

Baktérium törzsek proteináz termelésének vizsgálata*

B É K É S I M R E

Budapest Főváros Vegyészeti és Élelmiszervizsgáló Intézete

Érkezett: 1969. augusztus 15.

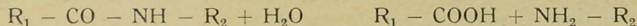
Az utóbbi időben a mikrobiológiai eredetű enzimek igen nagy szerepet kapnak különböző ipari és mezőgazdasági ágakban. Így a baktérium eredetű fehérjebontó enzimek készítmények előállítására is fontos területévé vált az enzimológiával foglalkozó kutatásoknak. Számos *Bacillus subtilis* proteináz kristályosítottak és jellemeztek, de egyéb baktériumok proteináz termelésével is többen foglalkoztak.

A mikrobiológiai eredetű proteinázokkal kapcsolatban igen fontos követelmény az, hogy megfelelő nagy aktivitású enzimeket termelő törzsek álljanak rendelkezésre.

Dolgozatunk célkitűzése ilyen baktériumtörzsek izolálása, valamint az általuk termelt proteinázok jellemzése a gyakorlati felhasználhatóságuk szempontjából.

1. Mikrobiológiai eredetű fehérjebontó enzimek

A fehérjebontó enzimek, más néven proteinázok, a fehérjékben és peptidokban előforduló peptidkötések hidrolízisét katalizálják, az alábbi alapreakció szerint: (1, 2, 3, 4).



Az emésztési, növényi eredetű és védőenzimek mellett a mikrobiológiai eredetű enzimeknek is nagy jelentőségük van.

Számos mikroorganizmus képez kisebb – nagyobb mennyiségben fehérjebontó enzimet. Általában jellemző rájuk, hogy sokféle peptidkötést bontanak. A mikroba eredetű proteolitikus enzimek rendszerint proteinázok és exopeptidázok keverékei, gyakorlatilag azonban a proteináz aktivitás játszik döntő szerepet.

A baktérium eredetű proteinázok közül a *Bacillus subtilis* által termelt enzimeket vizsgálták a legrészletesebben. A *Bacillus subtilis* egyike a leggyakrabban előforduló baktériumfajoknak, elég könnyen izolálható talajból, porból, levegőből, vízfelületről, mezőgazdasági termékekből és hulladékokból, egyes élelmiszerekből a világ majdnem minden részén. Ennek a széles körben elterjedt káros hatást nem okozó, spórás aerob organizmusnak különböző törzsei kevésbé lényeges tulajdonságokban különbözhetnek egymástól, de megfelelnek a *Bergey*-féle baktériumhatározó kézikönyv (5) jellemzésének.

A baktérium egy alkálikus és egy neutrális proteinázt termel.

A *Bacillus subtilis* tenyészet szüredékéből *Güntelberg* és *Ottesen* (6) állított elő először kristályos alkálikus proteinázt acetons frakcionálással és 12%-os Na_2SO_4 oldatból végzett kristályosítással. Az enzimet szubtilizinnek nevezték el. Az enzimek homogénnek mutatkoztak. Kiderítették, hogy az enzim kb. 270–280

* Dolgozat szerzőjének a Budapesti Műszaki Egyetem Mezőgazdasági Kémiai Technológiai Tanszékén készített diplomamunkájából (szerk.).

aminosavat tartalmaz, molekulásúlya 22–27 ezer között van. Leggyakrabban a szerin, glicin, alanin és valin fordul elő benne. Közülük a szerin játszik központi szerepet. Kimutatták, hogy a katalízis folyamán a hidrolizálendő peptidkötés karboxilcsoportja először az enzim aktív centrumában levő szerin hidroxilcsoportjával reagál, és a továbbiakban az így keletkezett észter hidrolizál. A szubtilizin jellegzetes hatása, hogy ovalbuminból 3 peptid lehasításával plakalbumin képez. A különböző törzsekből nyert enzimek pH optimuma 9–11 között, maximális aktivitása 40–50 C° között van. Csak 50–60 C°-ig hőstabilok.

A *Bacillus subtilis* semleges proteinázt (7) Fukutomo és munkatársai állították elő először tiszta állapotban. Kimutatták, hogy nemcsak a pH optimumban (6–7 között) tér el az alkalikus szubtilizinektől, hanem azoknál lényegesen aktívabb kazeinnel szemben, molekula súlya nagyobb (44 700). A tisztított enzim, amely szintén homogénnek bizonyult, molekulánként 1 cink atomot tartalmaz proszotetikus csoportként. Az enzim hasonlóan a lúgos szubtilizinekhez, nem hőstabil, hőmérsékleti optimuma 50 C° körül van.

A *Bacillus subtilis*en kívül még számos más baktérium (mint pl. *Bact. termo-proteoliticus*, *Bac. cereus*, *Bac. mesentericus*, *Actinomycesek*), valamint sok penész és élesztő törzs is termel fehérjebontó enzimet (8).

A baktérium proteinázok alkalmazási területe széles körű. Több élelmiszeripari felhasználásuk van: a sörgyártásban új ceفرzési eljárásoknál; a sütőiparban sós keksz és más pékáru gyártásához (kovász módosításával jobb minőség elérése céljából); több külföldi országban nagy tápértékű fehérjehidrolizátumok előállításához alkalmazzák ezeket a proteinázokat.

A mezőgazdaság is használ különböző baktérium proteinázok segítségével előállított takarmányokat (pl. halkivonatot). A bőrparban szőrtelenítésre és pácolásra, a textil- és bőrparban fehérjét (kazeint, zselatint) tartalmazó bevonatok eltávolítására, a ruhatisztító iparban pedig fehérjefoltok (tej, tojás, vér stb.) egyszerű eltávolítására használják a baktérium proteinázokat. Ezenkívül alkalmazzák még az enzimet a fényképészetben, ahol használt fotópapírok és filmek zselatinrétegének eltávolítása után visszanyerhetővé teszik az ezüstöt.

Gyógyászatban többek között a baktérium proteinázok véralvadék bontó képességét használják ki sebek és égések kezelésénél.

2. Alkalmazott módszerek

Munkánk során részben mikrobiológiai, részben enzimológiai módszerekkel használtunk. A mikrobiológiában alkalmazott izolálási és szelektálási módszerekkel választottuk ki a jó proteináz termelő baktérium törzseket. A törzsek proteináz termelését és a képződött enzimek egyes tulajdonságait proteolitikus aktivitásmérés segítségével állapítottuk meg.

a) A törzsek izolálása

Első lépésként olyan mintákat kellett összegyűjteni, amelyek felületén nagy valószínűséggel fordulnak elő a *Bacillus subtilis* törzs képviselői. Az összegyűjtött 84 minta megoszlása és származási helye a következő:

15 különböző lisztminta a Budapest Fővárosi Vegyészeti és Élelmiszer-vizsgáló Intézetből;

13 burgonya, 10 sárgarépa, 8 fehérrépa, 5 karalábé, 5 zeller, 1 hagyma, valamennyi budapesti KÖZÉRT-ekből és vásárcsarnokokból;

3 zéna, 16 sertésártya és 8 lóártya Pest megyei termelőszövetkezetekből és háztáji gazdaságokból származott.

A baktérium kulturákat kémcsövekben állítottuk elő:

A minták kb. 2–2 grammját 5 ml vízzel felöntöttük és 20 percig 100 C°-os vízben tartottuk. A vattadugóval lezárt, hőkezelt mintákat 37 C°-os termosztátba helyeztük. Négy nap után a mintákat borító víz felületén összefüggő hártya képződött, amelyet a jelenlevő baktérium törzsek képeztek.

Tiszta kulturák előállítására a mikrobiológiában Koch óta ismert, hígítással egybekötött szélesztési eljárás lemezöntéses változatát alkalmaztuk (9), az alábbi táptalaj segítségével:

5 g húskivonat,
5 g pepton
20 g agar-agar és
1 l víz.

A Petri csészében levő lemezekben a baktériumtelepek 37 C°-on 48 óra alatt fejlődtek ki, és a legalkalmasabbnak látszó törzseket oltottuk át azonos összetételű táptalajra.

b) Az izolált törzsek proteináz termelése

Proteináz termeléshez leggyakrabban az alábbi összetételű 7,5 pH értékre beállított táptalaj használtunk:

20 g szójaliszt,
60 g glükóz,
2 g takarmányélesztő,
1 g KH_2PO_4
0,5 g MgSO_4
0,1 g CaCl_2
1 l víz.

Kísérleteink során dolgoztunk még olyan táptalajokkal is, amelyek takarmányélesztőt és sókat a fenti arányban tartalmaztak, de szójaliszt helyett kukoricaliszt és búzakorpa keverékét adagoltuk.

A táptalaj beoltását leggyakrabban közvetlenül végeztük. A ferde agaros kulturák felületéről 1 kacsnyi baktériumtömeget átoltófülkébe vittünk át a tápoídatba. Sterilvizes szuszpenziót csak akkor alkalmaztunk, ha párhuzamosan több beoltást végeztünk ugyanaból a törzsből. Ilyenkor úgy jártunk el, hogy a sterilvíz minden 3 ml-éhez 1–1 kacsnyi baktérium tömeget szuszpendáltunk és homogenizálás után 1–1 ml szuszpenzióval oltottuk be a táptalajt. 100 ml-es Erlenmeyer lombikba 25 ml, 500 ml-es széles szájú lombikba 100 ml táptalajt mértünk ki. Beoltás után a lombikok tartalmát összeráztuk, majd 37 C°-os termosztátba 84 óráig inkubáltuk. Végül szűrővel távolítottuk el a képződött baktériumhárttyát és a szűrletet hűtőszekrényben tároltuk további feldolgozásig.

Submerz tenyésztéshez 750 ml-es lombikot alkalmaztunk, benne 100 ml táptalajjal. A beoltást a felületi tenyésztésnél ismertett módon végeztük. Ezután rázóasztalon 48–66 órán keresztül 28 C°-on inkubáltuk a tenyészetet. A rázatás befejezése után centrifugálással (15 percig 7000 fordulat percenként) távolítottuk el a szuszpendált baktériumsejteket.

c) Proteolitikus aktivitás mérése

A képződött proteinázok proteolitikus aktivitását az Anson–Kunitz-féle módszerrel határoztuk meg (10, 11).

1%-os megfelelő pH-jú kazein oldat 5 ml-ét vízfürdőn beállítottuk a bontási hőfokra, majd hozzáadtunk 1 ml – a várható aktivitástól függően 5–200 szorosára hígított – szűrt enzimdátot. 30 perces inkubálás után a kémcsőhöz 6 ml triklórecetsavat adagoltunk, az oldatot a csapadékról leszűrtük. A szűret 5 ml-éhez 10 ml 0,5 n NaOH-t és 3 ml Folin reagenst (12) adtunk. Az így kapott kékszínű elegy extinkcióját összerázás és 10 perc állás után Pulfich fotométer segítségével mértük meg deszt. vízzel szemben, 660 m μ hullámhosszon. Az extinkció lineáris szakasza 0,8-ig tart, ennél nagyobb extinkció esetén a vizsgálatot nagyobb hígítással megismételtük. Egyidejűleg vakpróbát is készítettünk. A proteolitikus aktivitás egységéül a tirozinra vonatkoztatott módosított Anson – egységet választottuk, amelyet az alábbi képlet segítségével számoltunk ki:

$$E_T = e \cdot H \cdot A \cdot T$$

ahol:

- E_T tirozinegység
 e : a minta és a vakpróba extinkciós értékeinek különbsége
 H : az enzimdát hígítása
 A : a reakcióban résztvevő anyagok összterfogata. Az alkalmazott módszernél 1 ml hígított enzimdátot 5 ml szubsztrát és 6 ml triklórecetsav oldat egészítette ki, így jelen esetben $A = 12$.
 T : az egységnyi extinkció változáshoz tartozó tirozin 10^{-7} mól-jainak száma, mely érték az alkalmazott Folin – oldat minőségétől is függ.
 Tirozin hígítási sorral elvégzett kalibrálással $T = 4,0$ értéket kaptuk.

d) A képződött proteinázok egyes tulajdonságainak vizsgálata

A jó proteolitikus aktivitású törzsek által termelt proteinázok katalitikus hatását különböző pH-jú és hőmérsékletű szubsztrát hidrolízisénel vizsgáltuk. A pH hatás vizsgálatoknál az aktivitás méréshez használt kazein szubsztrát pH-ját 5 és 12 között változtattuk, majd 40 C°-on 30 percig inkubáltuk az enzimszubsztrát oldatot. A fehérjebontás sebesség hőmérséklet függését az enzimek megállapított pH optimumán vizsgáltuk, az inkubációs hőmérsékletet 20–80 C° között változtattuk.

Megállapítottuk továbbá néhány törzs által képzett proteináz hő- és pH-stabilitását. A hőstabilitási vizsgálatokat 55–85 C° között végeztük. A kémcsőben levő enzimdátokat ilyen hőmérsékletű vízben tartottuk 5–120 percig, ezután mértük meg a hőkezelt minták aktivitását. A pH stabilitást puffer oldatok segítségével határoztuk meg: az enzimdátokat négyeszeres mennyiségű, megfelelő (2–12 közötti) pH-értékű puffer oldattal elegyítettük, s a szobahőmérsékleten különböző ideig inkubáltuk. Ezután az illető enzim optimális pH-jának megfelelő puffer oldattal beállítottuk a kívánt hígítást, s ezen a pH-n mértük az aktivitást.

A felületi és szubmerz tenyészetek enzimtermelését azonos mennyiségű táptalajon steril vizes szuszpenzióból egyforma tömegű baktérium sejt beoltással hasonlítottuk össze. A felületi tenyészeteket 84 óráig inkubáltuk 37 C°-on. A szubmerz tenyészeteket 66 óráig ráztuk 28 C°-ú hőmérsékleten.

Mindezen vizsgálatokat szójalisztes táptalajon termelt enzimekkel végeztük. Ezután különböző variációjú kukoricaliszt-korpa-glükóz táptalajok kipróbálásával igyekeztünk választ kapni, milyen összetételű táptalajt lenne célzerű a gyakorlatban használni.

3. Kísérleti eredmények és értékelése

a) A törzsek szelektálása proteináz termelésük alapján

Az izolált törzsek első szelektálását felületi tenyészetben, 100 ml-es lombikban levő 25 ml szójalisztes táptalajon végeztük el. 84 órás, 37 °C-os inkubálás után képződött enzimoldat aktivitását 7-es pH-jú kazein szubsztrát segítségével határoztuk meg. A törzsek 61%-a termelt kisebb – nagyobb mértékben proteinázt, ezen belül 17 törzs 150 tirozinegységet meghaladó mennyiségben. A pH 7-en 50 – 150 tirozin egységnyi proteinázt termelő 25 törzs aktivitását megmértük pH 10-es kazein szubsztráttal is. Megállapítottuk, hogy az alkalikus aktivitás csak 3 törzs esetében haladta meg a 100 egységet. Ezért a további kísérleteinkben e 3 törzset és a fent említett 17 törzset választottuk ki. A 20 kiválasztott baktérium kultúra közül 7 törzset sertéstrágyából (ST) 4–4 törzset lisztből (L) és fehér-répából (F), 2–2 törzset sárgarépából (S) és lótrágyából (LT), 1 törzset zellerből (Z) izoláltunk. Ugyanakkor egyetlen burgonyából és kalarábéból származó törzs se került a legjobb 20 proteináztermelő törzs közé, s a néhány szénából és hagymából tenyésztett törzs se mutatott jó proteolitikus aktivitást.

A kiválasztott törzsek morfológiai és mikroszkópos vizsgálata során megállapítottuk, hogy valamennyi törzs *Bacillus subtilis*, esetleg más, a subtilishoz hasonló spórás baktérium.

A törzsek második szelektálását az elsővel azonos körülmények között végeztük el, csupán a méreteket változtattuk meg: a tenyésztés széles szájú, 500 ml-es Erlenneyer lombikban levő 100 ml táptalajon történt.

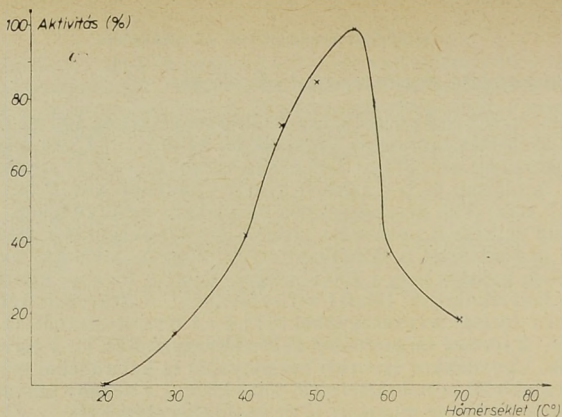
A nagylombikos tenyésztéssel 6 törzs kitermelése jobb, 14 törzsé rosszabb volt a kislombikos tenyésztésnél. Ez elsősorban a táptalaj térfogat – felület arányának változásával magyarázható, ami egyes törzseknek kedvező, másoknál kedvezőtlen hatású volt. A továbbiakban annak a 11 törzsnek a tulajdonságait vizsgáltuk, amelyek ilyen körülmények között is legalább 100 aktivitási egységnyi enzimet termeltek.

b) pH és hőmérséklet hatása a képződött proteinázok aktivitására

A kiválasztott baktérium törzsek által termelt fehérjebontó enzim pH – aktivitás görbéi alapján megállapítottuk, hogy az L 12, LT 3, S 10 és L 15 törzsek semlegesén, az L2, L3, F5 és S1 törzsek alkálikus proteinázokat termelnek pH 6–7, illetve pH 10–11 közötti optimummal, a maximális aktivitások 180 és 780, illetve 100 és 210 tirozin egység között váltakozott. Az ST4, ST16 és F7 törzsek a semleges és alkálikus pH tartományban két aktivitási maximummal rendelkeznek.

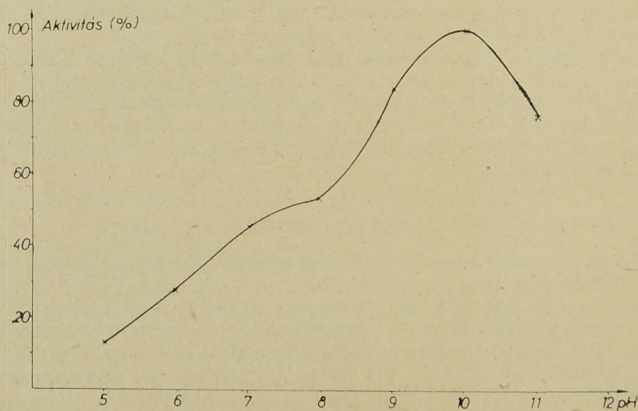
Valószínű, hogy ezek a törzsek kétféle enzimet termelnek. Az optimális aktivitás 50%-át meghaladó bontás pH intervalluma semleges proteinázoknál 3–4, alkalikusoknál 4–6 egység szélességű sávot tölt ki. Az 1–3 ábrán mutatjuk be példaként a 3-féle pH aktivitás görbéket.

A hőmérséklet hatását az egyes proteinázok fehérjebontó képességére az illető enzim pH optimumán mértük ki. Megállapítottuk, hogy valamennyi vizsgált proteináz 55 és 60 °C között a legaktívabb, itt a maximális aktivitás 290 és 1840 tirozin egység között volt. Számottevő fehérjebontás általában 40 és 65 °C között észlelhető, 70 °C-on csak 2 enzim (S 10 és F 5) aktivitása ért el az átlagosnál nagyobb értéket. Az S 10 törzs proteináza még 80 °C-on is megtartotta maximális aktivitásának 21%-át. 30 °C-on egyedül az L 2 törzs proteináza mutat 30%-nál nagyobb aktivitást. Megfigyelhető az is, hogy a semleges proteinázok hőmérséklet optimuma 55 °C-on, az alkalikusoké pedig 60 °C-on van. A 4. és 5. ábra mutat be példákat a semleges és alkalikus proteináz pH aktivitás görbéjére.



1. ábra

L 12 törzs által termelt enzimoldat pH-aktivitás görbéje (100% = 780 tirozinegység)

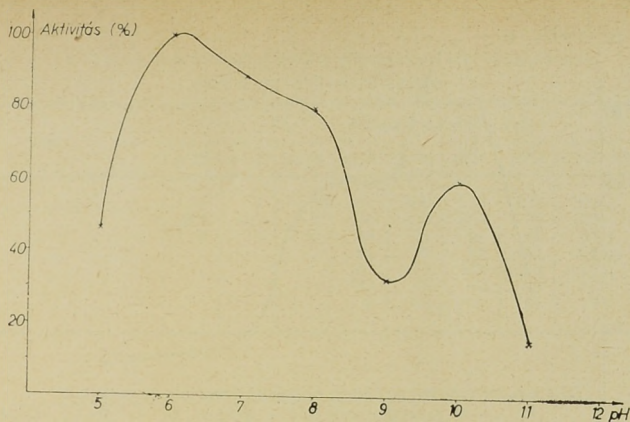


2. ábra

L 3 törzs által termelt enzimoldat pH-aktivitás görbéje (100% = 210 tirozinegység)

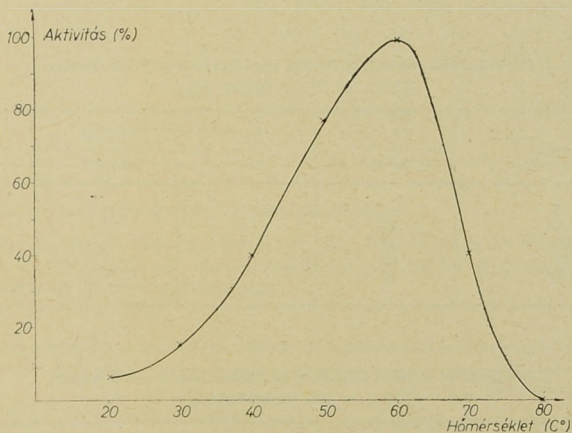
c) A képződött proteinázok hő és pH stabilitása

A baktérium törzsek által termelt proteinázok hőstabilitási vizsgálatait azt mutatták, hogy egyetlen enzim sem bírta ki az 5 perces 85 C°-ú inkubálást, s a 75 C°-os inkubálás során is 10 perc alatt elvesztették aktivitásukat. Az 55 és 65 C°-os inkubálási adatok szerint ezeken a hőmérsékleteken az alkálikus proteinázok stabilabbnak bizonyultak a semleges proteinázoknál. Az 1. és 2. táblázat példaként 1-1 semleges, ill. alkálikus proteináz hőstabilitási adatait foglalja össze.



3. ábra

ST 4 törzs által termelt enzimoldat pH-aktivitás görbéje (100% = 360 tirozinegység)

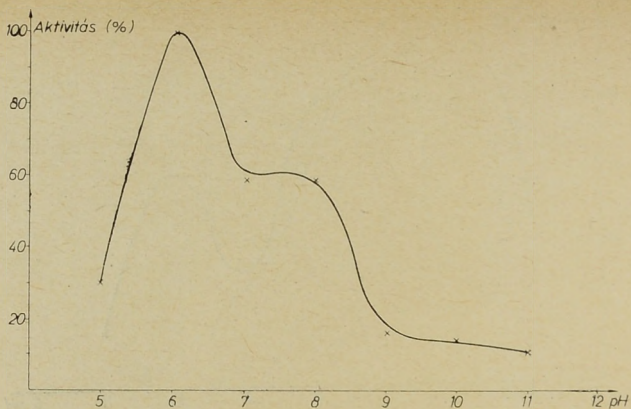


4. ábra

L 12 törzs által termelt semleges proteináz hőmérséklet-aktivitás görbéje (100% = 1840 tirozinegység)

Egy semleges és egy alkálikus proteináz pH stabilitását vizsgáltuk meg szobahőmérsékleten.

Mindkét törzs proteináza pH 8-on bizonyult a legstabilabbnak. Érdekes módon azonban az alkálikus enzim a 72 órás inkubálást lúgos közegben jobban bírta, mint a semlegesben. A semleges proteináz a savas közeget hosszabb ideig tűrte, mint az alkálikus, azonban pH 4-en 30 perc alatt az is elvesztette aktivitását. Az L 12 törzs semleges proteináza 30 percig pH 5 és 12 között, 6 óráig pH 5 és 10 között, 72 óráig pH 6 és 8 között vesztett el aktivitásából 50%-nál



5. ábra

L 3 törzs által termelt alkálikus proteináz hőmérséklet aktivitás görbéje (100% = 520 tirozinegység)

1. táblázat

L 12 törzs által termelt semleges proteináz hőstabilitási adatai
(100% = 780 tirozinegység)

Idő (perc)	Maradék aktivitás (%)			
	55 C°	65 C°	75 C°	85 C°
5				0
10	98	14	0	
30	72	1		
60	38	0		
120	13			

2. táblázat

L 3 törzs által termelt alkálikus proteináz hőstabilitási adatai
(100% = 200 tirozinegység)

Idő (perc)	Maradék aktivitás (%)			
	55 C°	65 C°	75 C°	85 C°
5				0
10	91	65	8	
30	87	30	0	
60	87	21		
120	78	0		

kevesebbet. Az L 3 törzs alkálikus proteináza ettől abban különbözik, hogy 72 óra után 12-es pH-n is megmaradt aktivitásának 60%-a. A kísérleti eredményeket a 3. és 4. táblázatban foglaltuk össze.

L 12 törzs által termelt semleges proteináz pH stabilitási adatai
(100% = 1180 tirozinegység)

Idő	Maradék aktivitás (%)									
	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH10	pH11	pH12
10 perc	1	3	64	91	100	100	100	100	77	62
30 perc	0,3	0,7	8	76	100	100	100	82	58	42
60 perc	0	0	4	74	80	93	98	64	38	14
6 óra			0	58	75	82	92	54	15	13
24 óra				47	74	78	89	21	13	12
48 óra				33	72	75	78	12	12	11
72 óra				6	63	70	61	10	9	9

4. táblázat

L 3 törzs által termelt alkálikus proteináz pH-stabilitási adatai
(100% = 210 tirozinegység)

Idő	Maradék aktivitás (%)										
	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11	pH12
10 perc	0	5	33	89	90	95	100	88	97	89	78
30 perc		0	17	78	78	84	95	84	73	80	66
60 perc			5	72	66	77	90	84	69	77	66
6 óra			0	64	64	72	83	75	68	70	64
24 óra				28	58	65	75	70	68	58	64
48 óra				22	58	65	72	69	42	58	64
72 óra				19	54	58	58	69	39	58	60

d) A felületi és szubmerz tenyésztés összehasonlítása

Néhány törzs proteináz termelését 84 órás felületi és 66 órás szubmerz tenyésztetben hasonlítottuk össze, szójalisztes táptalaj segítségével. A kapott eredményeket az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat

Felületi és szubmerz tenyészetek összehasonlítása néhány törzs proteináz termelése alapján

Törzs megnev.	A képződött enzim pH optimuma	Aktivitás (tirozinegység)	
		Felületi tenyésztés	Szubmerz tenyésztés
ST 4	6	630	910
ST 16	6	510	1000
L 2	10	180	790
L 12	6	1180	2690
L 3	10	210	80

A vizsgált öt törzs közül négy szubmerz tenyészetben termelt jobban. Különösen feltűnő az L 2 törzs, amelynek enzimtermelése rázatással több mint négyszeresére nőtt. Ezzel szemben az L 3 törzs szubmerz tenyésztetben a felületinek csak közel egyharmadát termelte. Mindez azt látszik bizonyítani, hogy a gyakorlatban az alkalmazott törzsektől függően mindkét tenyésztési módszert lehet alkalmazni.

e) Proteináz termelés összehasonlítása különböző táptalajokon

Az L 12 és L 3 törzseket szójalisztes táptalaj mellett a különböző összetételű kukoricaliszt – korpás táptalajokba is beoltottuk és szubmerz tenyésztés után mértük a centrifugált oldatok proteolitikus aktivitását.

A tenyésztés során valamennyi kukoricaliszt – korpás táptalajon jobb termelést értünk el, mint a szójalisztes táptalajon. Megállapítható továbbá az a tendencia, hogy minél több kukoricaliszt van a táptalajban a korpával szemben, annál nagyobb a képződött enzimoldat aktivitása. Mindkét törzs proteináz termelése a 65 g/l kukoricalisztet, 15 g/l korpát és 4 g/l glükózt tartalmazó táptalajon volt maximális, az ilyen összetételű táptalaj ajánlható a nagyobb méretű fermentációkhoz.

I R O D A L O M

- (1) *Telegdy Kováts L., Holló J.*: Élelmezési Iparok I. kötet. Tankönyvkiadó Bp. 1957.
- (2) *Görög J.*: Ipari mikrobiológia és enzimológia. Tankönyvkiadó Bp. 1967.
- (3) *Puskás A.*: Enzimológia. Tankönyvkiadó, Bp. 1962.
- (4) *László R.*: Élelmiszerkémiai gyakorlatok. Tankönyvkiadó, Bp. 1968.
- (5) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* The Williams and Wilkins Company. Baltimore, 1957.
- (6) *Güntelberg. A. V., Ottesen, H.*: Nature 170, 802 1952.
- (7) *Fukumoto J., Negoro, H., Komai, R.*: Sci. Ind. 27, 171 1953. Ref.: C. A. 49, 16070 b.
- (8) *Puskás A.*: Kandidátusi értekezés Bp. 1960.
- (9) *Görög J.*: Ipari Mikrobiológiai gyakorlatok I. rész. Tankönyvkiadó. Bp. 1963.
- (10) *Anson. M. L.*: J. Gen. Physiol. 22, 79, 1938.
- (11) *Kunitz. M.*: J. Gen. Physiol. 30, 291, 1947.
- (12) *Görög J., Nyeste L., Puskás A.*: Alkalmazott mikrobiológiai és enzimológiai gyakorlatok vezérfonala. Tankönyvkiadó, Bp. 1963.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКЦИИ ПРОТЕИНАЗЫ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ

И. Бэжеш

Целью исследовательской работы являлась изолирование и селекция штаммов бактерий на основании работы являлась изолирование и селекция штаммов бактерий на основании работы продуцирования протеолитических ферментов, а также испытание свойств образующихся протеиназов и условий их культивирования.

Автор изолировал 84 штаммов из образцов муки, разных овощей, сена и удобрений. Протеазу в большой или меньшей степени продуцировали 61% штаммов. В том числе 17 штаммов продуцировали ферменты с активностью выше 150 тирозиновой единицы а 30 с активностью выше 50 тирозиновой единицы. Для дальнейшего исследования избрали самых лучших штаммов продуцентов фермента. Эти штаммы были Бац. субтилис или другие споровые бактерии.

Бактериальные протеиназы действуют в широком диапазоне рН.

На основании их оптимума рН различаются нейтральные, щелочные а также штаммы продуцирующие обе протеиназы. Наблюдали, что активность нейтральных протеиназ вообще является более высоким чем активность щелочных протеиназ.

Оптимум температуры образующихся ферментов находятся в пределах 55–60 °С, значительное расщепление белка заметно при температуре 40 и 65 °С.

На основании результатов испытаний термостабильности образующиеся протеиназы стабильные до 65 °С, но в течении 30–120 минут и при этой температуре теряют активность. Стабильность рН испытанных протеиназов из бактерий в пределах рН 5 и 10 является относительно высоким. Щелочный

протеиназ при pH 12 в течении 72 часов не теряет ни половину своей активности. В результате сравнения методов культивирования установили что из исследуемых штаммов большинство продуцируют ферменты глубинным, а меньшая часть поверхностным культивированием. Из разных опробованных питательных субстратов самым лучшим являлась питательная среда содержащая 6,5% кукурузной муки и 1,5% отрубей.

PRÜFUNG DER PROTEINASEPRODUKTION VON BAKTERIENSTÄMMEN

I. Békés

Zielsetzung der Arbeit war die Isolierung und Selektierung von Bakterienstämmen aufgrund ihrer Produktion von eiweisszersetzenden Enzymen, wie auch Prüfung der Eigenschaften und Züchtungsbedingungen der gebildeten Proteinase.

Verfasser isolierte 84 Stämme aus Mehl-, verschiedenen Gemüse-, Heu- und Düngerproben. — 61% der Stämme erzeugten Proteinase in geringeren oder grösseren Mengen. Von diesen erzeugten 17 Stämme solche Enzyme, deren Aktivität 150, weitere 30 Stämme solche, deren Aktivität 50 Tyrosineinheiten überstieg. Zu weiteren Versuchen wurden die besten Enzymproduzierenden Stämme verwendet. Diese waren *Bacillus subtilis* und eventuell einige andere sporenbildende Bakterienstämme.

Die Bakterienproteinase entfalten ihre Wirkung in einem weiten pH Bereich. Aufgrund ihres pH Optimums konnten neutrale, alkalische, sowie beiderlei Proteinase erzeugende Stämme unterschieden werden. Es konnte beobachtet werden, dass die Aktivität der neutralen Proteinase diejenige der alkalischen weit übertrifft.

Temperaturoptimum der gebildeten Enzyme lag zwischen 55–60° C, eine beträchtliche Eiweisszersetzung konnte zwischen 40 und 65° C beobachtet werden.

Die Wärmestabilitätsmessungen ergaben Resultate nach welchen die gebildeten Proteinase nur bis 65° C stabil sind, aber in 30–120 Minuten auch bei dieser Temperatur ihre Aktivität verlieren.

Die pH Stabilität der geprüften Bakterienproteinase war zwischen pH 5 und 10 verhältnismässig gross. Die alkalische Proteinase verliert bei pH 12 selbst in 72 Stunden die Hälfte ihrer Aktivität nicht.

Die Vergleichung der Züchtungsmethoden führte zu dem Ergebnisse, dass der grössere Teil der geprüften Stämme auf submerser Wege, ein geringerer Teil durch Züchtung an der Oberfläche mehr Enzym produziert.

Von den verschiedenen untersuchten Nährböden erwies sich der 6,5% Maismehl und 1,5% Kleie enthaltende Nährboden für die Proteinaseproduktion am geeignetsten.

STUDY OF THE PRODUCTION OF PROTEOLYTIC ENZYMES BY BACTERIAL STRAINS

I. Békés

The aim of this paper was the isolation and selection of bacterial strains on the basis of their production of proteolytic enzymes as well as the study of the characteristics and culture conditions of the proteases.

84 strains were isolated from samples of flour, different vegetables, hay and manure. 61% of the strains produced more or less proteases. From these 17 strains produced the enzyme in quantities exceeding 150 and further 30 strains exceeding 50 tyrosine units of activity. The best enzyme producing strains were selected for further studies. These were strains of *Bacillus subtilis*, incidentally other sporegenous bacteria.

Bacterial proteinases exert their activity in a large pH interval. On the basis of pH-optima strains producing neutral, alkaline or both proteases can be distinguished. It may be observed that the activity of neutral proteases is in general much more elevated than that of alkaline ones.

The temperature optimum of the enzymes formed was between 55 and 60 °C and notable proteolysis could be observed between 45 and 65 °C.

According to heat stability studies the proteases formed are stable only up to 65 °C, but even at this temperature they loose their activity within 30 to 120 minutes.

pH-stability of the bacterial proteases investigated is relatively high between pH 5 and 10. When kept for 72 hr at pH 12, the alkaline protease loses less than half of its activity.

Comparing culture conditions it could be stated that with most of the strains tested enzyme production was higher in submerged culture and only with a minor part in surface cultivation.

From the different media tested the one containing 6,5% corn meal and 1,5% bran proved optimal for protease production.

ANDREOTTI R. ÉS FERLENGHI P.:

Néhány élelmiszer gyorsfagyasztása folyékony nitrogénnel – a fagyasztás gyorsaságának befolyása

(Congelazione rapida di alcuni prodotti alimentari mediante azoto liquido – influenza della velocità di congelazione.)
Industr. ital. Conserv. 42, 181, 1967.

Ref. Z.U. L. 139, 1, 38, 1968.

A gyorsfagyasztás a hagyományos eljárásokkal szemben figyelemreméltó előnyöket szolgáltat. A fagyasztandó termék és a hűtőszerszám közötti nagy hőmérsékleti különbség következtében mikrokristályos jég keletkezik. Ennek következménye: a sejtekben és az izomrostokban csekély szerkezeti változások, a lipoid-proteidkomplexumok és más fehérjék csekély megváltozásai, végül az állomány és a vitamintartalom jobb megőrzése. Szerzők különböző növényi és állati eredetű élelmiszereket – 80 és – 100 fok C közötti hőmérsékleten kis kísérleti készülékben folyékony nitrogénnel bepermetezéssel és

ugyanazon termékeket lassan is –22 C foktól – –26 C fokig terjedő hőmérsékleten megfagyasztották. A fagyasztott termékeket azonos körülmények között tárolták és a minőségi változásokat a raktározási idő alatt ellenőrizték.

Szerzők részletesen megtárgyalják a kísérleteikben felhasznált növényi és állati élelmiszerekkel nyert eredményeket és azokat a következőképp foglalják össze: A fagyasztott – növényi vagy állati eredetű – élelmiszer minőségét befolyásolja a fagyasztási eljárás gyorsasága. A folyékony nitrogénnel fagyasztott termék minősége jobb. A gyorsfagyasztás technikailag is előnyösebb: időmegtakarítást jelent és a készülék teljesítménye is jobb; a felengedett termékek érzékszervi és kémiai eredményei is jobbak, ha a fagyasztás gyorsan történik. Minél gyorsabban történik a fagyasztás, annál jobban marad meg a fagyasztott termék minősége a raktározás folyamán azonos feltételek mellett.

Kieselbach Gy. (Budapest)