

Charakterystyka i możliwości zastosowania bakterii z rodzaju *Bacillus* wyizolowanych z gleby

Patrycja Pietraszek, Piotr Walczak

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź, Polska

Abstrakt. Bakterie reprezentujące rodzaj *Bacillus* stosowane są do produkcji wielu komercyjnych biopreparatów. Mikroorganizmy te charakteryzują się dużą szybkością wzrostu, a także wydajnym systemem syntezy i sekrecji białek. Szczególne znaczenie mają syntetyzowane przez nie α -amylazy, które posiadają szerokie spektrum zastosowań począwszy od przemysłu spożywczego, będącego głównym odbiorcą enzymu, skończywszy na przemyśle farmaceutycznym. W związku z różnorodnością potrzeb poszczególnych gałęzi przemysłu istnieje konieczność produkcji preparatów amylolytycznych charakteryzujących się zróżnicowanymi optymalnymi parametrami kinetycznymi, szczególnie w odniesieniu do pH oraz temperatury. Celem badań była izolacja środowiskowych szczepów bakterii należących do rodzaju *Bacillus* wykazujących aktywność amylolytyczną oraz określenie wpływu czynników środowiskowych na katalityczne działanie syntetyzowanych przez nie enzymów. Analizowano pięć białek produkowanych przez trzy szczepy *B. subtilis* oraz przez jeden szczep *B. pumilus* i *B. licheniformis*. Przeprowadzone badania wykazały, iż wszystkie α -amylazy zachowywały aktywność w pH 3,6–10,0 i w szerokim przedziale temperatur 25–100°C. Aktywność poszczególnych enzymów podano w postaci ich aktywności właściwej. Ustalono, iż największą aktywność amylolytyczną wykazywało białko syntetyzowane przez szczep *B. pumilus* P2 (188 U·mg⁻¹), najmniejszą aktywnością charakteryzował się natomiast enzym produkowany przez *B. subtilis* S10 (77 U·mg⁻¹).

słowa kluczowe: *Bacillus* sp., α -amylaza, enzymy, pH, termostabilność

WSTĘP

Rodzaj *Bacillus* stanowią gramdodatnie lub gramujemne, cylindryczne, zwykle ruchliwe komórki urzęsione perytrychalnie lub biegunowo. Znane są również

gatunki nie wykazujące zdolności ruchu, jak *B. anthracis* czy *B. mycoides*. Mikroorganizmy należące do rodzaju *Bacillus* są z reguły katalazododatnie, tlenowe lub względnie beztlenowe. Charakteryzują się wysokim stopniem zróżnicowania fizjologicznego oraz metabolicznego uwarunkowanego różnorodnością genetyczną, na co wskazuje zawartość G+C w ich chromosomalnym DNA wahająca się od 32 do 69%. Drobnoustroje te mogą bytować w środowiskach o dużej rozpiętości temperatur, pH oraz zasolenia. W obrębie rodzaju wyróżnić można zarówno organizmy termofilne, izolowane z gorących źródeł wulkanicznych, jak i psychrofilne, rosnące w temperaturze 0°C. Ponadto, wyróżnia się tutaj zarówno gatunki alkalifilne (*B. alcalophilus*, *B. lentus*), jak i acydofilne (*B. coagulans*) (Szczęsna-Antczak, Trzmiel, 2008).

Bakterie z rodzaju *Bacillus* są szeroko rozpowszechnione w naturze. Izoluje się je z gleby, wód słodkich oraz słonych, ale także z przewodu pokarmowego zwierząt czy z psującej się żywności. Przyczyną takiej sytuacji jest zdolność tych bakterii do tworzenia endospor, pozwalających przeżyć w środowiskach o niesprzyjających parametrach fizykochemicznych.

Gatunki z rodzaju *Bacillus* charakteryzują się dużą szybkością wzrostu, wydajnym systemem syntezy i sekrecji białek zewnątrzkomórkowych pozwalającym na syntezę do 20 do 25 g·l⁻¹ produktu (Deb i in., 2013). Co więcej, większość z nich stanowią gatunki bezpieczne dla ludzi i zwierząt (posiadają status GRAS, z ang. Generally Recognized As Safe), wyjątek stanowi patogeny gatunek *B. anthracis* oraz blisko z nim spokrewniony *B. cereus*. Powyższe cechy bakterii *Bacillus* sp. są przyczyną ich częstego zastosowania do produkcji preparatów komercyjnych, w tym enzymów, antybiotyków, insektycydów, witamin, a także innych metabolitów (kwas hialuronowy, poligalakturonowy) (Schallmey i in., 2004; Harwood, Cranenburgh, 2008). Większość otrzymywanych na skalę przemysłową bioproduktów stanowią metabolity wtórne, których synteza nie jest związana bezpośrednio ze wzrostem liczby ko-

Autor do kontaktu:

Patrycja Pietraszek
e-mail: patrycja.pietraszek@edu.p.lodz.pl
tel. +48 042 6363639, faks +48 042 6365976

Praca wpłynęła do redakcji 23 sierpnia 2013 r.

mórek drobnoustrojów, co wpływa na poprawę ekonomiki procesu. Szacuje się, że połowa powstających preparatów enzymatycznych otrzymywana jest z udziałem bakterii z rodzaju *Bacillus*, zalicza się do nich proteazy, amylazy, pullulanazy czy izomerazy, przy czym ok. 25% z nich stanowią α -amylazy (Szczęsna-Antczak, Trzmiel, 2008). Enzymy te, zdolne do hydrolizy wiązań α -1,4-glikozydowych w cząsteczce skrobi, stosowane są obecnie w przemyśle spożywczym, chemicznym, a także farmaceutycznym, tekstylnym czy papierniczym (Aiyer, 2005; Souza, Magalhaes, 2010; Sailasi in., 2013). Uwzględniając potrzeby przemysłu, istnieje konieczność produkcji preparatów amylolitycznych charakteryzujących się zróżnicowanymi właściwościami, przede wszystkim w odniesieniu do optymalnych warunków ich aktywności, w tym pH oraz temperatury. Szczególnie istotną rolę odgrywają termostabilne α -amylazy, które zachowują aktywność w temperaturach powyżej 100°C pozwalających na upłynnienie, a następnie hydrolizę skrobi. Dostępne na rynku preparaty α -amylazy produkowane są głównie przez bakterie *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* oraz *B. licheniformis*, a także *B. subtilis* (Reddy i in., 2003). Mimo bliskiego pokrewieństwa trzech pierwszych wymienionych mikroorganizmów, syntetyzowane przez nie enzymy różnią się właściwościami, szczególnie termostabilnością. Zachowują one swoją aktywność po inkubacji w temperaturze 90°C (pH 6,5) przez odpowiednio 2, 50 i 270 min (Tomazic, Klibanov, 1988a, 1988b), co więcej termostabilna amylaza syntetyzowana przez *B. licheniformis* zachowuje aktywność w temperaturze 105°C, podczas gdy amylaza *B. amyloliquefaciens* w temperaturze 85°C.

B. licheniformis, *B. subtilis* oraz *B. amyloliquefaciens* stosowane w przemysłowej produkcji preparatów amylolitycznych, podobnie jak *B. pumilus* należą do grupy *Bacillus subtilis* lub też „subtilis spectrum”. DNA chromosomalne tych mikroorganizmów liczy ok. 4,2 Mbp i wykazuje homologię na poziomie ok. 70% w stosunku do DNA genomowego bakterii *B. subtilis*, podczas gdy poziom pokrewieństwa sekwencji genu 16S rRNA wynosi 98–99%. Z tego też powodu rozróżnienie poszczególnych gatunków należących do grupy *Bacillus subtilis* z wykorzystaniem klasycznych metod identyfikacji opierających się na analizie cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych jest praktycznie niemożliwe (Wang i in., 2007; Rooney i in., 2009). Kwestia ta jest dodatkowo utrudniona w przypadku szczepów izolowanych ze środowiska naturalnego (Kwon i in., 2009; Rooney i in., 2009), których profile biochemiczne różnią się od profili szczepów kolekcyjnych, co jest uwarunkowane mutacjami adaptacyjnymi zachodzącymi na poziomie DNA indukowanymi zmieniającymi się czynnikami fizykochemicznymi środowiska.

Celem przeprowadzonych badań była izolacja środowiskowych szczepów bakterii należących do rodzaju *Bacillus*, ze szczególnym uwzględnieniem gatunków reprezentujących grupę *Bacillus subtilis*, wykazujących aktyw-

ność amylolityczną, a także określenie wpływu czynników środowiskowych na katalityczne działanie tych enzymów. Preparaty charakteryzujące się największą aktywnością w pH 7,0, specyficznym dla enzymów produkowanych przez szczepy grupy *Bacillus subtilis*, analizowano pod kątem ustalenia optymalnych dla ich aktywności warunków fizykochemicznych, tj. temperatury i pH środowiska.

MATERIAŁY I METODY

Material biologiczny

Material biologiczny stanowiły 22 szczepy bakterii reprezentujących grupę *Bacillus subtilis*, w tym: 16 szczepów z gatunku *B. subtilis*, 3 szczepy z gatunku *B. licheniformis* oraz 3 *B. pumilus* wyizolowane z gleby oraz rozdrobnionych ziaren zbóż. Analizę profilu biochemicznego szczepów wykonano w odniesieniu do kolekcyjnych szczepów *B. subtilis* PCM 2021, *B. licheniformis* PCM 1847 oraz *B. pumilus* PCM 2641.

Identyfikacja izolatów

Próby gleby oraz rozdrobnionych ziaren zbóż rozcieńczono, a następnie wysiano na podłoże Luria-Bertani (LB, Gerhardt i in., 1984) z dodatkiem skrobi (2%). Hodowlę prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 44°C z szybkością wstrząsania 120 obr./min celem wstępnej selekcji gatunków termofilnych. Uzyskane zawiesiny bakterii rozcieńczono, a następnie wysiano na podłoże LB z dodatkiem agaru (2%) oraz skrobi (2%) i hodowano 24 h w 44°C. Aktywność amylolityczną izolatów oznaczano poddając hodowle bakterii działaniu oparów jodu sublimowanego (Bailey, Whelan, 1961). Czyste kultury bakterii wykazujące aktywność amylolityczną identyfikowano w oparciu o cechy morfologiczne i biochemiczne. Charakterystykę szczepów sporządzono w odniesieniu do szczepów referencyjnych *B. subtilis* PCM 2021, *B. licheniformis* PCM 1847 oraz *B. pumilus* PCM 2641. Analizy wykonano zgodnie z ogólnie przyjętymi protokołami (Slepecky, Hemphill, 2006). W przypadku izolatów, których profil różnił się znacząco od właściwości szczepów kolekcyjnych, wykonano analizę profilu długości fragmentów restrykcyjnych genu 16S rRNA (RFLP, ang. Restriction Fragment Length Polymorphism) trawionego enzymem restrykcyjnym *TaqI* (Fermentas).

Analiza aktywności amylolitycznej, wpływu pH i temperatury preinkubacji oraz reakcji enzymatycznej na aktywność α -amylaz

Czyste kultury bakterii wyizolowane ze środowiska naturalnego, wykazujące aktywność amylolityczną wysiano na podłoże LB z dodatkiem skrobi (2%). Hodowlę prowadzono przez 48 godzin w warunkach 44°C, 120 obr./min. Płyn pohodowlany, zebrany po 24 i 48 godzinach hodowli, analizowano pod kątem aktywności amylolitycznej. Aktywność preparatów określano na podstawie ilości cukrów

prostych uwolnionych przez enzym w ciągu jednej minuty reakcji enzymatycznej prowadzonej wobec 1% roztworu skrobi w buforze fosforanowym o pH 7,0, w temperaturze 44°C. Stężenie cukrów redukujących uwalnianych z hydrolizowanego substratu przez enzym oznaczano metodą Millera (Zgirski, 1999a). Pięć preparatów enzymatycznych wykazujących największą aktywność poddano analizom mającym na celu ustalenie optymalnych dla ich aktywności parametrów fizykochemicznych, a także ich termostabilności.

Aktywność preparatów enzymatycznych mierzono w roztworach o pH 3,6, 5,0, 7,5, 10,0 (3,6–5,6 bufor octanowy; 5,7–8,0 bufor fosforanowy; 9,2–10,7 bufor węglanowy) oraz w temperaturze 25, 50, 70 i 100°C. Analizowano ponadto wpływ temperatury preinkubacji enzymu na jego aktywność katalityczną, w tym celu preparat enzymu, w optymalnym dla jego aktywności pH, inkubowano w szerokim przedziale temperatur począwszy od temperatury pokojowej (25°C), skończywszy na 100°C (Zgirski, 1999b).

Oznaczanie stężenia białek zewnątrzkomórkowych

Stężenie białek zewnątrzkomórkowych w brzeczce po hodowlanej po 24 godzinach hodowli bakterii oznaczano metodą Bradforda, stosując jako standard serum albuminy (BSA, Sigma-Aldrich) (Bradford, 1976). Stężenie obliczono stosując krzywą wzorcową o równaniu $y = 0,496x + 0,379$ o zakresie stosowalności OD₅₉₅ 0,3–0,9, sporządzoną dla spektrofotometru T60 UV-Visible Spectrophotometer (PG Instruments).

WYNIKI

Identyfikacja izolatów

Szczepy izolowane z gleby oraz rozdrobnionych ziaren zbóż charakteryzowano w oparciu o klasyczne techniki identyfikacji, a zatem na podstawie analizy cech morfologicznych i biochemicznych. Wyizolowano 52 szczepy bakterii należące do rodzaju *Bacillus*, wszystkie sklasyfikowano jako gramdodatnie, przetrwalnikujące laseczki wykazujące zdolność ruchu. W oparciu o wykonaną analizę biochemiczną wyodrębniono kolejno 22 szczepy charakteryzujące się profilem metabolicznym zbliżonym do szczepów referencyjnych *B. licheniformis* PCM 1847, *B. pumilus* PCM 2641 oraz *B. subtilis* PCM 2021 (tab. 1). Wyizolowano 16 szczepów bakterii należących do gatunku *B. subtilis* (S1-S16), a także 3 reprezentujące gatunek *B. licheniformis* (L1-L3) oraz 3 szczepy *B. pumilus* (P1-P3).

Szczepy L2, L3 należące do gatunku *B. licheniformis* prezentowały taki sam profil biochemiczny jak szczep kolekcyjny, podczas gdy szczep L1, w przeciwieństwie do szczepu *B. licheniformis* PCM 1847, wykazywał zdolność do fermentacji arabinozy i ksylozy. Szczepy P1 oraz P2, w odróżnieniu od szczepu kolekcyjnego *B. pumilus* PCM 2641 (K2), wykazywały zdolność do hydrolizy skrobi oraz produkcji kwasów z arabinozy, co jest nietypowe dla tego

gatunku. Przynależność szczepów P1 oraz P2 do gatunku *B. pumilus* ustalono z zastosowaniem metod biologii molekularnej (analiza RFLP genu 16S rRNA trawionego enzymem restrykcyjnym *TaqI*). Szczep P3 jako jedyny spośród badanych izolatów nie hydrolizował skrobi, natomiast różnił się od szczepu referencyjnego jedną cechą, tzn. brakiem zdolności do fermentacji glukozy. W grupie izolatów należących do gatunku *B. subtilis*, jeden (S4) wykazywał 100% zgodności cech biochemicznych ze szczepem kolekcyjnym, podczas gdy pozostałe różniły się od szczepu kolekcyjnego zdolnością do fermentacji ksylozy.

Analiza aktywności amyloリティcznej

Wśród 22 szczepów izolowanych ze środowiska naturalnego, 21 wykazywało aktywność amyloリティczną w warunkach pH 7,0, 44°C (rys. 1). Wyjątek stanowił szczep sklasyfikowany jako *B. pumilus* P3. Najniższy poziom aktywności α -amylaz stwierdzono w odniesieniu do szczepów z gatunku *B. licheniformis*, która wynosiła od 0,5 (L2) do 0,9 U·ml⁻¹ (L1) w płynie pochodzonym po 24. godzinie hodowli. Natomiast po 48 godzinach hodowli odnotowano aktywność na poziomie 1,0 (L3) do 1,3 U·ml⁻¹ (L1). Dwukrotnie większą aktywnością charakteryzowały się szczepy *B. pumilus*, która po 24 godzinach wynosiła 2,0 (P2) do 2,1 U·ml⁻¹ (P1), podczas gdy po 48 godzinach hodowli stwierdzono aktywność α -amylaz na poziomie 1,6 (P1) i 2,3 U·ml⁻¹ (P2). W obrębie gatunku *B. subtilis* stwierdzono, iż większość szczepów po 24 godzinach hodowli syntetyzowała α -amylazy o aktywności ok. 2,5 U·ml⁻¹, natomiast średnia aktywność amylaz wydzielanych do pożywki hodowlanej po 48 godzinach hodowli wynosiła 2,6 U·ml⁻¹. Największą aktywnością amyloリティczną zarówno po 24, jak i po 48 godzinach hodowli charakteryzował się szczep *B. subtilis* S1 i wynosiła ona odpowiednio 3,3 oraz 4,5 U·ml⁻¹. Znacznie niższą aktywnością reprezentowały amylazy syntetyzowane po 24 godzinach przez szczepy S3, S6, S8 oraz S10, S11, S12, jednakże po 48 godzinach hodowli aktywność tych enzymów wzrosła do poziomu 4,0 U·ml⁻¹ dla szczepu S3 oraz ok. 3,0 U·ml⁻¹ dla pozostałych szczepów. Zaobserwowano, iż w przypadku badanych szczepów *B. licheniformis* aktywność α -amylaz syntetyzowanych po 24 godzinach była mniejsza niż amylaz wydzielanych do środowiska po 48 godzinach hodowli. W odniesieniu do szczepów gatunku *B. pumilus* oraz *B. subtilis* nie odnotowano żadnej prawidłowości, jest to zatem cecha szczepozależna. Kolejnym analizom mającym na celu ustalenie wpływu temperatury oraz pH na właściwości katalityczne enzymów poddano amylazy syntetyzowane przez szczepy L1, P2, a także S1, S3 oraz S10.

Analiza wpływu pH i temperatury preinkubacji oraz reakcji enzymatycznej na aktywność α -amylaz

Białka syntetyzowane przez szczepy *B. licheniformis* L1, *B. pumilus* P2 oraz trzy szczepy *B. subtilis* oznaczone odpowiednio S1, S3 oraz S10, wykazywały aktywność

Tabela 1. Charakterystyka biochemiczna izolatów środowiskowych oraz szczepów referencyjnych
Table 1. Biochemical characteristic of isolated and reference strains.

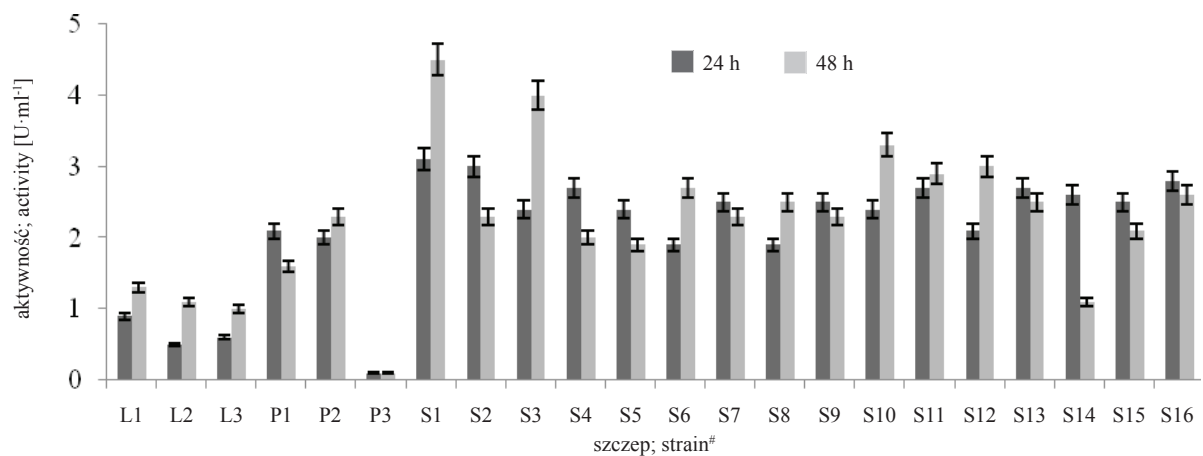
Szczep Strain	Aktyw- ność katalazy Catalase activity	Wyko- rzystanie cytrynia- nów Citrate utiliza- tion	Test VP VP test	Upłynnia- nie żela- tyny Gelatin liquefac- tion	Hydrolyza skrobi Starch hy- drolysis	Redukcja azotanów Nitrate reduction	Wytwa- rzanie kwasu z arabinozy Produc- tion of acid from arabinose	Wytwa- rzanie kwasu z ksylozy Produc- tion of acid from xylose	Wytwa- rzanie kwasu z glukozy Produc- tion of acid from glucose	Wytwa- rzanie gazu z glukozy Produc- tion of gas from glucose
K1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
K2	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
K3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
L1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
L3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
P1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
P2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
P3	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
S5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

K1 – *B. licheniformis* PCM 1847, K2 – *B. pumilus* PCM 2641; K3 – *B. subtilis* PCM 2021

L1–L3; P1–P3; S1–S16 – szczepy izolowane ze środowiska naturalnego należące odpowiednio do gatunków *B. licheniformis*, *B. pumilus* oraz *B. subtilis*; strains of *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. subtilis* respectively, isolated from environment

+ dodatni wynik analizy; positive result of analysis

- ujemny wynik analizy; negative result of analysis



patrz tab. 1; see Table 1

Rys. 1. Aktywność amylaz syntetyzowanych przez badane szczepy po 24 i 48 godzinach hodowli
Fig. 1. Activity of amylases synthesized after 24 and 48 hours of incubation of testes strains.

Tabela 2. Porównanie aktywności badanych amylaz w warunkach optymalnych (pH, temperatura) i po inkubacji w 100°C
 Table 2. Comparison of activities of tested amylases in optimum conditions (pH, temperature) and after incubation in 100°C.

Szczep Strain	Optymalne pH / temperatura [°C] Optimum pH/ temperature [°C]	Aktywność enzymu Enzyme activity [U·ml ⁻¹]	Stężenie białek [#] Proteins concentration [mg·ml ⁻¹] [#]	Aktywność właściwa enzymu Enzyme activity [U·mg ⁻¹]		Strata aktywności Loss of activity [%]
				warunki optymalne optimal conditions	preinkubacja w 100°C preincubation in 100°C	
L1	3,6/70	79,1	0,687	115,2	77,0	33,2
P2	5,0/70	70,4	0,374	188,2	149,1	20,8
S1	10,0/50	54,0	0,412	131,0	96,3	26,5
S3	7,5/50	60,1	0,554	108,4	74,8	31,0
S10	3,6/70	62,5	0,812	77,0	63,8	17,1

[#] stężenie białek zewnątrzkomórkowych w płynach pochodzących zebranych po 24 godzinach hodowli; concentration of extracellular proteins in supernatant taken after 24 hours of incubation

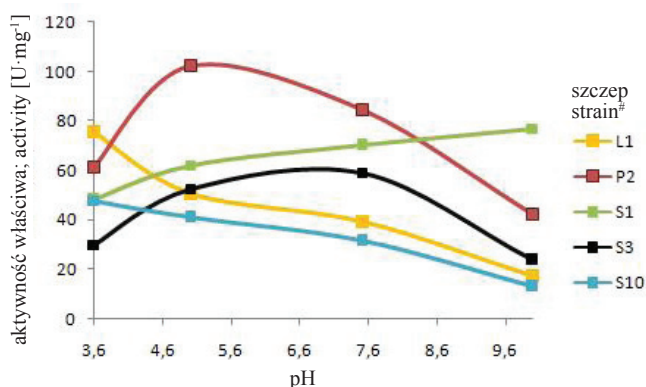
amylolityczną w zakresie pH od 3,6 do 10,0. Dwa spośród badanych enzymów wykazywały maksymalną aktywność w pH 3,6 i były to amylazy syntetyzowane przez szczepy L1 oraz S10. Amylaza produkowana przez szczep P2 charakteryzowała się optymalną aktywnością w pH 5,0, podczas gdy enzym syntetyzowany przez *B. subtilis* S1 wykazywał maksymalną aktywność amylolityczną w pH 10,0. Ostatni z badanych mikroorganizmów, S3 wydzieliał amylazę o maksymalnej aktywności w pH równym 7,5 (rys. 2).

Analizując wpływ temperatury reakcji enzymatycznej na właściwości katalityczne syntetyzowanych białek prowadzono reakcję hydrolizy skrobi w pH optymalnym dla aktywności danych amylaz (rys. 3). Stwierdzono, iż enzymy syntetyzowane przez szczepy S10, L1 oraz P2 wykazywały największą aktywność wówczas, gdy prowadzono reakcję w temperaturze 70°C, wynosiła ona odpowiednio 64,0 U·mg⁻¹, 115,2 U·mg⁻¹ oraz 167,4 U·mg⁻¹, natomiast optymalną temperaturą dla amylaz wydzielanych przez S1 i S3 było 50°C (146,0 U·mg⁻¹ dla S1 oraz 108,4 U·mg⁻¹ dla S3).

Badając wpływ temperatury preinkubacji enzymu na jego aktywność stwierdzono ponadto, iż wszystkie badane amylazy zachowywały swoją aktywność biologiczną po inkubacji w ciągu 5 minut w temperaturze 100°C. Aktywność właściwa α -amylaz określana po reakcji enzymatycznej zachodzącej w temperaturze pokojowej wynosiła nawet 82,7% aktywności w warunkach optymalnych dla szczepu S10. Największą stratę aktywności zaobserwowano natomiast dla szczepów L1 (33,2%) oraz S3 (31%) (tab. 2).

Stężenie białek zewnątrzkomórkowych

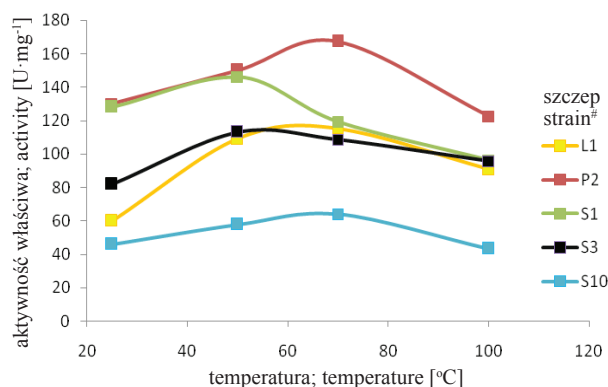
Najwyższe stężenie białek zewnątrzkomórkowych w brzojce pofermentacyjnej zaobserwowano dla szczepów S10 oraz L1 po 24 godzinach hodowli. Wynosiło ono odpowiednio 0,812 mg·ml⁻¹ oraz 0,687 mg·ml⁻¹. Dwa spośród badanych szczepów syntetyzowały białka w stężeniu ok. 0,5 mg·ml⁻¹ (0,412 mg·ml⁻¹ dla S1 oraz 0,554 dla S3). Najmniej białek wydzieliał do środowiska zewnętrznego szczep P2 (0,374 mg·ml⁻¹), co wpłynęło ostatecznie na aktywności właściwe amylaz syntetyzowanych przez szczepy z gru-



[#] patrz tab. 1; see Table 1

Rys. 2. Zależność aktywności właściwej badanych α -amylaz od pH środowiska reakcji

Fig. 2. Activity of α -amylases in different pH.



[#] patrz tab. 1; see Table 1

Rys. 3. Zależność aktywności właściwej badanych α -amylaz od temperatury reakcji enzymatycznej

Fig. 3. Activity of α -amylases at different temperature.

py *B. subtilis*. Należy zauważyć, iż szczepy L1 oraz P2 syntetyzujące α -amylazy o zbliżonych aktywnościach wynoszących 70–80 U·ml⁻¹, różnią się znacznie zdolnością do syntezy białek zewnątrzkomórkowych. Mniejsze stężenie białek zewnątrzkomórkowych produkowanych przez szczep P2 przy zbliżonej aktywności enzymów świadczyło o większej aktywności właściwej amylazy charakterystycznej dla tego szczepu. Podobne obserwacje poczyniono dla szczepów S3 oraz S10 (tab. 2).

DYSKUSJA

Znajomość fizjologii oraz biochemii bakterii z rodzaju *Bacillus*, a także dostępność wielu narzędzi inżynierii genetycznej, które pozwalają „kierować ich metabolizmem”, przemawiają za zastosowaniem tych drobnoustrojów w przemyśle fermentacyjnym (Schallmey i in., 2004). Bakterie *Bacillus* sp. są ważnymi producentami wielu komercyjnych biopreparatów, w tym enzymów, antybiotyków, witamin czy insektycydów. Szczególną rolę odgrywają α -amylazy, które stanowią obecnie 25% wszystkich preparatów enzymatycznych znajdujących się na rynku światowym. Z uwagi na właściwości fizyczne skrobi, enzymy te powinny zachowywać swoją aktywność biologiczną w wysokich temperaturach, rzędu 100°C. Wychodząc naprzeciw tym oczekiwaniom modyfikuje się już istniejące preparaty enzymatyczne bądź, korzystając z narzędzi inżynierii genetycznej, generuje się wydajniejszych producentów tych enzymów (Abosereh i in., 2013; Sailas i in., 2013) lub poszukuje się nowych, środowiskowych szczepów zdolnych do syntezy termostabilnych amylaz (Yasouri i in., 2003; Mahdavi i in., 2010). Mimo że enzymy te są syntetyzowane przez wiele gatunków mikroorganizmów, jak *Erwinia amylovora*, *Escherichia freundii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis* (Oseni, Ekperigin, 2013), głównie szczepy *Bacillus* sp. stosowane są do produkcji preparatów komercyjnych. Najlepsze właściwości aplikacyjne prezentują amylazy syntetyzowane przez szczepy *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* czy *B. stearothermophilus* (Vaseekaran i in., 2010; Sailas i in., 2013). Wykonane przez nas analizy pozwalają stwierdzić, iż amylazy syntetyzowane przez *B. licheniformis* i *B. subtilis* wykazują aktywność w szerokim zakresie pH (3,6–10,0), a także w wysokich temperaturach (100°C). Stabilność tych białek potwierdza ponadto ich wysoka aktywność zachowana po okresie preinkubacji enzymu (5 minut) we wspomnianej temperaturze. Na podstawie analizy kinetyki reakcji enzymatycznej stwierdzono, że amylazy produkowane przez obydwie gatunki zachowywały swoją aktywność biologiczną. Ponadto w przypadku szczepów *B. subtilis* strata aktywności amylolitycznej w porównaniu do aktywności w warunkach optymalnych wynosiła od 17,1 do 31,0%, podczas gdy dla *B. licheniformis* zaobserwowano 33,0% stratę aktywności. Dwa z badanych enzymów, syntetyzowanych przez szczepy *B.*

subtilis S1 oraz S3, posiadały zbliżone lub wyższe aktywności właściwe niż amylaza syntetyzowana przez szczep *B. licheniformis* L1. Amylazy produkowane przez *B. pumilus*, *B. licheniformis* oraz *B. subtilis* charakteryzowały się zróżnicowanymi właściwościami. Część z nich wykazywała maksimum swojej aktywności w pH kwaśnym (3,6 dla szczepów L1, S10 oraz 5,0 dla P2), podczas gdy dla innych (S1) optymalne było pH alkaliczne (10,0) lub neutralne (7,5 dla S3). Przeprowadzone eksperymenty mające na celu wybór najlepszej temperatury dla wysokiej aktywności badanych amylaz wykazały jako optymalną temperaturę 50°C dla szczepu S1 oraz S3 i 70°C dla szczepów L1, P2 i S10. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem badania Tomazica i Klibanova (1988a, 1988b), którzy ustalili, iż mimo bliskiego pokrewieństwa mikroorganizmów mogą one syntetyzować enzymy o różnych optymalnych parametrach kinetycznych. Należy nadmienić, że pH optymalne dla aktywności badanych amylaz różni się od dostępnych danych literaturowych, szczególnie w odniesieniu do enzymów produkowanych przez szczepy L1, S1 oraz S10. Oyeleke i Oduwole (2009), a także Amutha i Priya (2011) oraz Deb i in. (2013) określają pH optymalne amylaz syntetyzowanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus* na poziomie 6,0–7,0, aczkolwiek znane są szczepy *B. licheniformis* syntetyzujące α -amylazy o niższym optymalnym pH wynoszącym 5,5–6,0 (Anthrin i in., 1990), a także szczepy o maksymalnej aktywności amylolitycznej w zakresie pH 4,2–9,2 (Oguntimehin, 1998). Jednym z ważniejszych wyników uzyskanych w tej pracy jest określenie zdolności do wysokiej aktywności enzymatycznej szczepu z gatunku *B. pumilus* opisanego w literaturze przedmiotu jako gatunek niezdolny do syntezy enzymów amylolitycznych lub syntetyzujący je w bardzo niewielkich ilościach (Oyeleke, Oduwole, 2009). Zakłada się, iż analizowane enzymy z uwagi na swoją termostabilność oraz aktywność biologiczną w szerokim zakresie pH mogą stać się alternatywą dla obecnych na rynku preparatów amylolitycznych stosowanych w przemyśle spożywczym, papierniczym czy tekstylnym.

WNIOSKI

1. Badane szczepy *B. pumilus* izolowane z gleby, w przeciwieństwie do szczepów kolekcyjnych, charakteryzują się znaczną aktywnością amylolityczną.
2. Amylazy syntetyzowane przez gatunki bakterii reprezentujące grupę *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*) wykazują znaczne różnice pod względem optymalnych parametrów kinetycznych (pH, temperatura).
3. Badane amylazy szczepów *B. licheniformis* oraz *B. subtilis* zachowują aktywność biologiczną w szerokim zakresie pH oraz w wysokich temperaturach (rzędu 100°C). Strata ich aktywności biologicznej po inkubacji w temperaturze 100°C wynosi od 17 do 33% w odniesieniu do warunków optymalnych.

PIŚMIENNICTWO

- Abosereh N.A., Haggran A.H.A., Soliman E.A.M. Abo-Aba S.E.M., 2013.** Genetic modification of new *Bacillus* strains for enhanced α -amylase production by interspecific protoplast fusion. *Austral. J. Basic Appl. Sci.*, 7: 531-536.
- Aiyer P.V., 2005.** Amylases and their applications. *Afric. J. Biotechnol.*, 4: 1525-1529.
- Amutha K., Priya K.J., 2011.** Effect of pH, temperature and metal ions on amylase activity from *Bacillus subtilis* kcx 006. *Internation. J. Pharma BioSci.*, 2: 407-413.
- Anthrin R.L., Solheim B.A., Solheim L., Autherinen A.L., Ginefare J., Karpelin S., 1990.** A new *Bacillus licheniformis* alpha-amylase capable of low pH liquefaction. *Starch*, 43: 355-360.
- Bailey J.M., Whelan W.J., 1961.** Physical properties of starch. *J. Biol. Chem.*, 236: 969-973.
- Bradford M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Analytic. Biochem.*, 72: 248-254.
- Deb P., Talukdar S.A., Mohsina K., Sarker P.K., Sayem S.M.A., 2013.** Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus.*, 2: 154.
- Gerhardt P., Murray R.G.E., Castilow R.N., Nester E.W., Wood W.A., Krieg N.R., Philips G.B., 1994.** *Methods for General and Molecular Bacteriology.* ASM Press, Washington, D.C.
- Harwood C.R., Cranenburgh R., 2008.** *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.*, 16: 73-79.
- Kwon G.-H., Lee H.A., Park J.Y., Kim J.S., Lim J., Park C.S., Kwon D.Y., Kim Y.S., Kim J.H., 2009.** Development of RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *Internation. J. Food Microbiol.*, 129: 282-287.
- Mahdavi A., Sajedi R.H., Rassa M., Jafarian V., 2010.** Characterization of an α -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain. *Iran. J. Biotechnol.*, 8: 103-111.
- Oguntimehin G.B., 1998.** Growth of and amylase production by *Bacillus licheniformis* isolated from cassava processing waste. *Niger. Food J.*, 11: 58-67.
- Oseni O.A., Ekperigin M.M., 2013.** Isolation and activity of alpha-amylase from selected bacteria strains in the forest soil. *Global J. Biosci. Biotechnol.*, 2: 17-20.
- Oyeleke S.B., Oduwole A.A., 2009.** Production of amylase by bacteria isolated from a cassava dumpsite in Minna, Niger State, Nigeria. *Afric. J. Microbiol. Res.*, 4: 143-146.
- Reddy N.S., Nimmagadda A., Sambasiva Rao K.R.S., 2003.** An overview of the microbial α -amylase family. *Afric. J. Biotechnol.*, 2: 645-648.
- Rooney A.P., Price N.P.J., Ehrhardt C., Swezey J.L., Bannan J.D., 2009.** Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Internation. J. System. Evolution. Microbiol.*, 59: 2429-2436.
- Sailas B., Smitha R.B., Jisha V.N., Pradeep S., Sajith S., Sreedevi S., Priji P., Unni K.N., Sarath Josh M.K., 2013.** A monograph on amylase from *Bacillus* spp. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 4: 227-241.
- Schallmeyer M., Singh A., Ward O.P., 2004.** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canad. J. Microbiol.*, 50: 1-17.
- Slepecky R.A., Hemphill H.E., 2006.** The Genus *Bacillus*-Non-medical. ss. 530-562. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. *Prokaryotes.* Springer Science+BusinessMedia, LLC, NY, USA.
- Souza P.M., Magalhaes P.O., 2010.** Application of microbial α -amylase in industry. *Brazil. J. Microbiol.*, 41: 850-861.
- Szczęsna-Antczak M., Trzmiel T., 2008.** Bakterie rodzaju *Bacillus*. ss. 91-119. W: *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności;* Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., PWN, Warszawa.
- Tomazic S.J., Klibanov A.M., 1988a.** Why is one *Bacillus* alpha-amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another? *J. Biol. Chem.*, 263: 3092-3096.
- Tomazic S.J., Klibanov A.M., 1988b.** Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* amylases. *J. Biol. Chem.*, 263: 3086-3091.
- Vaseekaran S., Balakumar S., Arasaratnam V., 2010.** Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α -amylase. *Tropic. Agric. Res.*, 22: 1-11.
- Wang L.-T., Lee F.-W., Tai C.-J., Kasai H., 2007.** Comparison of *gyrB* sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in *Bacillus subtilis* group. *Internation. J. System. Evolution. Microbiol.*, 57: 1846-1850.
- Yasouri F.N., Rasa M., Sariri R., 2003.** Extraction and purification of thermostable α -amylase from *Bacillus coagulans* found in Iranian soil samples. *Internation. J. Chem. Sci.*, 1: 332-340.
- Zgirski A., 1999a.** Cukry i proteoglikany. ss. 260-305. W: *Ćwiczenia z biochemii;* Kłyszczko-Stefanowicz L., PWN, Warszawa.
- Zgirski A., 1999b.** Enzymy. ss. 471-573. W: *Ćwiczenia z biochemii;* Kłyszczko-Stefanowicz L., PWN, Warszawa.

P. Pietraszek, P. Walczak

CHARACTERISTIC AND APPLICATIONS OF *BACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM SOIL

Summary

Bacillus species are source of commercial enzymes, including amylases, proteases, glucose isomerase or pullulanase. Especially important are α -amylases, enzymes hydrolyzing α -1,4- glucosidic bonds in starch molecule, which have wide range of applications. Analyzing diverse needs of various industries, there is a need for production of amylolytic enzymes with different properties, with emphasis on temperature and pH.

The aim of the study was isolation of environmental strains belonging to genus *Bacillus*, as well as determination of the influence of physicochemical factors on the catalytic activity of synthesized enzymes. During analysis five α -amylases produced by three strains of *B. subtilis*, one of *B. pumilus* and one amylase secreted by *B. licheniformis* strain were analyzed. Activity of tested amylases at pH from 3.6 to 10.0, and at wide range of temperatures (25–100°C) was determined.

In the present study, 22 strains belonging to *Bacillus subtilis* group (16 *B. subtilis* strains, 3 *B. licheniformis* and 3 *B. pumilus* strains) were isolated, while 21 of them were able to synthesize of amylolytic enzymes. Two of isolates, *B. subtilis* S10 and *B. licheniformis* L1 synthesized amylases with optimal activity at pH 3.6. Enzymes secreted by *B. pumilus* P2 had the high estactivity at pH 7.5, whereas *B. subtilis* S3 at pH 5.0. Amylase isolated from *B. subtilis* S1 strain, contrary to bacteria mentioned above, possessed optimum activity at pH 10. Three among synthesized

enzymes S10, L1, and P2 showed the highest activity at 70°C (77 U mg⁻¹, 115.2 U mg⁻¹ and 188.2 U mg⁻¹, respectively), whereas the optimum temperature for amylases isolated from S1 and S3 was 50°C (131 U mg⁻¹, 108.4 U mg⁻¹ respectively). All of tested enzymes remained activity at 100°C. It is assumed that, the analyzed enzymes may be an alternative for the current amylolytic preparates used in food, paper and textile industry.

key words: *Bacillus* sp., enzymes, α -amylase, thermostability.