



Subtilizyna osadzona na włóknach triacetylocelulozowych – właściwości i zastosowanie

Tadeusz Trzmiel, Mirosława Szczęśna-Antczak, Małgorzata Rzyska
Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Subtilisin embedded in TAC fibre – properties and application

Summary

The embodiment of subtilisin from *Bacillus subtilis* IBTC-3 in triacetylcellulose (TAC) fibre was studied. The fibre preparation of proteolytic activity 51.3 AmU/g was obtained with 16.6% of yield. The properties of subtilisin embedded in TAC fibre were investigated. The preparation showed optimal proteolytic activity at pH 9 and temperature 65-70°C. It was stable in a wider range of pH and temperature than the native subtilisin. The K_M value for haemoglobin was $2.6 \cdot 10^{-3}$ M. The TAC-fibre biocatalyst, in the fixed bed column, was successfully applied for hydrolysis of casein.

Key words:

subtilisin, fibre of TAC with subtilisin.

1. Wstęp

Bakterie *Bacillus subtilis* IBTC-3 wytwarzają kilka enzymów pokazomórkowych, spośród których największe znaczenie przemysłowe posiada subtilizyna, powszechnie stosowana m.in. w enzymatycznych proszkach piorących. Na bazie wglębnej hodowli tych bakterii opracowano w Instytucie Biochemii Technicznej i sprawdzono w Tarchomińskich Zakładach Farmaceutycznych „POLFA” w skali pilotowej (fermentory o objętości 6 m³) technologię wytwarzania preparatów subtilizyny przeznaczonych głównie do stosowania w detergentach (1).

Adres do korespondencji

Tadeusz Trzmiel,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź.

biotechnologia

Technologia produkcji preparatów subtilizyny dzieli się na dwa główne etapy: proces biosyntezy enzymu i proces jego wyodrębniania z podłoża pohodowlanego. W drugim etapie, po zakończeniu fermentacji, podłoże schładza się do 15°C, odziera się od niego biomasę i części stałe przez wirowanie, następnie przeprowadza filtrację klarującą i uzyskany filtrat, zawierający subtilizynę, poddaje się zateżaniu przez ultrafiltrację. Z uzyskanego koncentratu wyodrębnia się enzym w stanie stałym. Do otrzymywania stałych preparatów subtilizyny typu Protogal S, przeznaczonych do detergentów, przystosowano kilka ogólnie znanych metod: wysalanie białek solami nieorganicznymi, wytrącanie rozpuszczalnikami organicznymi oraz metodę suszenia rozpyłowego. Wydajność tych procesów w przeliczeniu na ilość wydzielonego białka subtilizyny jest podobna i zawiera się w przedziale 85-88% (2).

W skali pilotowej (3) potwierdzono, że roztwory subtilizyny można z powodzeniem zateżać przez ultrafiltrację, eliminując z nich jednocześnie substancje balastowe o ciężarach cząsteczkowych poniżej 10 kDa. Metodą tą uzyskuje się przeszło 10-krotnie zateżone filtry subtilizyny o znacznym stopniu podczyszczenia enzymu, z wydajnością sięgającą 73%. Skłoniło to autorów do podjęcia próby otrzymania stałych, nierozpuszczalnych w wodzie preparatów subtilizyny z myślą o ich wykorzystaniu w procesach ciągłych.

Przedstawiamy wyniki badań uzyskane w trakcie otrzymywania subtilizyny osadzonej we włóknach triacetylocelulozowych (TAC) oraz właściwości uzyskanych preparatów. Włókna wytwarzane były metodą „na mokro”, polegającą na koagulacji polimeru w środowisku rozpuszczalników organicznych.

Nośniki formowane z triacetylocelulozy stosowane były wcześniej do immobilizacji heksokinazy (4,5), ureazy (6,7), acylazy penicylinowej (6,8) i glukoizomerazy (9), a także bakterii różnych rodzajów, m.in. *Bacillus subtilis* IBTC-3 (10,11). Natura oddziaływań włókno TAC – enzym (lub komórka) nie jest dotąd dostatecznie wyjaśniona. Włączenie enzymu w strukturę polimeru następuje podczas jej tworzenia się w procesie formowania włókien (12,13). Enzym zostaje niejako „uwięziony” w porach tworzywa i, jak niektórzy uważają (12-14), otoczony bardzo cienką warstewką polimeru stanowiącą ścianki porów. Warstewka ta nie przepuszcza cząstek enzymu, ale umożliwia dyfuzję substratu i produktu reakcji enzymatycznej.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał badawczy

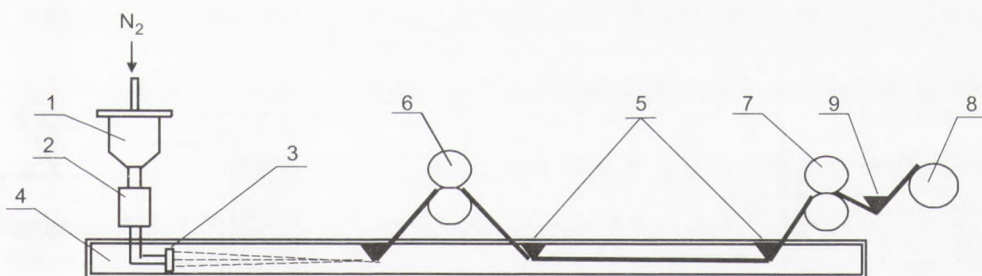
Podłoże pohodowlane bakterii *B. subtilis* IBTC-3 z fermentora o objętości 1 m³ (o zawartości białka około 17 mg · cm⁻³ i aktywności subtilizyny 20,7 mili jednostek Ansona (mJA) w 1 cm³) schłodzono do 15°C i poddano chemicznej koagulacji osadów dodatkiem 1% CaCl₂ · 6H₂O i 0,6% KH₂PO₄. Następnie, po skorygowaniu pH do

wartości 8,3 i 30-minutowym odstaniu, wirowano w wirówce Z101H firmy Ceba (RFN) przy 14 000 rpm. Supernatant filtrowano na ramowej prasie filtracyjnej (20cm × 20cm × 8 ram), używając płyt filtracyjnych Fibra Fix AF-50. Uzyskany filtrat zatężano przez ultrafiltrację w aparacie BUF (*Buttery Ultrafiltration Unit*) firmy Patterson Candy International na membranach T2/A (*cut off* 1000) o powierzchni 0,42 m². Wydajność końcowa subtilizyny po 9,8-krotnym zatężeniu filtratu wynosiła 73%. Otrzymany koncentrat białek o aktywności subtilizyny 121,6 mJ_A · cm⁻³ i zawartości białka 65,4 mg · cm⁻³ zastosowano do osadzania enzymu we włóknach TAC.

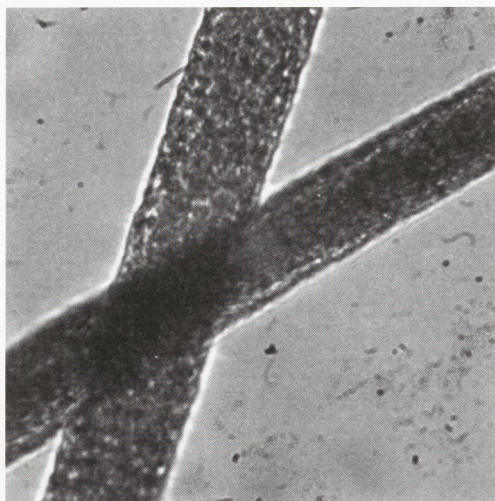
2.2. Osadzanie subtilizyny we włóknach TAC

Do 15 cm³ koncentratu subtilizyny dodawano 5 g triacetylocelulozy (TAC) rozpuszczonej w 53 cm³ chlorku metylenu oraz 2,25 cm³ gliceryny. Mieszaninę homogenizowano 30 minut przy 4000 obrotów mieszadła na minutę i z otrzymanej emulsji, w Instytucie Włókien Sztucznych na Politechnice Łódzkiej, formowano włókna metodą „na mokro” (rys. 1).

Kąpiel koagulacyjna zawierała toluen i chlorek metylenu w stosunku objętościowym 4:1 o temperaturze 0°C. Dysza przędzalnicza posiadała 500 otworów o $\varnothing = 0,08$ mm. Szybkość formowania włókien wynosiła 8 m min⁻¹, a długość drogi włókna w kąpeli 1,2 m. Otrzymany preparat subtilizyny w formie włókna przemywano 0,1% roztworem octanu wapnia i suszono w temperaturze pokojowej. Gotowe włókna z subtilizyną nazwano Protogałem W (rys. 2).



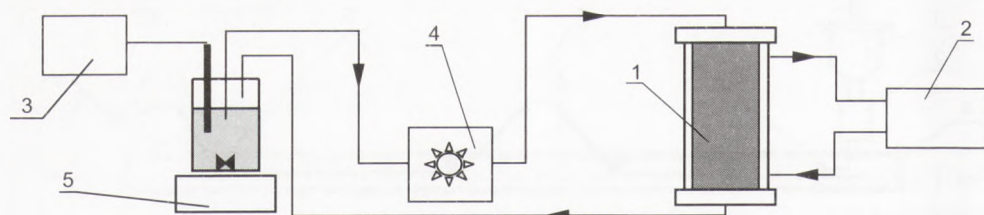
Rys. 1. Schemat urządzenia do formowania włókien z roztworu metodą „na mokro”: 1) zbiornik, 2) układ filtrujący, 3) filiera, 4) wanna koagulacyjna, 5) prowadniki włókna, 6) wałki podające, 7) wałki odbierające, 8) urządzenie odbierające, 9) wózek poziomy.



Rys. 2. Obraz mikroskopowy włókna triacetatocelulozowego (TAC) z osadzoną subtilizyną.

2.3. Hydroliza kazeiny w kolumnie wypełnionej preparatem Protogal W

Termostatowaną szklaną kolumnę chromatograficzną Lösungsmittelfest Ausführung L15/300 (DDR) upakowano 5 g preparatu Protogal W. Przez kolumnę przepuszczano w obiegu zamkniętym (rys. 3), przy użyciu pompki perystaltycznej, 100 cm³ roztworu kazeiny (o określonym stężeniu wyjściowym i temperaturze 40°C) z szybkością 20 cm³ · min⁻¹. Roztwór kazeiny mieszano na mieszadle magnetycznym, a jego pH w sposób ciągły regulowano 0,05 M NaOH do wartości 8,0. W ustalonych odstępach czasu pobierano próbki (o obj. 1 cm³) w celu oceny stopienia hydrolizy kazeiny oraz czystości mikrobiologicznej hydrolizatu. Proces kończono, gdy w dwóch kolejnych próbach nie stwierdzano dalszego postępu reakcji. Roztwory kazeiny (*Soluble Casein* – Sigma) sporządzano, rozpuszczając na gorąco odpowiednią jej naważkę w 50 cm³ 0,05 M NaOH, a następnie dodając 350 cm³ 0,1% octanu wapnia i doprowadzając pH do żądanej wartości.



Rys. 3. Układ do badania dynamiki hydrolizy kazeiny przez Protogal W: 1) kolumna wypełniona Protogalem W, 2) termostat, 3) pH-metr, 4) pompka perystaltyczna, 5) mieszadło magnetyczne.

2.4. Aktywność proteolityczna

Aktywność proteinaz oznaczano metodą Ansona (15), stosując jako substrat wolną hemoglobinę zdenaturowaną mocznikiem. Za jednostkę ich aktywności [jA] przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach standardowych testu (6 cm³ mieszaniny reakcyjnej, 100 mg hemoglobiny, 25°C) hydrolizuje zdenaturowaną hemoglobinę z taką szybkością początkową, że ilość rozpuszczalnych w 5% kwasie trichlorooctowym produktów hydrolizy powstających w czasie jednej minuty, daje po reakcji z odczynnikiem Folina absorbancję przy 690 nm odpowiadającą 1 mmol tyrozyny.

Aktywność subtilizyny i metaloproteinazy w ich mieszaninie określano metodą opracowaną w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ (16). W metodzie wykorzystano fakt, że metaloproteinaza *B. subtilis* IBTC-3 wykazuje optimum działania wobec hemoglobiny w pH 7,3, zachowując w pH 10,2 około 3% maksymalnej aktywności, natomiast subtilizyna wykazuje optimum działania w pH 10,2 z zachowaniem 76% aktywności w pH 7,3.

2.5. Aktywność esterazowa

Aktywność subtilizyny w reakcji hydrolizy estru etylowego N-benzoilo-L-argininy (BAEE) oznaczano spektrofotometrycznie przy 254 nm (17). Hydrolizę estru prowadzono w 50 mM buforze Tris-HCl o pH = 8,0, a mieszanina reakcyjna w objętości 3,2 cm³ zawierała odpowiednią ilość roztworu enzymu i substrat o stężeniu 0,5 mM. Początkowe szybkości reakcji mierzono w temperaturze pokojowej, rejestrując co 30 s lub co min przyrosty absorbancji prób właściwych wobec kontrolnych. Aktywność wyrażano w jednostkach esterazowych [jE], określających ilość mikromoli rozłożonego w ciągu minuty substratu, w przeliczeniu na benzoilo-L-argininę.

2.5. Oznaczanie białka

Białko w roztworach subtilizyny oznaczano metodą wg Lowry (18).

2.6. Optymalne pH działania

Optymalne pH działania preparatów subtilizyny wyznaczano, prowadząc reakcję hydrolizy hemoglobiny w środowisku o różnym pH (korygowanym 0,5 M NaOH lub 0,5 M HCl), według metody Ansona (15).

2.7. Optymalna temperatura działania

Optymalną temperaturę wyznaczano w 10-minutowej reakcji hydrolizy hemoglobiny w pH optymalnym dla działania preparatów w przedziale temperatur 25-80°C, stosując metodę Ansona (15).

2.8. Wpływ pH na stabilność

Wpływ pH na stabilność preparatów subtilizyny określano, preinkubując 10 mg naważki preparatów Protogal I oraz W lub 1 mg preparatu Protogal S w 5 cm³ 10 mM buforu uniwersalnego Brittona i Robinsona o pH zawartym w przedziale 5,5-12, przez 30 minut w 45°C. Pozostałą po preinkubacji aktywność proteolityczną oznaczano metodą Ansona.

2.9. Wpływ temperatury na stabilność

Termostabilność preparatów subtilizyny określano postępując podobnie jak przy badaniu wpływu pH na stabilność. Preinkubację próbek enzymu prowadzono w buforze uniwersalnym o pH = 9,0 w temperaturach z przedziału 20-70°C w czasie do 60 minut. Pozostałą po preinkubacji aktywność proteolityczną oznaczano metodą Ansona wobec hemoglobiny o pH = 10,2.

2.10. Stała Michaelisa

Przy wyznaczaniu stałej Michaelisa badanych preparatów stosowano roztwory hemoglobiny o pH = 10,2 i stężeniach: 0,1, 0,25, 0,5 i 2%, wobec których kolejno oznaczano aktywność subtilizyny po 2, 5, 10 minutach reakcji. Z wykresów zależności aktywności subtilizyny od czasu trwania reakcji wyznaczano szybkości początkowe reakcji (v_0) dla poszczególnych stężeń hemoglobiny. Wartości K_m i V_{max} wyznaczano z zależności Lineweavera-Burka.

2.11. Określanie przebiegu hydrolizy kazeiny

W celu śledzenia postępu hydrolizy kazeiny przez immobilizowaną subtilizynę opracowano sposób oparty na metodzie Ansona. Z roztworu kazeiny poddawanej hydrolizie na kolumnie wypełnionej Protogalem W, w ustalonych odstępach czasu (10, 30, lub 60 minut) pobierano 1 cm³ próby, do których dodawano 2 cm³ 5% kwasu trójchlorooctowego. Po 30 minutach mieszaninę sączono, pobierano 0,5 cm³ prze-

sączy, dodawano 1 cm³ 0,6 M NaOH oraz 0,3 cm³ rozcieńczonego (1:1) odczynnika Folina. Roztwór energicznie wstrząsano i po 10 minutach mierzono absorbcję przy 690 nm wobec wody destylowanej. Miara postępu reakcji była różnica absorbcji [ΔE] próby pobranej w danym momencie reakcji i próby pobranej z roztworu kazeiny na początku eksperymentu.

2.12. Oznaczanie stopnia degradacji kazeiny

W celu oszacowania stopnia degradacji kazeiny przez osadzoną we włóknach TAC subtilizynę zastosowano FPLC. Na kolumnę ze złożem Superoza 12 (frakcjonowanie białek w zakresie 1-30 kDa) wprowadzono 0,2 cm³ próbki kazeiny poddawanej hydrolizie, a do wymycia frakcji stosowano bufor fosforanowy o pH 6,3 zawierający 0,1 M NaCl.

3. Wyniki i ich dyskusja

Postępując zgodnie z podaną metodyką, przeprowadzono eksperymenty nad formowaniem włókna TAC z osadzoną w nim subtilizyną. Do immobilizacji zastosowano koncentrat subtilizyny zatężony 9,8-krotnie na drodze ultrafiltracji. Uzyskane, surowe włókna przemywano i suszono otrzymując Protogal W. Wyniki eksperymentu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Osadzanie subtilizyny na włóknach triacetylocelulozowych

Preparat proteiny	Objętość* [cm ³] lub masa** [g]	Aktywność subtilizyny			
		proteolityczna		esterolityczna	
		[mjA · cm ⁻³] lub [mjA · g ⁻¹]	wydajność [%]	[jE · cm ⁻³] lub [jE · g ⁻¹]	wydajność [%]
koncentrat enzymu	30*	121,6	100	1,46	100
surowe włókno z enzymem	11,8**	126,2	40,8	2,89	78
włókno po przemyciu (Protogal W)	11,8**	51,3	16,6	1,99	53
filtrat po przemyciu włókna	30*	29,5	24,2	0,35	24

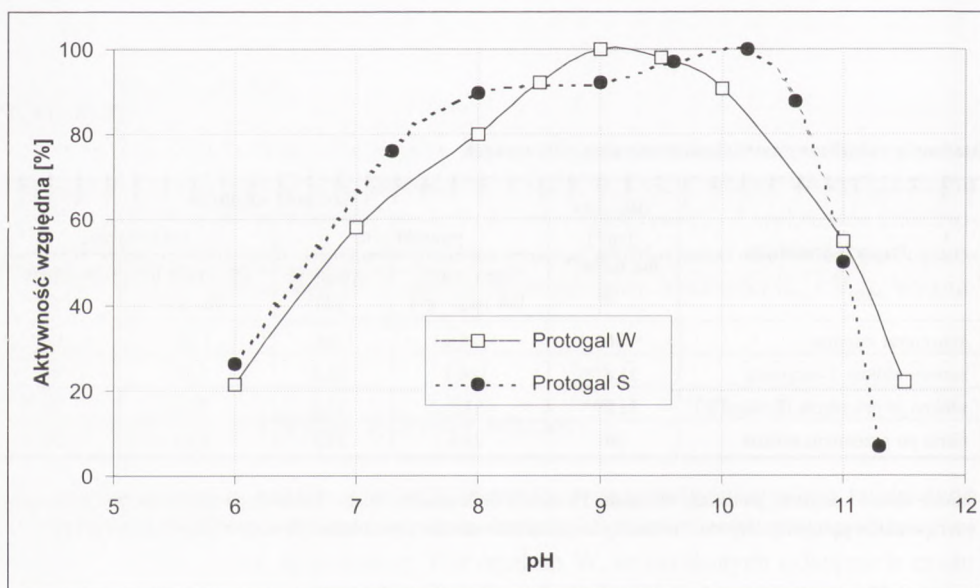
Surowe włókno z osadzoną proteinazą wstrząsano 15 minut z 0,1% octanem wapnia (30 cm³), po czym odsączano je i suszono w temperaturze pokojowej. Aktywność proteolityczną oznaczano stosując jako substrat 2% roztwór hemoglobiny o pH 10,2.

Protogal W wykazuje aktywność subtilizyny w reakcji hydrolizy hemoglobiny, w pH 10,2, sięgającą $51,3 \text{ mJA} \cdot \text{g}^{-1}$, a $64,1 \text{ mJA} \cdot \text{g}^{-1}$ – w pH 9. Efektywność procesu immobilizacji liczona względem aktywności subtilizyny wynosi 16,6%. W filtracie po przemyciu surowego włókna odzyskuje się 24% subtilizyny. Roztwór ten, poddany dializie wobec 0,1% octanu wapnia, wykazywał aktywność $29,5 \text{ mJA} \cdot \text{cm}^{-3}$ i z powodzeniem wykorzystywano go do otrzymywania preparatów subtilizyny immobilizowanej na szkłe porowatym (dane nie publikowane). Włókna formowane z TAC są nierozpuszczalne w wodzie, a trwałości wiązania enzymu dowodzi możliwość wielokrotnego ich stosowania do hydrolizy białek (eksperymenty opisane w dalszej części artykułu).

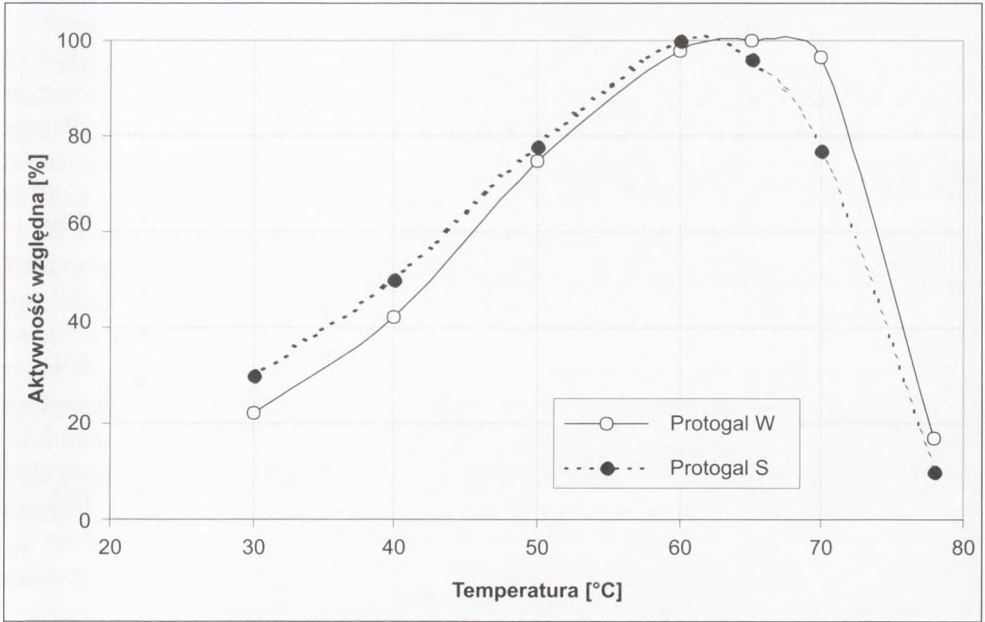
Na rysunkach 4-7 przedstawiono w formie wykresów charakterystyczne cechy preparatu Protogal W, w porównaniu z enzymem natywnym (stały preparat subtilizyny Protogal S).

Zwraca uwagę obniżone do 9,0 optymalne pH działania tego preparatu i rozszerzony w górę zakres optymalnej temperatury w stosunku do enzymu rozpuszczalnego.

Preparat Protogal W jest stabilny jeszcze w 60°C . Po 30 minutach inkubacji w tej temperaturze zachowuje około 60% swojej wyjściowej aktywności proteolitycznej. Na uwagę zasługuje fakt, że 10-minutowe ogrzewanie preparatu w 70°C powoduje obniżenie jego aktywności tylko o 20%, podczas gdy preparat rozpuszczalny (Protogal S) w tych warunkach traci ponad 60% aktywności.

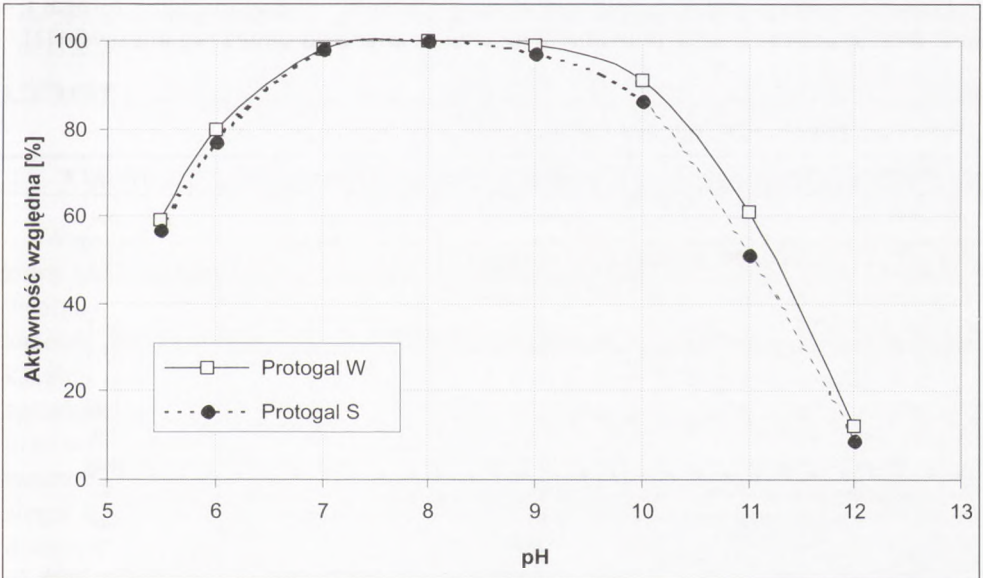


Rys. 4. Wpływ pH na aktywność proteolityczną Protogalu W.

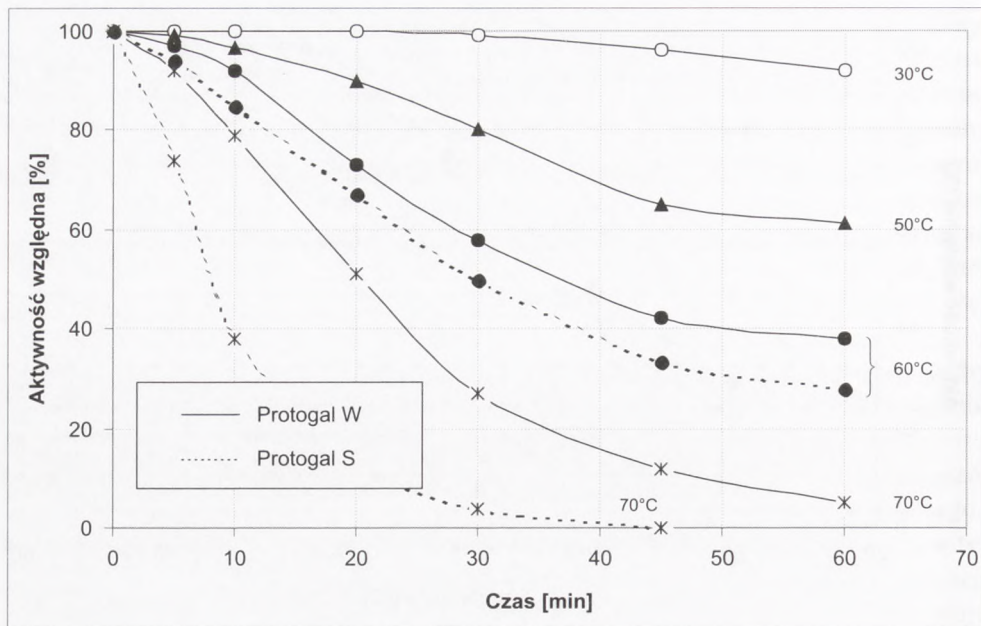


Protogal W

Rys. 5. Wpływ temperatury na aktywność proteolityczną Protogalu W.



Rys. 6. Wpływ pH na stabilność Protogalu W.



Rys. 7. Termostabilność Protogalu W.

W tabeli 2 przedstawiono właściwości preparatu Protogal W oraz, dla porównania, rozpuszczalnego preparatu tego enzymu (Protogal S) otrzymywanego na bazie technologii opracowanej w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ i preparatu typu Protogal I – immobilizowanego na szkle porowatym (przeznaczonego do syntez organicznych) (1).

Tabela 2

Właściwości preparatów subtilizyny typu Protogal

Charakterystyczne właściwości	Protogal S	Protogal I	Protogal W
optymalne pH działania	10,2	10,7	9,0
optymalna temperatura [°C]	60	60-65	65-70
aktywność:			
– proteolityczna [$\text{mJA} \cdot \text{g}^{-1}$]			
w pH optymalnym	600	77,7	64,1
ogólna (w pH = 7,3)	522	41,9	35,3
w tym subtilizyna (z EDTA)*	456	41,9	34,4
– esterazowa [$\text{JE} \cdot \text{g}^{-1}$]	7,39	2,41	1,99
– α -amylaza [$\text{JFS} \cdot \text{g}^{-1}$]	2926	ślady	106
– lipolityczna [$\text{JL} \cdot \text{g}^{-1}$]	102	0	ślady
zawartość białka [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]	283	–	–
K_m (wobec hemoglobiny) [M]* 10^{-3}	1,85	9,25	2,60
okres półtrwania [tygodnie]	–	29	72
możliwość zastosowania	dodatek do detergentów	synteza estrów	hydroliza białek

* aktywność proteolityczna preparatów oznaczana w obecności 10^{-3} M EDTA, pH 7,3

Przeprowadzono wstępne badania nad wykorzystaniem Protogalu W w procesie hydrolizy białek. Włóknista forma tego preparatu jest dogodna do użycia go jako wypełnienia reaktora kolumnowego. Przygotowano termostatowaną kolumnę wypełnioną 5 g preparatu Protogal W o aktywności proteolitycznej $64,1 \text{ mJA} \cdot \text{g}^{-1}$ (oznaczanej w reakcji hydrolizy hemoglobiny, w pH 9) i badano proces hydrolizy 0,25% roztworu kazeiny w obiegu zamkniętym.

W wykonanych doświadczeniach wykazano, że kazeina jest degradowana na tej kolumnie z dużą szybkością. Już po 22 minutach osiągnano ustalony na stałym poziomie stopień jej hydrolizy wynoszący w przyjętych jednostkach $\Delta E = 0,60$. Celem oszacowania stopnia degradacji i identyfikacji produktów rozkładu kazeiny roztwory wyjściowy i po hydrolizie poddano analizie z wykorzystaniem FPLC. Enzymatyczny hydrolizat kazeiny zawierał peptydy o masach cząsteczkowych mniejszych od 11,3 kDa, wśród których frakcja peptydów o M_r zawartej pomiędzy 8,5 a 11,3 kDa była niewielka w porównaniu z pozostałymi. W hydrolizacie stwierdzono obecność licznych peptydów o $M_r < 1 \text{ kDa}$.

Na kolumnie tej zbadano także hydrolizę 0,25% roztworu kazeiny w układzie otwartym (wyciek z kolumny). Wyniki zamieszczono w tabeli 3.

Tabela 3

Hydroliza kazeiny na kolumnie wypełnionej Protogalem W w układzie otwartym i zamkniętym

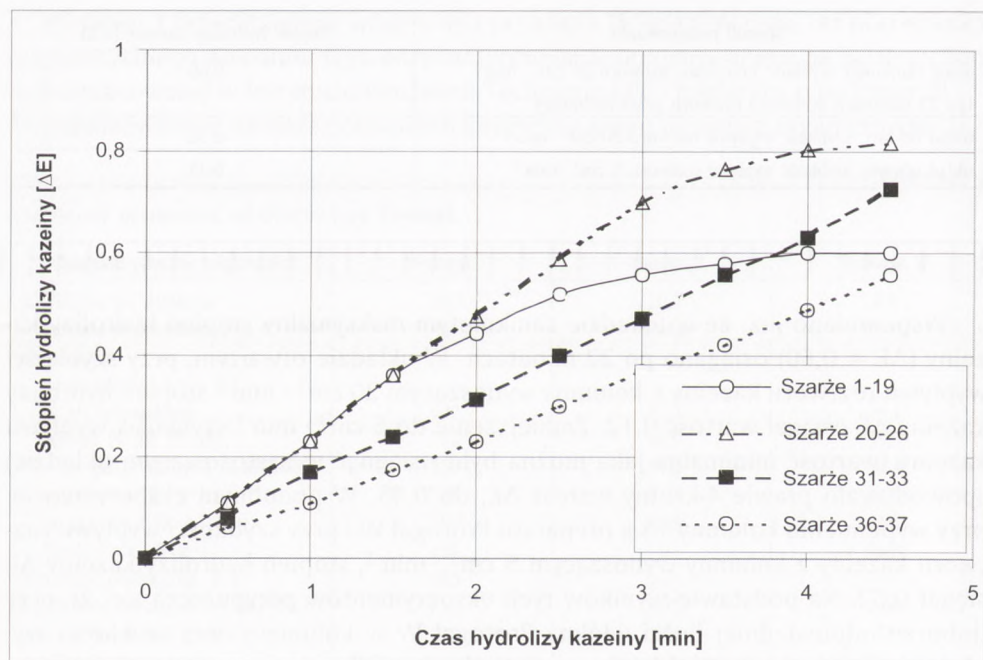
Sposób postępowania	Stopień hydrolizy kazeiny [ΔE]
obieg zamknięty, szybkość przepływu roztworu $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ (po 22 minutach cyrkulacji roztworu przez kolumnę)	0,60
układ otwarty, szybkość wypływu roztworu $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$	0,12
układ otwarty, szybkość wypływu roztworu $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$	0,45

Wspomniano już, że w układzie zamkniętym maksymalny stopień hydrolizy kazeiny ($\Delta E = 0,60$) osiągnano po 22 minutach. W układzie otwartym, przy szybkości wypływu roztworu kazeiny z kolumny wynoszącym $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ stopień hydrolizy kazeiny ΔE osiągał wartość 0,12. Zmniejszenie do $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ szybkości wypływu kazeiny (wartość minimalna jaką można było osiągnąć w zastosowanym układzie) spowodowało prawie 4-krotny wzrost ΔE , do 0,45. W podobnym eksperymencie, przy wypełnieniu kolumny 15 g preparatu Protogal W i przy szybkości wypływu roztworu kazeiny z kolumny wynoszącym $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, stopień hydrolizy kazeiny ΔE sięgał 0,52. Na podstawie wyników tych eksperymentów przypuszcza się, że przy doborze odpowiedniej ilości włókna Protogal W w kolumnie oraz szybkości wypływu roztworu białka poddawanego hydrolizie możliwe jest prowadzenie procesu w układzie otwartym, co może być przydatne w procesach ciągłych.

W celu wyznaczenia stabilności operacyjnej preparatu Protogal W śledzono dynamikę hydrolizy kazeiny w układzie zamkniętym, w kolumnie zawierającej 5 g włókna TAC o aktywności proteolitycznej (oznaczonej w reakcji hydrolizy hemoglobiny, w pH 9) sięgającej zaledwie $4,5 \text{ mJA} \cdot \text{cm}^{-3}$, co znacznie ułatwiało obserwację zmian podczas kolejnych cykli pracy kolumny.

Wyniki badań nad hydrolizą kazeiny na tej kolumnie przedstawiono na rysunku 8.

Wykonując po kilka szarż badano m.in. rozkład kazeiny w 0,25% roztworze (szarże 1-19) oraz w 0,5% roztworze (szarże 20-26). W mikroskopowych obserwacjach hydrolizatów kazeiny otrzymanych po szarżach 22-26 wykazano, że obecne są w nich nieliczne spory i komórki bakterii przypominające *B. subtilis* IBTC-3, które były prawdopodobnie wprowadzone podczas immobilizacji surowego preparatu proteiny we włóknach. Ich obecność nie wpływała jednak na obniżenie aktywności włókien. Mimo to, w celu zahamowania ich rozwoju, w szarżach 27 i 30 do sterylnego roztworu kazeiny podawanego na kolumnę dodano po 10 mg chloramfenikolu. Po tych zabiegach w hydrolizatach kazeiny uzyskanych po 31 i 32 szarży nie stwierdzono obecności drobnoustrojów, jednakże włókna w kolumnie utraciły część swojej aktywności proteolitycznej (szarże 31-33 – rys. 8). W roztworze hydrolizatu kazeiny otrzymanym po szarży 33 (bez chloramfenikolu) ponownie stwierdzono obecność bakterii. W dwóch kolejnych szarżach do roztworu hydrolizowanej kazeiny dodawa-



Rys. 8. Dynamika hydrolizy kazeiny na kolumnie upakowanej preparatem Protogal W.

no azydek sodowy (10 mM). Po tym zabiegu w otrzymanych hydrolizatach kazeiny nie wykryto obecności drobnoustrojów, jednakże włókna utraciły kolejną część aktywności proteolitycznej (szarże 36-37), a bakterie pojawiły się ponownie po szarży 38. Niemniej jednak po 98 dobach od momentu uruchomienia i 135,5 godzinach pracy kolumna upakowana Protogalem W nadal wykazywała zdolność do hydrolizy kazeiny.

4. Podsumowanie

Opracowano sposób otrzymywania subtilizyny z *B. subtilis* IBTC-3 w formie osadzonej we włóknach triacetylocelulozowych (preparat o nazwie Protogal W), który opatentowano w Urzędzie Patentowym RP za nr 167 316 (19). Opracowany sposób pozwala otrzymywać preparaty enzymu o aktywności proteolitycznej w reakcji hydrolizy hemoglobiny, w pH 9, sięgającej 64,1 mJA · g⁻¹.

Stosując preparaty typu Protogal W jako wypełnienie kolumn efektywnie prowadzi się hydrolizę kazeiny. W układzie tym podczas długotrwałej eksploatacji złoża, pojawiają się komórki bakterii. Dodawanie do roztworu kazeiny substancji bakteriostatycznych (chloramfenikolu czy azydku sodowego) hamuje rozwój bakterii, lecz niestety, prowadzi do powolnej inaktywacji włókien z osadzoną subtilizyną. Nie stwierdzono jednak, aby obecność bakterii w środowisku hydrolizy wpływała negatywnie na aktywność proteolityczną Protogalu W wypełniającego kolumnę.

W prezentowanych wynikach badań wskazujemy, że Protogal W, z uwagi na dużą stabilność operacyjną w reaktorze kolumnowym, mógłby znaleźć praktyczne zastosowanie w procesach ciągłej hydrolizy białek. Celowe, jak się wydaje, podjęcie badań nad możliwością wykorzystania kolumny wypełnionej tym preparatem w procesie wstępnego oczyszczania ścieków zawierających balast białkowy.

Literatura

1. Trzmiel T., (1993), *Technologia wytwarzania alkalicznej proteinazy z Bacillus subtilis w skali laboratoryjnej i półtechnicznej*, Zeszyty Naukowe PŁ, 685, Rozprawy Naukowe, 194, Łódź.
2. Trzmiel T., (1999), *Otrzymywanie stałych preparatów subtilizyny*, Zeszyty Naukowe PŁ, Technologia i Chemia Spożywcza, 813, 19-27.
3. Trzmiel T., (1996), *Ultrafiltracja cieczy po hodowli B. subtilis IBTC-3*, Zeszyty Naukowe PŁ, Technologia i Chemia Spożywcza, 750, 59-69.
4. Patent nr 2 225 797 (1972) RFN.
5. Patent nr 24996 A/71 (1973) Włochy.
6. Patent nr 1 932 426 (1970) RFN.
7. Siedow A. A., Wilnik A. D., Rowowin Z. A., Jakowlew W. A., (1974), *Chim. Wołkna*, 3, 54.
8. Patent nr 99 037 (1978) Polska.
9. Patent nr 4 004 980 (1977) USA.
10. Szczęsna M., Galas E., (2000), *Protein hydrolysis by immobilised Bacillus subtilis cells*, in: *Food Biotechnology*, Eds. Tramper J., Bielecki S., Polak J., 17, 177-185, Elsevier.

11. Szczęsna M., (1998), *Immobilizacja bakterii Bacillus subtilis – producentów serynowej proteiny*, praca doktorska, PŁ, Łódź.
12. Marconi W., Gulinelli S., Morisi F., (1974), *Biotechnol. Bioengin.*, 16, 501-511.
13. Dinelli D., Marconi W., Morisi F., (1976), *Methods in Enzymology*, Ed. Mosbach K., 227, Acad.Press, N.Y.
14. Messing E. A., (1981), *Adv. Biochem. Eng.*, 10, 51-57.
15. Anson M. L., (1939), *J. Gen. Physiol.*, 22, 79-83.
16. Trzmiel T., (1983), *Biotechnologia serynowej proteiny Bacillus subtilis*, praca doktorska, PŁ, Łódź.
17. Bergmayer H. U., (1965), *Methods of enzymatic analysis*, 815-818, Verlag Chemie, Acad. Press N.Y., London.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265-269.
19. Galas E., Trzmiel T., Seliga S., Fortak M., Patent nr 167 316 (1995) Polska.