)

Rast *B. linens* v médiu s glukózou so zníženou hodnotou  $a_v$  (obr. 2). V neupravenom mliečnom médiu ( $a_v = 0,994$ ) sa opakovane obraz rastovej krivky z predchádzajúceho pokusu. V mliečnom médiu so zníženou hodnotou  $a_v$  na 0,980 prídavkom glukózy bol rast *B. linens* zo začiatku významne inhibovaný, lag-fáza trvala až 15 hodín. Potom sme asi až do 23. hodiny zaznamenali intenzívny rast; počet BJ/ml sa za 8 h zvýšil skoro o 2 log-poriadky, prebehla zjavná intenzívna logaritmická fáza rastu s priemerným časom zdvojenia 0,75 h. Potom rast pokračoval pomalšie, pričom ale medzi 40. a 48. hodinou dosiahol denzitu  $10^9$  až  $10^{10}$  BJ . ml<sup>-1</sup>, čo sa dá prirovnať k maximálnym hodnotám dosiahnutým v médiu s nezniženou hodnotou  $a_v$ .

Porovnanie vplyvu zníženia hodnoty  $a_v$  v mliečnom médiu s NaCl a glukózou na rast *B. linens*. Predovšetkým vidieť, že *B. linens* je, čo sa týka rastu, halotolerantný a nie halofilný organizmus; znižovanie hodnoty  $a_v$  v médiu s NaCl na 0,983



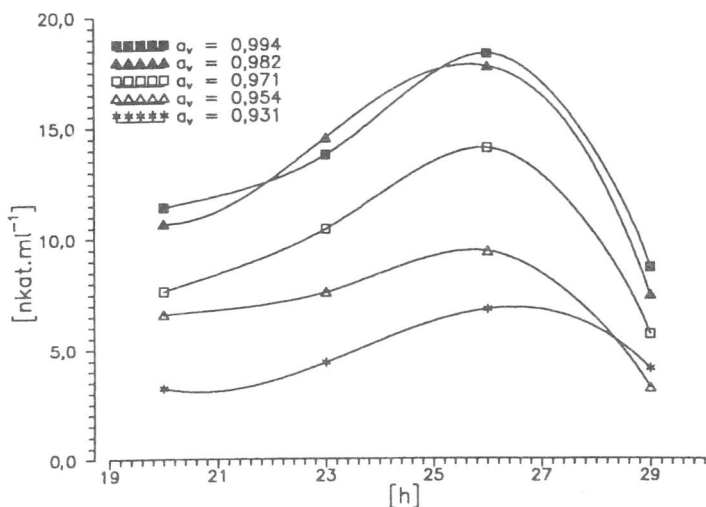
Obr. 2. Rast *Brevibacterium linens* (LAKTOFLORA 200) v mliečnom bujóne pri  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  v závislosti od aktivity vody upravenej glukózou.

Fig. 3. The growth of *Brevibacterium linens* (LAKTOFLORA 200) in lactic medium at the temperature of  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  in dependence of water activity treated with glucose. (1 — Original, 2 — Treated.)

a 0,971 jeho rast významne neovplyvnilo v pozitívnom ani v negatívnom zmysle. Pri účinnejšom znížení hodnoty  $a_v$  na 0,971 bol charakter rastovej krivky ešte zachovaný, iba maximálna denzita  $\text{BJ} \cdot \text{ml}^{-1}$  sa na konci kultivácie znížila asi o jeden log-poriadok oproti nezmenenému médiu. Z tejto skutočnosti možno predpokladať, že bunky *B. linens* majú k sodíkovým a chloridovým iónom značnú reparačnú schopnosť. Naproti tomu rovnaké zníženie hodnoty  $a_v$  v mliečnom médiu prídavkom glukózy na  $a_v = 0,980$  malo na rast *B. linens* významný vplyv. Mimoriadne predĺžená lag-fáza poukazuje na skutočnosť, že bunky najprv potrebovali značné množstvo energie na transfer živín z osmoticky zmeneného prostredia a z nich zmetabolizovaných látok do prostredia. Až po prispôbení sa buniek zvýšenému osmotickému tlaku príjmom látok z neho alebo látkami vzniknutými vlastnou syntézou v bunke, prejavil sa ich významný rast [21, 22]. Tento jav sme pozorovali aj u iných baktérií. Calhoun a Frazier [23] zistili u buniek *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens* väčší inhibičný účinok NaCl ako glukózy, ale u *Staphylococcus aureus* dokázali opačne väčší inhibičný účinok glukózy ako NaCl pri rovnakých hodnotách  $a_v$ .

Tvorba proteínáz v mliečnom médiu so zníženou hodnotou  $a_v$  prídavkom NaCl (obr. 3). V syrárskej technológii, ako aj pri produkcii proteolytických enzýmov *B. linens* je záujem stimulovať ich tvorbu. Keďže *B. linens* je halotolerantný mikroorganizmus, predpokladá sa, že do určitej miery znížená aktivita vody v prostredí nebude inhibovať produkciu proteínáz, ale naopak, môže ich tvor-

bou pozitívne ovplyvniť. Z tohto pohľadu je preto nutné zistiť tak hodnoty aktivity vody, ktoré tvorbu proteínáz inhibujú, ako aj mieru jej inhibície spôsobenú príslušnými hodnotami  $a_v$ . Pokusy sme zamerali na skúmanie vplyvu znižovania hodnoty  $a_v$  v prostredí prídavkom NaCl na tvorbu proteínáz *B. linens*. Merania sme robili paralelne v troch rovnako naočkovaných médiách s aktívnou kultúrou *B. linens*; obsah každej banky sme vyšetrovali paralelne dvakrát. Kultivácia prebiehala 48 h pri  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  na trepačke. V predpokusoch sme pri kultivácii zistili, že maximálna tvorba proteolytických enzýmov bola medzi 20. a 30. hodinou. V hlavnom pokuse sme v tomto intervale stanovovali proteolytickú aktivitu týchto enzýmov v trojhodinových intervaloch. Hodnoty aktivity vody v mliečnych médiách boli  $a_v = 0,994$  (bez úpravy),  $a_v = 0,982$ ;  $a_v = 0,971$ ;  $a_v = 0,954$  a  $a_v = 0,931$ . V kontrolnom mliečnom médiu ( $a_v = 0,994$ ) bola maximálna tvorba proteínáz medzi 23. a 29. hodinou charakterizovaná aktivitou  $18,4 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ . V médiách s klesajúcimi hodnotami  $a_v$  boli aktivity proteínáz v rovnakom čase nižšie a síce  $17,8 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $14,1 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $9,4 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$  a  $6,8 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



Obr. 3. Aktivita proteínáz *Brevibacterium linens* (LAKTOFLORA 200) v mliečnom bujone pri  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  v závislosti od aktivity vody upravenej NaCl.

Fig. 3. The activity of *Brevibacterium linens* (LAKTOFLORA 200) proteinases in lactic medium at temperature of  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  in dependence of water activity treated with NaCl.

Z výsledkov stanovenia tvorby proteínáz v médiách počas kultivácie *B. linens* je pri jednotlivých hodnotách  $a_v$  vidieť, že pri náraste biomasy sa zvyšovala tvorba proteínáz a jej maximum sa dosiahlo ku koncu logaritmickej fázy, resp. na začiatku stacionárnej fázy. Medzi rastovými čiarami pri  $a_v = 0,994$

a  $a_v = 0,983$  nebol významný rozdiel. V týchto prípadoch sme nepozorovali ani významný rozdiel pri tvorbe proteináz s hodnotami  $18,4 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$  a  $17,8 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Zníženie hodnoty  $a_v$  v médiu na  $0,971$  spôsobilo pri raste *B. linens* zníženie jeho denzity oproti pôvodnému médiu asi o 1 log-poriadok a príslušná aktivita proteináz v médiu sa taktiež znížila na  $14,1 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ , čo bola hodnota oproti kontrole o 23,3 % nižšia.

*B. linens* produkuje rôzne typy proteolytických enzýmov. Sørhaug [24] udáva 14 intracelulárnych peptidových hydroláz, Foissy [3, 4] uvádza 6 extracelulárnych proteináz. V práci prezentované výsledky zodpovedajú vzájomnému pôsobeniu predovšetkým extracelulárnych proteináz kultúry *B. linens* LF 200. Hayashi a kol. [25] sledovali aktivitu proteináz a aminopeptidáz *B. linens*. Obidve enzýmové aktivity boli vyššie v extracelulárnych ako v intracelulárnych izolátoch. Rovnako, ako v našej práci, zistili pri kultivácii *B. linens* pozitívnu koreláciu medzi proteinázovou aktivitou a počtom buniek v médiu. Pozitívnu koreláciu nespozorovali pri aminopeptidázach. Prítomnosť NaCl v médiu podľa jej koncentrácie inhibovala produkciu aminopeptidáz, ale nie proteináz. Na rozdiel od nás, Hayashi a kol. [25] robili pokusy na proteinázach po ich izolácii z média. Po maximálnej tvorbe proteináz medzi 23. a 29. hodinou sme pri ďalšej kultivácii zistili jej prudký pokles. Naproti tomu Hayashi a kol. [25] dokladajú prakticky nezmenenú aktivitu v médiu medzi 40. až 90. hodinou, ako pri proteinázach izolovaných z média. Je pravdepodobné, že izoláciou z kultivačného média sa odstránili niektoré peptidy a aminokyseliny, ktoré podľa pozorovania Foissyho [5] majú na tieto enzýmy inhibičný účinok. V našom prípade boli však pri stanovení aktivity proteináz v médiu prítomné.

## Literatúra

1. SNEATH, P. A.—MAIR, H. S.—SHARPE, E. N.—HOTT, J. G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Baltimore, London, Williams and Wilkins 1986.
2. BOYAVAL, P.—DESMAZEAUD, M. J., Le Lait, 63, 1983, s. 187.
3. FOISSY, H., J. Gen. Microbiol., 80, 1974, s. 197.
4. FOISSY, H., Int. Milchwiss. Kongr. (New Delhi), Vol. I, 1974, s. 366.
5. FOISSY, H., Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 166, 1978, s. 164.
6. FOISSY, H., FEMS Microbiol. Lett., 3, 1978, s. 207.
7. FOISSY, H., Milchwissenschaft, 33, 1978, s. 221.
8. FOISSY, H.: 20th Int. Dairy Congr. (Paris), E, 1978, s. 479.
9. TORGENSEN, H.—SØRHAUG, T., FEMS Microbiol. Lett., 4, 1978, s. 151.
10. FAMELART, M. H.—KOBILINSKI, B.—BOUILLANNE, Ch.—DESMAZEAUT, M. J., Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 1987, s. 442.
11. PALO, V.—ANDERLE, J., Dairy Sci., Abstr. 25, 1961, s. 190.
12. PALO, V.—BAČÍKOVÁ, D.: 16th Int. Dairy Congr., B, 1962, s. 497.
13. JUHÁSZ, O.—KNOŠKOVÁ, D.—ZAMANOVIČ, J.—ŠKÁRKA, B., Collect. Czech. Chem. Commun., 55, 1990, s. 841.

14. ZEMANOVIČ, J.—ŠKÁRKA, B.: 5th European Congress on Biotechnology (Copenhagen), 1990, s. 473.
15. BEUCHAT, L., Water Activity: Theory and Applications to Food. New York, Basel, Marcel Dekker Inc. 1987.
16. TEPLÝ, M. a kol.: Čisté mlékařské kultury. Praha, SNTL 1984.
17. GÖRNER, F.—ILAVSKÁ, E.—VOLLEK, V.—JANČEKOVÁ, J., Mikrobiológia mlieka a tukov. Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT 1983.
18. CHEN, C. S., Lebensm.-Wiss. Technol., 21, 1988, s. 256.
19. CHIRIFE, J.—RESNIK, S. L., J. Food Sci., 49, 1984, s. 1486.
20. DAVÍDEK, J.: Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1977.
21. WODZINSKI, R. J.—FRAZIER, W. C., J. Bact., 81, 1961, s. 359.
22. STREIT, K.—RÜEGG, M.—BLANC, B., Milchwissenschaft, 34, 1979, s. 459.
23. CALHOUN, C. L.—FRAZIER, W. C., Appl. Microbiol., 14, 1966, s. 416.
24. SØRHAUG, T., Milchwissenschaft, 36, 1981, s. 137.
25. HAYASHI, K.—CLIFFE, A. J.—LAW, B. A., Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37, 1990, s. 737.

Do redakcie došlo 14. 9. 92

## Influence of water activity on growth and production of *Brevibacterium linens* proteinases

### Summary

Observing of the growth and production of proteinases in *Brevibacterium linens* was studied at various water activity ( $a_w$ ) obtained with an addition of NaCl or glucose. In a medium with falling value  $a_w$  the growth was not influenced up to the value 0.971. The growth inhibition was evident at  $a_w = 0.945$ . The proteinases production fell down at  $a_w = 0.971$  by 23%. When the water activity was influenced with glucose, the growth reduction was found at the value 0.980 and the considerable inhibition at  $a_w = 0.961$ .

## Влияние активности воды на рост и продукцию протеиназ *Brevibacterium linens*

### Резюме

Рост и продукция протеиназ *Brevibacterium linens* исследовались при разных величинах активности воды ( $a_w$ ), которая обрабатывалась добавкой NaCl или глюкозы. Среда с падающей величиной  $a_w$  обработанной NaCl не оказала значительное влияние на рост до величины 0.971. Ингибирование роста проявилось при  $a_w = 0.945$ . Продукция протеиназ понизилась при  $a_w = 0.971$  на 23 %. При обработке активности воды глюкозой замедление роста было обнаружено при величине 0.980 значительное ингибирование при  $a_w = 0.961$ .