

Wpłynęło 13.01.2012 r.
Zrecenzowano 27.03.2012 r.
Zaakceptowano 28.05.2012 r.

A – koncepcja
B – zestawienie danych
C – analizy statystyczne
D – interpretacja wyników
E – przygotowanie maszynopisu
F – przegląd literatury

CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI PROTEOLITYCZNYCH DWÓCH WYBRANYCH SZCZEPÓW BAKTERII Z RZĘDU *Myxococcales*

Urszula JANKIEWICZ¹⁾ AD, Anna KILISZCZYK²⁾ DEF,
Stefan RUSSEL²⁾ BF

¹⁾ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Katedra Biochemii

²⁾ Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach, Zakład Biologii Środowiska i Higienizacji Wsi

Streszczenie

Myksobakterie (rząd *Myxococcales*) należą do Gram-ujemnych bakterii, które stanowią ważny element mikroflory glebowej. W badaniach scharakteryzowano właściwości proteolityczne dwóch szczepów myksobakterii *Sorangium cellulosum* oraz *Archangium gephyra*. W doświadczeniach zoptymalizowano warunki hodowli oraz oznaczono dynamikę zmian w aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz syntetyzowanych przez badane szczepy bakterii. Ponadto, po wstępnym oczyszczeniu badanych enzymów, dokonano ich charakterystyki pod względem optimum temperatury oraz pH, wyznaczono termostabilność oraz reakcję na wybrane inhibitory diagnostyczne. Hodowle badanych organizmów prowadzono na pożywce płynnej CY. Aktywność proteaz wykrywano na zymogramach, po uprzednich natywnych rozdzielach elektroforetycznych w warunkach niedenaturujących.

Badania wykazały, że szczepy *Sorangium cellulosum* oraz *Archangium gephyra* są zdolne do syntezy proteaz zewnątrzkomórkowych o różnym poziomie aktywności oraz o różnych wartościach optimum temperatury i pH oraz termostabilności.

Słowa kluczowe: *Archangium gephyra*, myksobakterie, proteazy, *Sorangium cellulosum*

WSTĘP

Enzymy proteolityczne katalizują rozkładanie wiązań peptydowych w białkach. Obserwowane od wielu lat zainteresowanie mikroorganizmami wytwarzającymi proteazy związane jest z możliwością wszechstronnego wykorzystania tych enzy-

Adres do korespondencji: mgr A. Kiliszczyk, Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach, Zakład Biologii Środowiska i Higienizacji Wsi, al. Hrabaska 3, 05-090 Raszyn; tel. +48 22 628-47-63, e-mail: akiliszczyk@gmail.com

mów w dziedzinie biotechnologii, licznych gałęziach przemysłu oraz w rolnictwie. Długą historię ma wykorzystanie enzymów proteolitycznych w przemyśle spożywczym, garbarskim oraz w produkcji detergentów w zastępstwie, wcześniej stosowanych, substancji toksycznych.

Myksobakterie zaliczane są do bakterii z rzędu *Myxococcales*. Są to Gram-ujemne, bezwzględnie tlenowe pałeczki, które stanowią ważny element środowiska glebowego [REICHENBACH 2005]. Należą do organizmów wytwarzających liczne aktywne, wtórne metabolity, wykorzystywane głównie w przemyśle farmaceutycznym i agrochemicznym [DAWID 2000]. Bakterie te mogą służyć również jako bogate źródło różnorodnych enzymów. Enzymy proteolityczne są wytwarzane zarówno przez myksobakterie celulozowe (na przykład należące do rodzaju *Sorangium*), jak i drapieżne (należące do rodzaju *Myxococcus*) [KIM i in. 2009; SUDO, DWORKIN 1972; WHITAKER i in. 1965]. Drapieżne myksobakterie posiadają zdolność grupowego odżywiania się. Organizmy te wydzielają do środowiska enzymy bakteriolityczne, w tym egzopeptydazy, które uczestniczą w lizie komórek grzybów bakterii i alg [BULL i in.; 2002; SHETTY i in. 2000].

Zdolność myksobakterii do dezintegracji komórek mikroorganizmów jest znacząca ze względu na możliwość wykorzystania tych organizmów do walki z grzybami, powodującymi choroby roślin uprawnych, oraz innymi szkodliwymi drobnoustrojami, m.in. cyjanobakteriami [BULL i in. 2002; RASHIDAN, BIRD 2001]. Ponadto wykazano, że proteazy myksobakteryjne mogą mieć istotne znaczenie dla przemysłu spożywczego oraz farmaceutycznego, głównie jako leki wykorzystywane w leczeniu zaburzeń układu trawiennego [KIM i in. 2009].

Celem pracy było określenie dynamiki zmian w aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz dwóch szczepów myksobakterii *Sorangium cellulosum* oraz *Archangium gephyra*. Praca miała również na celu scharakteryzowanie badanych enzymów pod względem optimum temperatury i pH oraz wyznaczenie termostabilności i reakcji na wybrane inhibitory diagnostyczne.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał biologiczny. Materiał badawczy stanowiły dwa gatunki należące do *Myxococcales*: *Sorangium cellulosum* (szczep nr DSM 53200) oraz *Archangium gephyra* (szczep nr DSM 52591), pochodzące z kolekcji mikroorganizmów Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) w Braunschweig.

Hodowle prowadzono na pożywce płynnej CY o składzie: 0,3% casitone, 0,1% ekstrakt drożdżowy, 0,1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0. Hodowle bakterii prowadzono przez 4 dni w temperaturze 28°C, w łaźni wodnej z wytrząsaniem (120 rpm). Supernatant uzyskany po odwirowaniu hodowli (15 min przy 10 000 g, 4°C) i po przefiltrowaniu stanowił preparat wyjściowy do dalszych badań.

Oznaczanie aktywności proteazy. Aktywność proteolityczną oznaczano z użyciem azokazeiny (Sigma) jako substratu. Mieszanina inkubacyjna składała się z 300 μ l odpowiednio rozcieńczonego enzymu, do którego dodawano 300 μ l roztworu 1-procentowej azocaseiny w 100 mM buforze Tris-HCl o pH 6,8. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 60 min w temperaturze 40°C. Reakcję przerywano dodając 600 μ l 10% TCA. Mieszaninę odwirowywano i mierzono absorbancję przy 360 nm, względem próby kontrolnej. Następnie dokonywano wstępnego oczyszczania badanych egzoptydaz, syntetyzowanych przez *Sorangium cellulosum* oraz *Archangium gephyra*. Badane proteazy zostały częściowo oczyszczone za pomocą frakcjonowania siarczanem amonu: do supernatantu uzyskanego po odwirowaniu i przefiltrowaniu czterodniowych hodowli bakterii dodawano porcjami siarczan amonu, aż do uzyskania 30-procentowego nasycenia roztworu, odwirowywano przez 30 min przy 13 000 g, w temperaturze 4°C. Osad odrzucano, a supernatant wysalano do 85% i wirowano w podobnych warunkach, jak poprzednio. Uzyskany osad zawieszano w 20 mM buforu Tris-HCl o pH 6,8 i dializowano całą noc w takim samym buforze. Dializat zagęszczano 2-krotnie w komorze ultrafiltracyjnej firmy Amicon, z wykorzystaniem membrany PM10 i wykorzystywano do charakterystyki właściwości enzymu.

Wykrywanie aktywności enzymatycznej w żelu poliakryloamidowym. Elektroforezę substratową w warunkach niedenaturujących prowadzono wg procedury opisanej przez LAEMMLI [1970], z wykorzystaniem 10-procentowego rozdzielającego żelu poliakryloamidowego z dodatkiem 0,1% azokazeiny oraz 4-procentowego żelu zagęszczającego. Elektroforezę prowadzono w buforze Tris-Glicyna, o pH 8,3. Po zakończeniu rozdzielania elektroforetycznego żele poddano 60-minutowej inkubacji w 0,1 M buforze Tris-HCl o pH 6,8, w temperaturze 37°C. Następnie żele wybarwiano w 0,1% czerni amidowej. Po 1,5 h barwnik zlewano, a żele odbarwiano w 7-procentowym roztworze kwasu octowego. Jasne pasma na niebieskim tle wskazywały lokalizację na żelu aktywnych enzymów.

Wpływ temperatury na aktywność badanych proteaz. Mieszaninę inkubacyjną inkubowano przez 60 min w temperaturze: 25, 30, 40, 45, 50, 55 i 60°C. Oznaczenie aktywności i pomiar absorbancji prowadzono w podobny sposób, jak opisano wyżej.

Wyznaczanie termostabilności badanych proteaz. Roztwór enzymu preinkubowano w temperaturze: 30, 40, 45, 50, 55, 60 i 65°C przez 60 min. Następnie próby doprowadzono do temperatury 37°C, dodawano do substratu i oznaczano aktywność proteolityczną.

Wpływ pH na aktywność badanych proteaz. Badanie to przeprowadzono w zakresie pH od 4,0 do 11,5. Oznaczenia prowadzono z zastosowaniem buforu 0,12 M, uniwersalnego buforu Brittona i Robinsona dla pH w przedziale 4,5 do 9,5. Do reakcji stosowano substrat rozpuszczony w buforze o odpowiednim pH. Aktywność enzymatyczną oznaczano zgodnie z wcześniej podaną metodą.

Wpływ inhibitorów specyficznych na aktywność badanych proteaz. Do badań użyto inhibitorów: metalopeptydaz (EDTA, 1,10-fenantrolina), peptydaz serynowych (PMSF), cysteinowych (jodoacetamid) i aspartylowych (pepstatyna) w stężeniach: 1, 3 i 5 mM. Roztwór enzymu preinkubowano z inhibitorem 30 min w temperaturze 4°C. Aktywność enzymatyczną oznaczano zgodnie z wcześniej podaną metodą.

WYNIKI BADAŃ

Przeprowadzone badania wykazały, że badane szczepy dwóch gatunków mykobakterii *Sorangium cellulosum* oraz *Archangium gephyra* wydzielają zewnątrzkomórkowe proteazy. W hodowlach tych bakterii, prowadzonych na podłożach agarowych, zawierających świeże odtłuszczone mleko (20%), już po 40 h od momentu zaszczepienia bakterii wystąpiły wyraźne przejaśnienia (fot. 1).



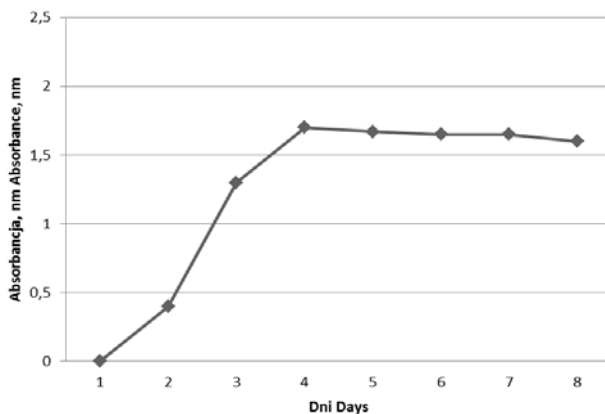
Fot. 1. Wzrost szczepów *Sorangium cellulosum* (S) oraz *Archangium gephyra* (A) na podłożu zawierającym mleko (fot. U. Jankiewicz)

Photo 1. Growth of *Sorangium cellulosum* (S) and *Archangium gephyra* (A) strains in the medium with milk (photo U. Jankiewicz)

W pożywkach płynnych największą aktywność zewnątrzkomórkowych proteaz zaobserwowano w czwartym dniu hodowli bakterii (rys. 1 i 2).

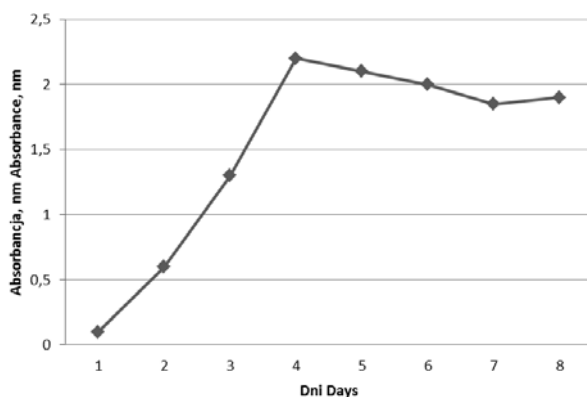
Po rozdiale elektroforetycznym preparatów enzymatycznych, uzyskanych z hodowli *Sorangium cellulosum* oraz *Archangium gephyra* w żelu poliakrylamidowym, z wbudowaną azokazeiną, zaobserwowano występowanie zróżnicowanych pasm aktywności. W przypadku szczepu *Sorangium cellulosum* zaobserwowano jedno pasmo aktywności o dużej intensywności, natomiast u *Archangium gephyra* wykryto dwa, mało intensywne pasma aktywności, położone niżej na żelu (fot. 2).

Największą aktywność proteazy szczepu bakterii *Sorangium cellulosum* zaobserwowano w pH 7,0 oraz w 55°C (rys. 3).



Rys. 1. Dynamika zmian aktywności proteolitycznej szczepu *Sorangium cellulosum*;
źródło: wyniki własne

Fig. 1. The dynamic of changes in the proteolytic activity of *Sorangium cellulosum* strain;
source: own studies

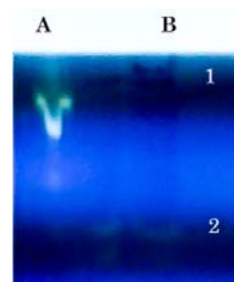


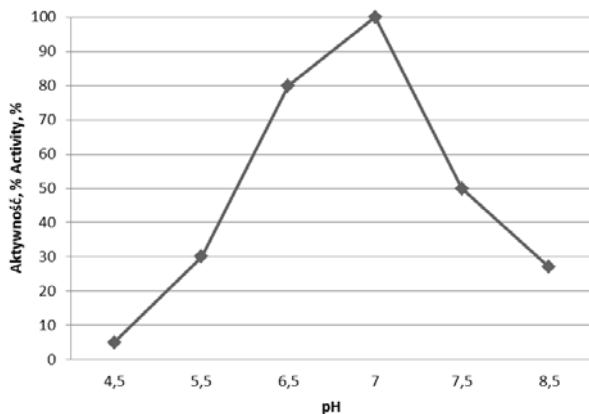
Rys. 2. Dynamika zmian aktywności proteolitycznej szczepu *Archangium gephyra*;
źródło: wyniki własne

Fig. 2. The dynamic changes in the proteolytic activity *Archangium gephyra* strain;
source: own studies

Fot. 2. Detekcja zewnątrzkomórkowych proteaz w supernatantach hodowli *Sorangium cellulosum* (ścieżka A) oraz *Archangium gephyra* (ścieżka B); 1 i 2 pasma aktywności egzopeptydaz (fot. U. Jankiewicz)

Photo 2. Detection of extracellular proteases in supernatants of *Sorangium cellulosum* (lane A) and *Archangium gephyra* (lane B) cultures, 1 and 2 – bands of exopeptidase activity (photo U. Jankiewicz)

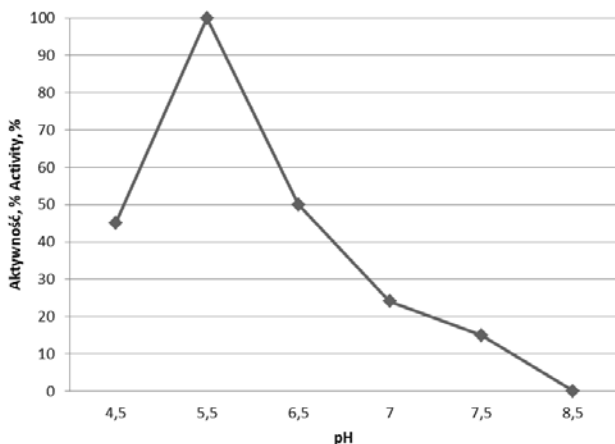




Rys. 3. Wpływ pH na aktywność proteazy wytwarzanej przez badany szczep *Sorangium cellulosum*; źródło: wyniki własne

Fig. 3. The effect of pH on the activity of protease produced by *Sorangium cellulosum* strain; source: own studies

Aktywność proteolityczna bakterii *Archangium gephyra* była największa w pH 5,5 oraz w 45°C (rys. 4).



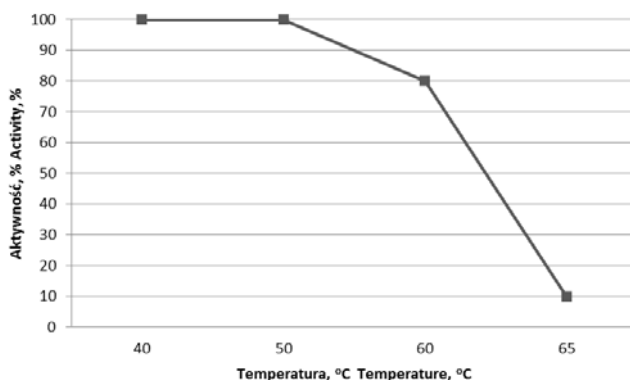
Rys. 4. Wpływ pH na aktywność proteazy wytwarzanej przez badany szczep *Archangium gephyra*; źródło: wyniki własne

Fig. 4. The effect of pH on the activity of protease produced by *Archangium gephyra* strain; source: own studies

Szczep *S. cellulosum* syntetyzował proteazę aktywną w szerokim zakresie temperaturowym, niewielkie odchylenia od temperatury optymalnej nie powodowały dużych zmian aktywności. Aktywność proteolityczna bakterii *A. gephyra* zmniejsza

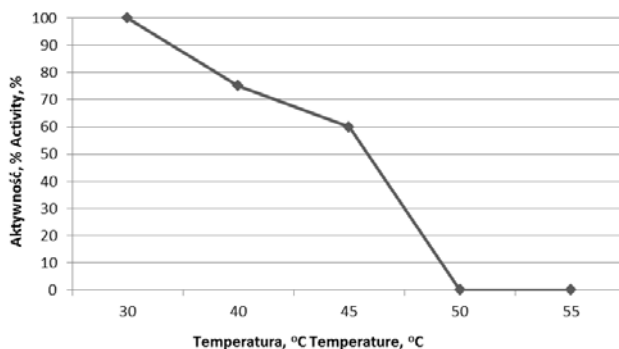
szła się znacznie po przekroczeniu temperatury optymalnej. Oba badane enzymy wykazywały aktywność w wąskich zakresach pH, zbliżonych do wartości optymalnych. Proteaza wydzielana przez bakterie *S. cellulosum* charakteryzowała się znaczną termostabilnością. Preinkubacja 60-minutowa enzymu w temperaturze 60°C spowodowała stratę 20% aktywności w stosunku do próby kontrolnej, nie poddanej preinkubacji (rys. 5).

Aktywność proteaz szczepu *A. gephyra* charakteryzowała się znacznie mniejszą stabilnością termiczną; 60-minutowa preinkubacja w 50°C preparatu enzymatycznego, uzyskanego z hodowli tych bakterii, spowodowała całkowitą utratę aktywności enzymatycznej (rys. 6).



Rys. 5. Termostabilność proteazy syntetyzowanej przez szczep *Sorangium cellulosum* po 1-godzinnej preinkubacji w podanych wartościach temperatur; źródło: wyniki własne

Fig. 5. Thermal stability of protease produced by *Sorangium cellulosum* after 1 hour pre-incubation at temperatures given in the graph; source: own studies



Rys. 6. Termostabilność proteazy syntetyzowanej przez szczep *Archangium gephyra* po 1-godzinnej preinkubacji w podanych wartościach temperatur; źródło: wyniki własne

Fig. 6. Thermal stability of protease produced by *Archangium gephyra* after 1 hour pre-incubation at temperatures given in the graph; source: own studies

Zbadano także wpływ inhibitorów diagnostycznych na aktywność proteaz badanych bakterii (tab. 1). Proteaza *S. cellulosum* wykazywała znaczny, 70-procentowy spadek aktywności enzymu w obecności DFP (diizopropylfosforanu), specyficznego inhibitora dla proteaz serynowych. Natomiast aktywność proteolityczna bakterii *A. gephyra* wykazywała całkowite zahamowanie w obecności 10 mM EDTA, inhibitora specyficznego dla metalopeptydaz. Inhibitor enzymów cysteinowych (jodoacetamid) oraz enzymów aspartylowych (pepstatyna) nie miały wpływu na aktywność badanych proteaz.

Tabela 1. Wpływ inhibitorów diagnostycznych na aktywność proteaz badanych bakterii

Table 1. The effect of diagnostic inhibitors on the activity of proteases in studied bacteria

| Inhibitor Inhibitor | Stężenie Concentration mM | Zachowana aktywność proteaz <i>S. cellulosum/A. gephyra</i> Retained protease activity <i>S. cellulosum/A. gephyra</i> % |
|----------------------------|---------------------------------|---|
| Kontrola Control | – | 100/100 |
| EDTA | 1 | 80/35 |
| | 10 | 80/0 |
| Pepstatyna Pepstatin | 1 | 100/100 |
| Jodoacetamid Iodoacetamide | 1 | 100/100 |
| | 3 | 100/100 |
| DFP | 0,01 | 30/100 |

Objaśnienia: EDTA – kwas edetynowy; DFP – diizopropylfluorofosforan.

Explanations: EDTA – ethylenediaminetetraacetate, DFP – diisopropylfluorophosphate.

Źródło: wyniki własne. Source: own studies.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Proteazy zewnątrzkomórkowe są enzymami spełniającymi bardzo ważne funkcje dla syntetyzujących je bakterii. Zasadniczą rolą tych enzymów jest rozkład wielkocząsteczkowych substancji białkowych do łatwo przyswajalnych peptydów i aminokwasów, będących substratem energetycznym dla bakterii. Mikroorganizmy syntetyzują enzymy proteolityczne o zróżnicowanych właściwościach, co zapewnia im łatwą adaptację do warunków środowiska. Proteazy syntetyzowane przez *Sorangium cellulosum* oraz *Archangium gephyra* charakteryzowały się także odmiennymi właściwościami. Peptydaza szczepu *S. cellulosum* okazała się być enzymem termostabilnym, w przeciwieństwie do proteaz szczepu *A. gephyra*. Wiele enzymów proteolitycznych, syntetyzowanych przez bakterie, charakteryzuje się dużą termostabilnością; jest to cecha pozwalająca na efektywne wykorzystywanie tych enzymów w biotechnologii. Termostabilne enzymy są często spotykane u bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas* [GUPTA i in. 2005; OLAJUYIGBE, AJELE

2008]. Termostabilne peptydazy są często syntetyzowane przez szczepy bakterii odpowiedzialne za psucie produktów spożywczych [KOHLMANN i in. 1991]. Enzymy proteolityczne wydzielane przez mikroorganizmy cechują się dużą zmiennością optymalnej wartości pH. Z przeprowadzonych badań wynika, że bakterie *S. cellulosum* wydzielają proteazę kwaśną, a *A. gephyra* neutralną. Z badań przeprowadzonych przez KIM i in. [2009] wynika, że proteazy bakterii z rodzaju *Myxococcus* zwykle są aktywne w szerokim zakresie od 5,0 do 10 pH. Na podstawie wyników badań aktywności proteolitycznej w obecności inhibitorów diagnostycznych można wnioskować, że proteazy *S. cellulosum* należą do enzymów serynowych, a proteazy *A. gephyra* do metaloproteaz. Zdecydowana większość proteaz bakteryjnych to metalopeptydazy [GUPTA i in. 2002; JANKIEWICZ, BIELAWSKI 2003], pozostałe typy katalityczne występują w mniejszości.

WNIOSKI

1. Badane szczepy *Sorangium cellulosum* oraz *Archangium gephyra* wykazywały zdolność do syntezy zewnątrzkomórkowych proteaz o różnej lokalizacji na zymogramach.

2. Szczep *Archangium gephyra* wykazał się wyższym poziomem aktywności proteolitycznej. Najwyższy poziom aktywności proteolitycznej dwa szczepy wykazywały po czterech dniach hodowli.

3. Proteazy syntetyzowane przez szczep *Sorangium cellulosum* charakteryzowały się wyższym optimum temperatury oraz większą termostabilnością w porównaniu z proteazami, syntetyzowanymi przez szczep *Archangium gephyra*.

4. Proteazy wytwarzane przez *Sorangium cellulosum* miały wyższe optimum pH niż proteazy wytwarzane przez *Archangium gephyra*.

5. Bakterie *Sorangium cellulosum* syntetyzują proteazy serynowe, o czym świadczy zahamowanie aktywności proteolitycznej pod wpływem 1 mM DFP.

6. Bakterie *Archangium gephyra* wydzielają metaloproteazy, o czym świadczy całkowite zahamowanie aktywności proteolitycznej pod wpływem EDTA.

LITERATURA

- BULL C.T., SHETTY K.G., SUBBARAO K.V. 2002. Interactions between myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. *Plant Disease*. Vol. 86 s. 889–896.
- DAWID W. 2000. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 24 s. 403–427.
- GUPTA R., BEG Q.K., LORENZ P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Applied Microbiology Biotechnology*. Vol. 59 s. 15–32.
- GUPTA A., ROY I., KHARE S.K., GUPTA M.N. 2005. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1069 s. 155–161.

- JANKIEWICZ U., BIELAWSKI W. 2003. The properties and functions of bacterial aminopeptidases. *Acta Microbiologica Polonica*. Vol. 52 s. 217–231.
- KIM J., CHUNG J., CHO K., YONGSUB Y. 2009. Isolation and Characterization of Myxobacteria with Proteolytic Activity. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 37. No. 3 s. 183–188.
- KOHLMANN K.L., NIELSEN S.S., LADISCH M.R. 1991. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *Journal of Dairy Science*. Vol. 74 s. 4125–4136.
- LAEMMLI U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Vol. 227(259) s. 680–685.
- OLAJUYIGBE M.F., AJELE J.O. 2008. Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* LBBL-11 isolated from “iru”, a traditionally fermented African locust bean condiment. *African Journal of Biochemistry Research*. Vol. 2 (10) s. 206–210.
- RASHIDAN K. K., BIRD D.F. 2001. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microbial Ecology*. Vol. 41 s. 97–105.
- REICHENBACH H. 2005. Order *Myxococcales*. W: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Wyd. 2. Pr. zbior. Red. D. Brenner, J. N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity. Vol. 2. Part C. Springer s. 1059–1144.
- SUDO S., DWORKIN M. 1972. Bacteriolytic Enzymes Produced by *Myxococcus Xanthus*. *American Society for Microbiology*. Vol. 110. No. 1 s. 236–245.
- SHETTY K.G., SUBBARAO K.V., BULL C.T. 2000. Effects of myxobacteria on plant pathogenic fungi and biocontrol agents. *Phytopathology*. Vol. 90 s. 72.
- WHITAKER D.R., ROY C., TSAI C.S., JURÁŠEK L. 1965. Lytic enzymes of *Sporangium* sp.: a comparison of the proteolytic properties of the α - and β -lytic proteases. *Canadian Journal of Biochemistry*. Vol. 43. No. 12 s. 265–219.

Urszula JANKIEWICZ, Anna KILISZCZYK, Stefan RUSSEL

CHARACTERISTICS OF THE PROTEOLYTIC PROPERTIES OF TWO SELECTED STRAINS OF *Myxococcales* BACTERIA

Key words: *Archangium gephyra*, myxobacteria, proteases, *Sorangium cellulosum*

S u m m a r y

Myxobacteria (order *Myxococcales*) belong to Gram-negative bacteria which are important component of soil microflora. In the present study the proteolytic properties of two myxobacterial strains *Sorangium cellulosum* and *Archangium gephyra* were characterised. In the performed experiments, culture conditions were optimised and the dynamics of changes in the activity of extracellular proteases synthesized by these bacteria was determined. Moreover, after the pretreatment of enzymes, they were characterised in terms of optimum temperature and pH. Their thermal stability and response to selected diagnostic inhibitors were also determined. Protease activity was detected with gelatin zymography after electrophoretic separation at non-denaturing conditions.

The study showed that the *Sorangium cellulosum* and *Archangium gephyra* strains were capable of synthesizing extracellular protease of different activity and different values of optimum temperature, pH and thermal stability.

Do cytowania For citation: Jankiewicz U., Kiliszczyk A., Russel S. 2012. Charakterystyka właściwości proteolitycznych dwóch wybranych szczepów bakterii z rzędu *Myxococcales*. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*. T. 12. Z. 3 (39) s. 53–62.