



Wpływ pH i temperatury hodowli na biosyntezę niektórych pozakomór- kowych enzymów u *Bacillus subtilis* IBTC-3

Tadeusz Trzmiel
Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka

1. Wstęp

Subtilizyny, zwane zwyczajowo alkalicznymi proteinazami bakterii z rodzaju *Bacillus*, stosuje się powszechnie do produkcji enzymatycznych środków piorących. Potencjalnie dobrymi ich producentami są szczepy z gatunków: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* oraz alkalofilne kultury *Bacillus* sp. (1 - 4). Niektóre z nich obok subtilizyny wydzielają do środowiska hodowlanego inne enzymy (2,4). Hodowlę bakterii prowadzi się w fermentorach w ciekłych podłożach o ściśle określonym składzie i przy zachowaniu specyficznych warunków fizycznych i chemicznych. Większość szczepów bakterii rodzaju *Bacillus* w procesie produkcji subtilizyny hoduje się w zakresie pH 6,5 - 7,5 (4 - 9). Do wyjątkowych należą alkalofilne gatunki *Bacillus* sp. (np. *B. alcalophilus*), które rosną w środowisku nawet wysoce alkalicznym

(pH 8 – 11) (10 – 12). Regulacja pH na stałym poziomie tylko niekiedy daje poprawę wyników biosyntezy (13). W procesach biosyntezy subtilizyny stosuje się dość szeroki zakres temperatur z przedziału 28 – 40°C (5 – 7, 14 – 15). Stężenie rozpuszczonego tlenu w podłożu, ilość inokulum, rodzaj środka gaszącego pianę to kolejne czynniki wpływające na wydajność biosyntezy enzymów w procesach hodowli bakterii.

W pracy określono wpływ pH i temperatury na biosyntezę subtilizyny, metaloproteinazy, α -amylazy i lipazy w hodowlach *B. subtilis* IBTC-3 — szczepu, w oparciu o który opracowano i sprawdzono w skali półtechnicznej technologię produkcji preparatów subtilizyny.

2. Materiały i metody

Materiał biologiczny

Bacillus subtilis IBTC-3 (kolekcja Instytutu Biochemii Technicznej) przechowywano w 4°C na stałym podłożu wzrostowym oraz w formie zliofilizowanej. Materiał posiewowy do hodowli wstrząsanych stanowiła biomasa bakteryjna uaktywniona w 24-godzinnej hodowli statycznej na stałym podłożu wzrostowym w 37°C.

Podłoża

Podłoże wzrostowe stałe: 1:1 (v/v) bulion (1,5%) i brzeczka piwna (8°B_{lg}) oraz 2% agaru, pH = 8,4.

Podłoże P: po 0,05% MgCl₂ · 6H₂O, CaCl₂ · 6H₂O i KCl, 0,1% KH₂PO₄, 10⁻³% FeCl₃, 2 · 10⁻⁴% MnSO₄, 2% glukozy, 0,5% namoku kukurydzanego, 100 cm³ serwatki, pH 8,5. Podłoże sterylizowano w 121°C przez 30 min.

Warunki hodowli wstrząsanej

Hodowle prowadzono metodą wgłębną na wstrząsarce o mimośrodowym ruchu tarczy przy 175 rpm, w kolbach płaskodennych o pojemności 500 cm³ zawierających 100 cm³ podłoża P przez 72 godziny.

Warunki hodowli bakterii w fermentorach

Hodowle prowadzono w dwóch równolegle pracujących fermentorach 2 litrowych MultiGen firmy NewBrunswick zawierających po 1,5 dm³ podłoża P. Pożywkę wraz z fermentorami sterylizowano 40 minut w 121°C. Temperatura hodowli wynosiła 30°C. Podłoże zaszczipiano 1% 21 – 24-godzinnego inokulum (z hodowli wstrząsanej prowadzonej w 30°C), a pianę gaszono odpieniaczem DowCorning.

Ze środowiska hodowlanego pobierano próby w odstępach 3 godzinnych. Oznaczano w nich: aktywność proteinaz, α -amylazy i lipazy oraz ilość komórek bakterii w 1 cm³ cieczy. Ponadto prowadzono ciągły pomiar i zapis poziomu pH oraz prężności (ilości) rozpuszczonego w podłożu tlenu pO₂.

Aktywność proteolityczna

Aktywność proteinaz oznaczano metodą Ansona (16), stosując jako substrat zdenaturowaną mocznikiem wołową hemoglobinę.

Za jednostkę aktywności (mJA) przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach standardowych testu (6 cm³ inkubatu, 100 mg hemoglobiny, 25°C) hydrolizuje zdenaturowaną hemoglobinę z taką szybkością, że ilość rozpuszczonych w 5% kwasie trójchlorooctowym produktów hydrolizy powstających w czasie jednej minuty, daje po reakcji z odczynnikiem Folina absorbancję przy 690 nm odpowiadającą 1 μ M tyrozyny.

Aktywność subtilizyny i metaloproteinazy w ich mieszaninie określano własną metodą. Jej zasada oparta jest na stwierdzeniu, 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.

Aktywność amylolityczna

Aktywność enzymów amylolitycznych wytwarzanych pozakomórkowo przez *B. subtilis* IBTC-3 oznaczano wg metody Fischera-Steina (17).

Za jednostkę aktywności (JFS) przyjęto tę ilość enzymu, która w ciągu 3 minut w temperaturze 25°C i pH 7 uwalnia w 1% roztworze skrobi rozpuszczalnej grupy redukujące, odpowiadające 1 mg maltozy.

Aktywność lipolityczna

Aktywność enzymów lipolitycznych wytwarzanych pozakomórkowo przez *B. subtilis* IBTC-3 oznaczano metodą miareczkową (18).

Za jednostkę aktywności (J) przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 60 minut w 37°C i pH 7 uwalnia w 40% emulsji oleju oliwkowego grupy kwasowe, odpowiadające 1 μ M kwasu oleinowego.

Oznaczanie liczby drobnoustrojów

Liczbę komórek bakteryjnych w 1 cm³ cieczy pohodowlanej oznaczano metodą bezpośrednią z wykorzystaniem komory Thoma.

Kontrola stopnia degradacji metaloproteiny

100 cm³ hodowli z fermentora wirowano w wirówce Beckmana (10 min, 10 000 rpm). Supernatant zlewano do kolby płaskodennej (500 cm³) i korygowano jego pH do wartości, jaką wykazywała hodowla w momencie pobrania próby. Biomase bakterii po przemyciu 50 cm³ soli fizjologicznej, zawieszano w 100 cm³ soli fizjologicznej i również przenoszono do kolby o pojemności 500 cm³ (pH zawiesiny biomasy w soli fizjologicznej wynosiło około 7,4). Operacje wykonywano w ciągu 30 minut i po tym czasie pobierano próby zerowe do analizy. Następnie obie kolby wstrząsano (175 rpm, 30°C), korygując pH supernatantu co 1 godzinę do wartości ustalonej na początku eksperymentu. Z zawiesiny biomasy po 30 minutach, a z supernatantu po 1, 3 i 6 godzinach pobierano próby do analizy, w których oznaczano aktywność subtilizyny i metaloproteiny.

3. Wyniki i ich dyskusja

Wykazano, że maksymalną produkcję subtilizyny w hodowlach wstrząsanych na podłożu P uzyskuje się w 30°C, metaloproteiny w niższych temperaturach, podczas gdy biosyntezę α -amylazy i lipazy, a także najlepszy wzrost ($9,8 \cdot 10^9$ komórek/cm³) bakterie wykazują w temperaturze 33°C (tab. 1). Zależność tę potwierdzono w hodowli w fermentorze, również na innych podłożach opracowanych dla produkcji subtilizyny. Z danych literaturowych (8,19 – 20) wynika, że optymalna temperatura dla wzrostu drobnoustrojów i biosyntezy enzymów może być zróżnicowana. Przykładowo Markanen i Bailey (21) najlepszy wzrost *B. subtilis* obserwowali w 35 – 40°C, maksymalną produkcję alkalicznej proteiny w 32,5°C, a metaloproteiny w 30°C oraz 37,5°C.

TABELA 1
WPLYW TEMPERATURY HODOWLI *B. SUBTILIS* IBTC-3 NA BIOSYNTEZĘ, PROTEINAZ, α -AMYLAZY I LIPAZY

Temperatura hodowli (°C)	Aktywność proteinaz (mjA/cm ³)		Aktywność α -amylazy (jFS/cm ³)	Aktywność lipolityczna (J/cm ³)	Wzrost bakterii (liczba komórek $\cdot 10^9$ /cm ³)
	subtilizyna	metalo-proteinaza			
27	4,92	3,56	88	29	9,4
30	5,38	3,37	108	38	9,6
33	5,13	3,12	142	41	9,8
36	4,95	2,85	136	32	9,6

pH startowe hodowli wynosiło 8,5. W doświadczeniach nad biosyntezą lipazy podłoże P uzupełniano dodatkiem 1% oleju oliwkowego.

TABELA 2

WPLYW PH STARTOWEGO HODOWLI *B. SUBTILIS* IBTC-3 NA BIOSYNTEZĘ PROTEINAZ, α -AMYLAZY I LIPAZY

pH startowe hodowli	Aktywność proteinaz (mjA/cm ³)		Aktywność α -amylazy (jFS/cm ³)	Aktywność lipolityczna (J/cm ³)	Wzrost bakterii (liczba komórek · 10 ⁹ /cm ³)
	subtilizyna	metalo-proteinaza			
6,0	3,92	4,46	102	21	9,8
7,0	4,13	3,82	108	29	10,0
8,0	4,98	3,51	98	40	9,6
8,5	5,33	3,41	86	42	9,6
9,0	5,24	3,31	52	34	9,2

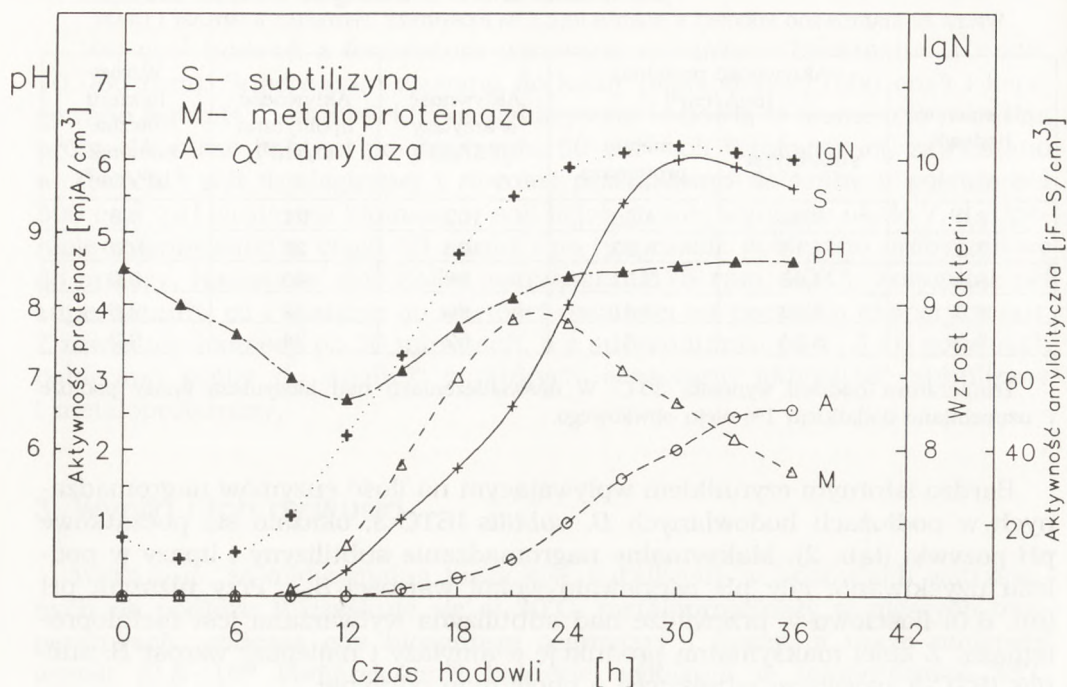
Temperatura hodowli wynosiła 30°C. W doświadczeniach nad biosyntezą lipazy podłoże P uzupełniano dodatkiem 1% oleju oliwkowego.

Bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na ilość enzymów nagromadzanych w podłożach hodowlanych *B. subtilis* IBTC-3, okazało się początkowe pH pożywki (tab. 2). Maksymalne nagromadzenie subtilizyny i lipazy w podłożu uzyskiwano, gdy pH oscyloowało wokół wartości 8,5. Przy niższym pH (np. 6,0) ilościowo w przewodzie nad subtilizyną wytwarzana jest metaloproteinaza. Z kolei maksymalną produkcję α -amylazy i najlepszy wzrost *B. subtilis* IBTC-3 uzyskano w pożywce o obojętnym odczynie.

Według danych literaturowych (22 – 23) pH podłoża optymalne dla wzrostu drobnoustrojów nie zawsze pokrywa się z odpowiednim dla biosyntezy enzymów. W licznych publikacjach i patentach nie wspomina się jednak o ukierunkowaniu hodowli bakterii z rodzaju *Bacillus* na biosyntezę jednej z dwóch omawianych proteinaz w przypadku zróżnicowania pH wyjściowego podłoża. W dalszych badaniach próbowano wyjaśnić istotę wpływu pH na biosyntezę proteinaz przez *B. subtilis* IBTC-3.

Typowy przebieg hodowli *B. subtilis* IBTC-3 w podłożu P w fermentorze MultiGen, a także w warunkach uznanych za optymalne dla biosyntezy subtilizyny (850 rpm, 1 vvm, wypełnienie 75%, temp. 30°C, pH startowe 8,5, 1% 21-godzinne inokulum) pokazano na rys. 1. Maksymalną ilość tej proteiny (5,85 – 6,05 mjA/cm³) otrzymywano zawsze w 30 godzinie hodowli, a zatem w początkowym okresie fazy stacjonarnej. Aktywność metaloproteinazy w tym czasie osiągała wartość 2,3 – 2,6 mjA/cm³, jednakże jej maksymalne nagromadzenie w podłożu przypadało zwykle na koniec fazy logarytmicznej, pomiędzy 21 a 24 godziną hodowli i wynosiło ok. 4 mjA/cm³. Tak zatem pomiędzy 24 a 30 godziną hodowli następuje spadek aktywności tego enzymu o 1,4 – 1,7 mjA/cm³.

W oparciu o wyniki prac Dancera i Mandelstama (24) przyjęto tezę, że przyczyną spadku aktywności metaloproteinazy w podłożu jest jej degradacja przez subtilizynę. Tezę tę udowodniono, badając zmiany aktywności tego enzymu w próbkach podłoża pobranych z fermentora i wstrząsanych (po odwirowaniu biomasy) w warunkach symulujących hodowlę bakterii. W próbie

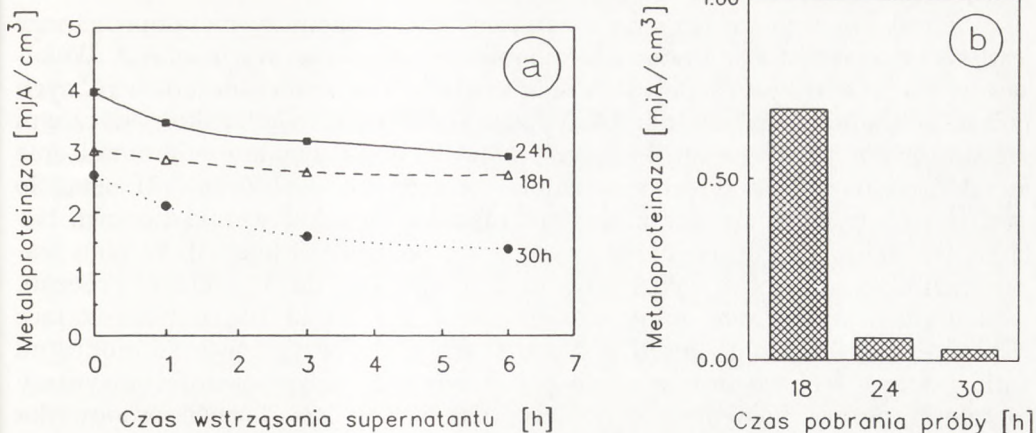


Rys. 1. Przebieg hodowli *B. subtilis* IBTC-3 w fermentorze MultiGen w podłożu P w warunkach optymalnych dla biosyntezy subtilizyny (pH startowe 8,5, pH inokulum 8,5).

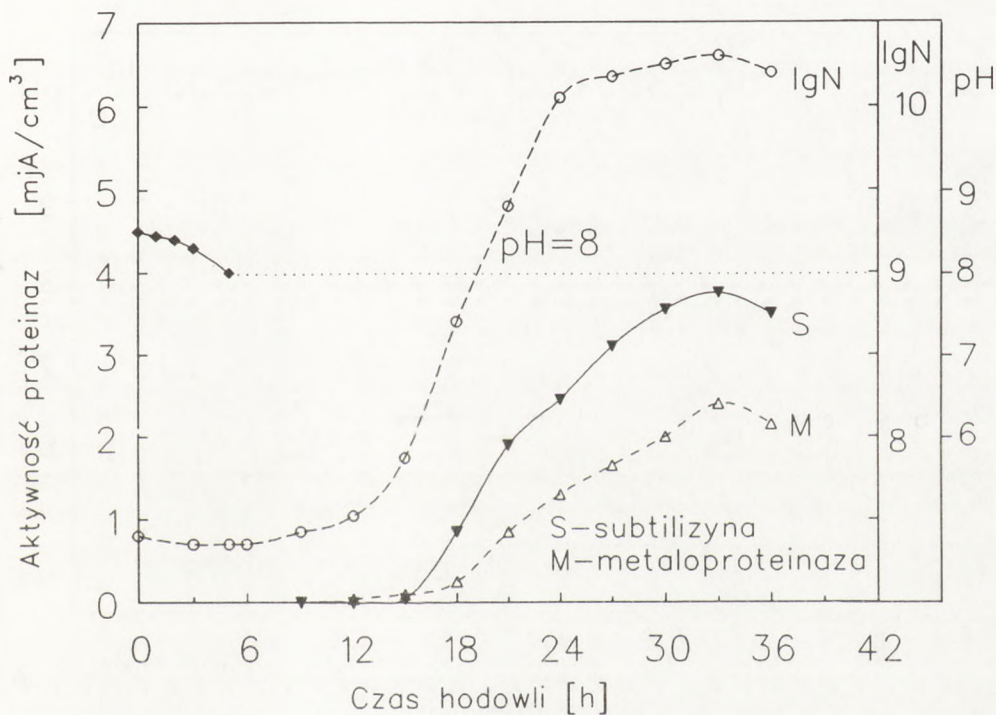
z 24 godziny hodowli, w ciągu 6 godzin następuje spadek aktywności metaloproteinazy sięgający 0,9 – 1,1 mJA/cm³ (rys. 2a). Można przyjąć, że zbliżone straty aktywności enzymu mają miejsce w rzeczywistych warunkach pomiędzy 24 a 30 godziną hodowli bakterii w fermentorze.

Pomiędzy 15 a 21 godziną hodowli w fermentorze przyrost aktywności metaloproteinazy wynosi około 2 mJA/cm³ (por. rys. 1). Przy zachowaniu tego tempa biosyntezy i jednoczesnym uwzględnieniu wyznaczonej szybkości degradacji (1,1 mJA/cm³), aktywność enzymu w podłożu pomiędzy 24 a 30 godziną hodowli powinna wzrosnąć o około 0,9 mJA/cm³. Tymczasem maleje ona i to aż o 1,4 – 1,7 mJA/cm³. Sugeruje to, że biosynteza metaloproteinazy pomiędzy 21 a 24 godziną hodowli zostaje zahamowana.

Pośrednich dowodów potwierdzających słuszność przyjętego rozumowania dostarczyły eksperymenty wzorowane na pracy Botha i wsp. (25). Autorzy ci wykazali, że odwirowana i przemyta masa komórkowa pobrana z logarytmicznej fazy wzrostu *B. amyloliquefaciens*, a następnie zawieszona w mineralnym podłożu jeszcze przez 90 minut jest zdolna do sekrecji pozakomórkowych enzymów. W podobnych doświadczeniach dla *B. subtilis* IBTC-3 stwierdzono, że komórki pochodzące z 18 godziny hodowli nadal wykazują zdolność do wydzielania do środowiska znaczących ilości metaloproteinazy (0,5 –



Rys. 2. Aktywność metaloproteiny w supernatantach (a) i w zawiesinach biomasy (b) po 18, 24 i 30 godzinach hodowli *B. subtilis* IBTC-3 w fermentorze.

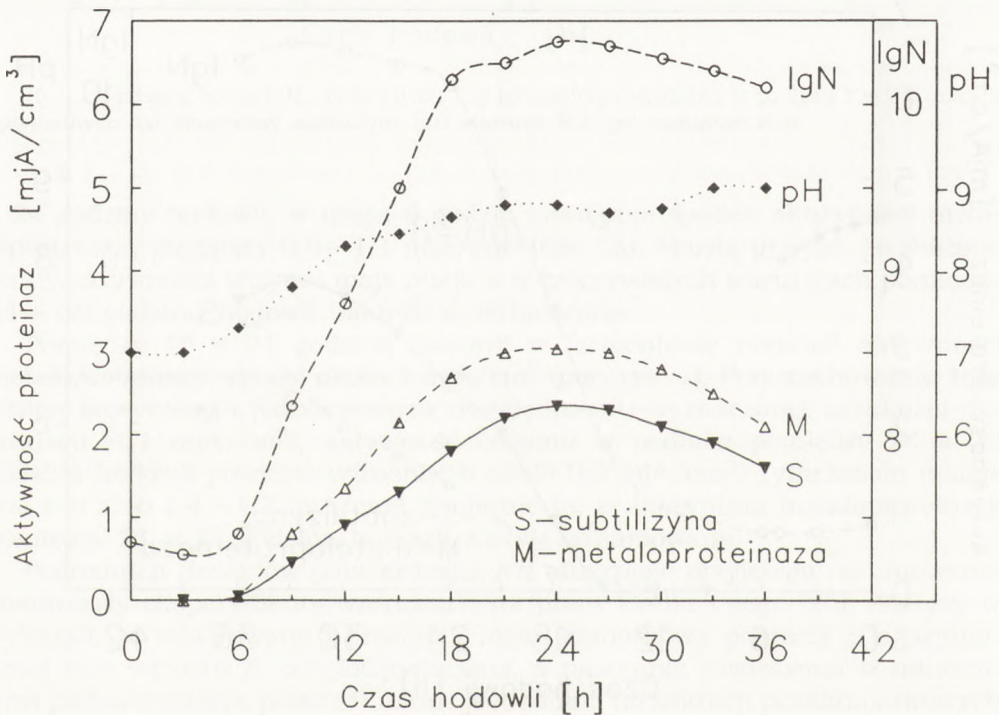


Rys. 3. Przebieg hodowli *B. subtilis* IBTC-3 w fermentorze w podłożu o pH regulowanym na poziomie 8.

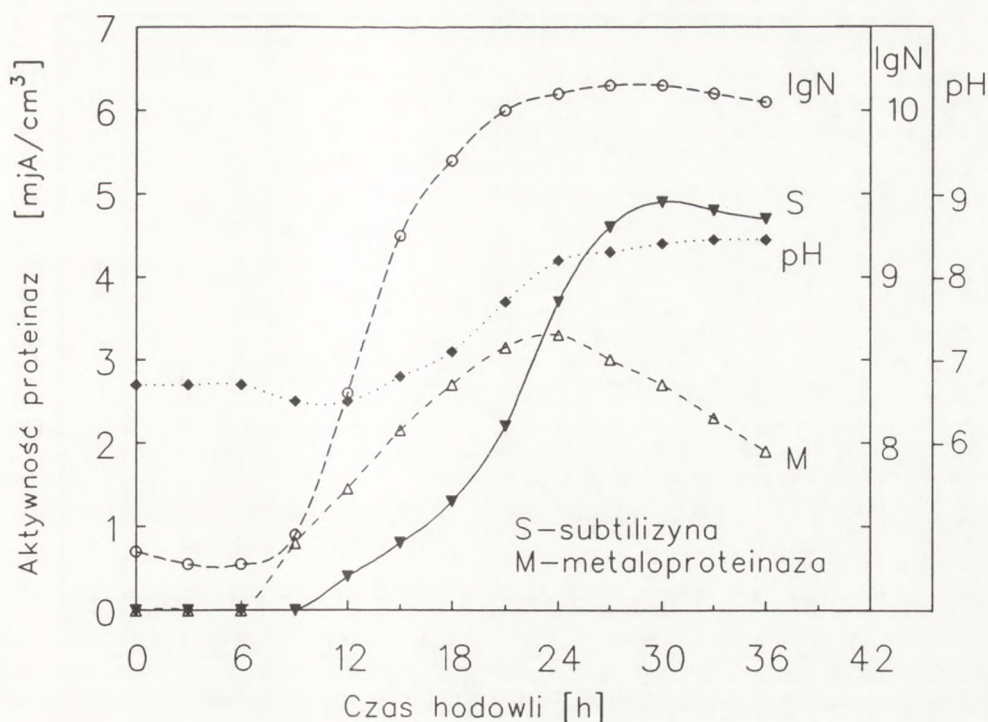
0,95 mJ/cm³). Natomiast komórki po 24 lub 30 godzinach hodowli wydzielają jedynie śladowe ilości enzymu (rys. 2b).

Przyjęto hipotezę, że przyczyną zahamowania biosyntezy metaloproteiny jest wzrost zasadowości środowiska hodowlanego powyżej wartości 8,3. Wskazywały na to rezultaty hodowli *B. subtilis* IBTC-3 w fermentorach w różnych pożywkach opracowanych dla biosyntezy subtilizyny, o charakterystycznym pH startowym 8,5. We wszystkich tych hodowlach maksymalne nagromadzenie metaloproteiny w podłożu przypadło na moment, w którym pH osiągało wartość 8,3 (rys. 1). Zgodne z przyjętą hipotezą są także wyniki hodowli bakterii w środowisku o pH utrzymywanym na poziomie 8 (rys. 3). W tych warunkach obie proteiny wydzielane są do podłoża aż do 33 godziny procesu.

Jednakże w dalszym toku badań uzyskano wyniki nie potwierdzające wcześniejszych założeń. Jeżeli podłoże P użyte do przygotowania inokulum i dla hodowli w fermentorze miało pH startowe 7, zahamowanie biosyntezy metaloproteiny następowało dopiero, wtedy gdy zasadowość środowiska osiągała wartość 8,8 (rys. 4). Obserwowano również stopniowe zmniejszanie się ilości enzymu w podłożu od 24 godziny (rys. 5), pomimo że pH środowiska hodowlanego utrzymywano na poziomie 7 (po samoobniżeniu się ze startowego 8,5).



Rys. 4. Przebieg hodowli *B. subtilis* IBTC-3 w fermentorze w podłożu o pH startowym 7, zaszczerpionym inokulum o pH 7.



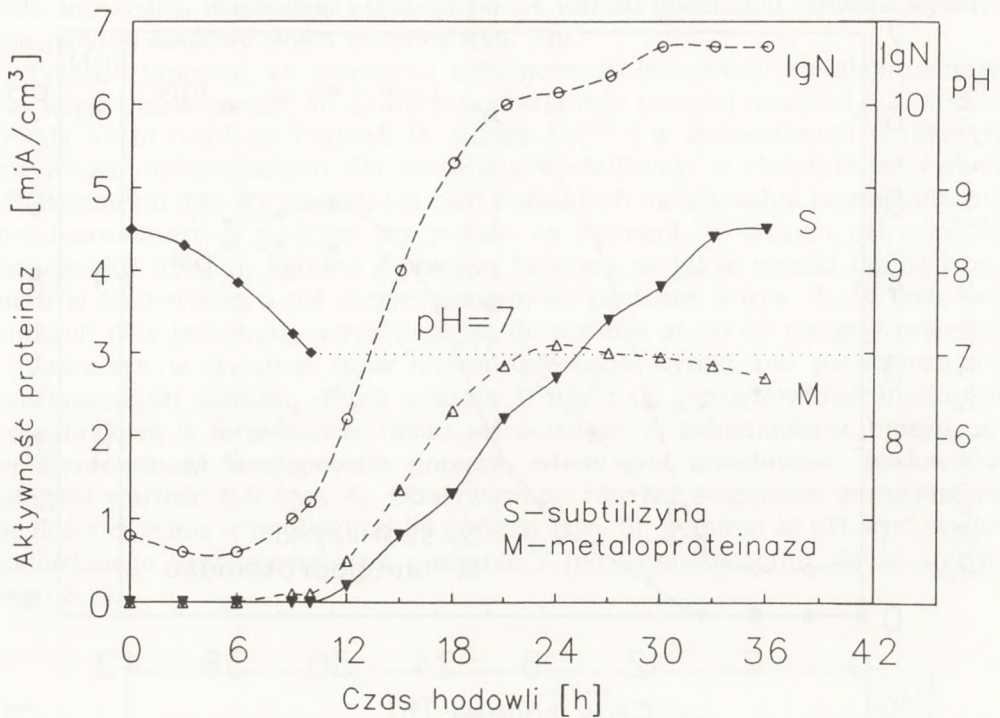
Rys. 5. Przebieg hodowli *B. subtilis* IBTC-3 w fermentorze w podłożu o pH regulowanym na poziomie 7.

Wykazano także, że przebieg hodowli bakterii *B. subtilis* IBTC-3 w fermentorach jest uzależniony od pH podłoża stosowanego do sporządzenia inokulum. Rezultaty hodowli w fermentorze w podłożu P o pH 7, zaszczerpionym inokulum o pH równym 8,5 przedstawiono na rys. 6. Zastosowanie takiego inokulum sprawiło, że przebieg tej hodowli podobny jest do hodowli w podłożu o pH startowym 8,5. W badaniach stwierdzono ponadto (dane nie publikowane), że pH podłoża używanych do sporządzania skosów stosowanych do przechowywania, a zwłaszcza uaktywniania bakterii w znacznej mierze rzutuje na zdolność *B. subtilis* IBTC-3 do wytwarzania subtilizyny i metaloproteiny.

Stąd należy przyjąć, że wpływ pH na regulację biosyntezy metaloproteiny jest bardziej złożony niż to pierwotnie zakładano.

4. Podsumowanie

W pracy ustalono, że optymalna temperatura hodowli bakterii *B. subtilis* IBTC-3 dla produkcji subtilizyny wynosi 30°C, metaloproteiny 27°C, natomiast α -amylazy i lipazy 33°C. Najlepszy wzrost bakterie wykazują w 33°C.



Rys. 6. Przebieg hodowli *B. subtilis* IBTC-3 w fermentorze w podłożu o pH startowym 7, zaszczipionym inokulum o pH 8,5.

Maksymalną biosyntezę subtilizyny i lipazy uzyskiwano, gdy wyjściowe pH pożywki było zbliżone do wartości 8,5. Przy pH 6,0 ilość metaloproteinazy nagromadzana w podłożu hodowlanym jest większa niż subtilizyny. W pożywce o odczynie obojętnym uzyskuje się maksymalną produkcję α -amylazy i najlepszy wzrost bakterii. W końcowych godzinach hodowli bakterii w fermentorze, w warunkach zapewniających najwyższą produkcję subtilizyny (pH wyjściowe inokulum i podłoża 8,5), zahamowaniu ulega biosynteza metaloproteinazy. Mechanizm wpływu pH na biosyntezę proteinaz nie jest w pełni jasny. Regulacja pH w trakcie hodowli w fermentorze na stałym poziomie nie sprzyja zwiększeniu biosyntezy tych enzymów.

Literatura

1. Priest F., (1987), *Wniekletochruje fermenty mikroorganizmow*, tłum. W. K. Plakunov. Moskwa „Mir”, 61.
2. Aunstrup K., (1979), *Appl. Biochem. Bioengin.*, 2, 27.
3. Jemceva T. W., Konovalov S. A., (1978), *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 14, 661.
4. Keay L., (1972), *Proc. IV IFS - Ferment. Technol. Today*. Kyoto, Japan, 289.

5. Prestidge L., Gage V., Spizzen J., (1971), *J. Bacteriol.*, 107, 815.
6. Heineken F. G., O'Connor R. I., (1972), *J. Gen. Microbiol.*, 73, 35.
7. Patent Nr 60 141 289, (1985), Japonia.
8. Egorov N. S., Vybornykh S. N., Loriya Z. K., (1983), *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 19, 733.
9. Patent Nr 3710 309, (1971), USA.
10. Kelly C. T., Nash A. M., Fogarty W. M., (1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 61.
11. Kitada M., Horikoshi K., (1976), *J. Ferment. Technol.*, 54, 579.
12. Patent Nr 3 827 938, (1974), USA.
13. Coleman G., (1967), *J. Gen. Microbiol.*, 49, 421.
14. Patent Nr 234 180, (1987), Czechosłowacja.
15. Patent Nr 48 2795, (1973), Japonia.
16. Anson M. L., (1939), *J. Gen. Physiol.*, 22, 79.
17. Stein J., (1961), *Biochemical Preparation*, 8, 27.
18. Ruban E. L., (1977), *Mikrobnuyje lipidy i lipazy*, Izd. Nauka, Moskwa, 83.
19. Loginova L. G., Gołowacheva R. S., Gołowina I. G., (1973), *Sovremennyye predstavlenia o termofilli mikroorganizmow*, Nauka, Moskwa, 165.
20. Votruba J., Pazlarova J., Dvorakova M., Vachova L., Strnadova M., Kucerova H., Vinter V., Zourabian R., Chaloupka J., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 352.
21. Markkanen P. H., Bailey M. I., (1974), *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 24, 93.
22. Frost G. M., Moss D. A., (1987), *Production of Enzyme by Fermentation*, in: *Biotechnology 7a*, Ed. Kennedy J. F., 44.
23. Ryu D. D. Y., Mandels M., (1980), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2, 91.
24. Dancer B. N., Mandelstam J., (1975), *J. Bacteriol.*, 121, 406.
25. Both G. W., McInnes J. L., Harilon J. E., May B. K., Elliot W. K., (1972), *J. Mol. Biol.*, 67, 199.

Effect of pH and temperature on biosynthesis of some exoenzymes of *Bacillus subtilis* IBTC-3

Summary

Effect of pH and temperature on biosynthesis of subtilisin, metalloproteinase, α -amylase and lipase by *B. subtilis* IBTC-3 were studied. The optimum temperatures for production of subtilisin, metalloproteinase and α -amylase or lipase were 30°C, 27°C and 33°C respectively. The optimum temperature for growth of bacteria was estimated to be 33°C. The optimum pH for production of subtilisin and lipase was 8,5, for metalloproteinase it was around 6,0. The highest production of α -amylase and growth of bacterium was observed at pH around 7,0. The mechanism of proteinases biosynthesis by pH regulation was studied. The maintenance of pH of the medium on the same level did not cause an increase in proteinases production.

Key words:

α -amylase, *Bacillus subtilis*, lipase, metalloproteinase, subtilisin.

Adres dla korespondencji:

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