

ANNA TRUSEK-HOŁOWNIA  
ADAM SKRZYPIŃSKI

Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

## Produkcja enzymów proteolitycznych przez *Bacillus licheniformis*

### Wprowadzenie

Bakterie należące do rodzaju *Bacillus* odgrywają kluczową rolę w przemyśle enzymatycznym. Z ich udziałem powstaje blisko 25% światowej produkcji komercyjnych biokatalizatorów [1]. Spośród cech, które sprawiają, że mikroorganizmy te są chętnie wykorzystywane przez firmy biotechnologiczne należy wymienić dużą szybkość wzrostu i zdolność do nadprodukcji i wydzielania wielu aktywnych białek na zewnątrz komórki, których ilość może dochodzić do 25g/l. Kolejną zaletą to brak toksyczności i patogeniczności tych szczepów, którym Amerykańska Komisja Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*) nadała status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) [2, 3].

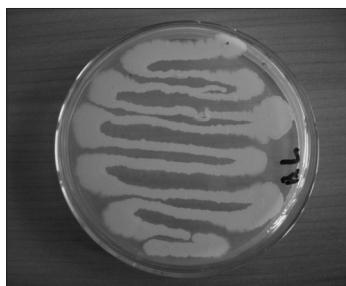
Najważniejsze handlowe enzymy wytwarzane przez szczep z rodzaju *Bacillus* to alkaliczne serynowe proteazy (subtylizyny), obojętne proteazy oraz  $\alpha$ -amylaza [4]. Rolę proteaz na rynku biokatalizatorów oddaje fakt, że ich udział w globalnej produkcji preparatów enzymatycznych wynosi 60–65%, z czego zdecydowaną większość stanowią proteazy alkaliczne [5]. Szczepy o największym znaczeniu w biosyntezie enzymów proteolitycznych należą do gatunków *B. licheniformis*, *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* [6].

W pracy przedstawiono wstępne wyniki badań uzyskane w hodowli *B. licheniformis*, które stanowią bazę do zaprojektowania procesu prowadzonego w bioreaktorze membranowym.

### Wyniki i ich omówienie

W przemysłowej praktyce optymalizacja procesu wytwarzania enzymów prowadzona jest w kilku etapach. Etap pierwszy obejmuje znalezienie odpowiednich źródeł węgla i azotu oraz ustalenie proporcji niezbędnych soli mineralnych, które dodatkowo mają mieć zdolność buforowania roztworu (produkcji proteaz często towarzyszy tendencja do zakwaszenia środowiska). Następnym etapem jest wyznaczenie czynników fizycznych panujących w reaktorze, takich jak temperatura, pH, sposób i stopień napowietrzenia oraz mieszania. Etap ostatni obejmuje określenie trybu pracy bioreaktora.

W pracy wykorzystano szczep *B. licheniformis* PCM 1847 (Rys. 1) pochodzący z kolekcji IiITD PAN we Wrocławiu. Zastosowano pożywkę mineralną złożoną z następujących soli:



Rys. 1. Szczep *B. licheniformis*

$MgSO_4$  0,3g/l,  $CaCl_2$  0,7g/l,  $NaCl$  1g/l,  $KH_2PO_4$  1g/l [7]. Dodatkowo stosowano zmienne źródło węgla i azotu.

Do popularnych źródeł azotu stosowanych przy mikrobiologicznej produkcji enzymów należą m.in. kazeina, mąka sojowa, namok kukurydziany i różnorakie peptony. Stosowane są także związki nieorganiczne, głównie sole amonowe, jednakże w kilku pracach wykazano represję syntezy enzymów przez tego typu łatwo metabolizowane źródła azotu [8]. Stwierdzono także inhibicję produkcji proteaz przez glicynę.

W hodowli *B. licheniformis* jako źródło azotu stosowano, w szerokim zakresie stężeń, kazeinę, pepton oraz siarczan amonu. Szczególnie interesujące wyniki uzyskano stosując kazeinę oraz siarczan amonu. Wraz ze wzrostem stężenia  $(NH_4)_2SO_4$  zaobserwowano nieznaczny wzrost przyrostu biomasy i białka całkowitego, natomiast istotny przyrost proteolitycznej aktywności właściwej. Przy definicji jednostki aktywności (U), jako takiej ilości proteaz, która w czasie 60 s powoduje w warunkach testu *Kunitza* (pH 10, 37°C, 2% r-r kazeiny) przyrost absorbancji w odciańczaku przy 280 nm o 0,01 jednostki, maksymalna aktywność właściwa uzyskana z hodowli okresowych wzrasta z wartości 3,9 U/g przy  $c_{(NH_4)_2SO_4} = 1$  g/l do 115,6 U/g przy  $c_{(NH_4)_2SO_4} = 30$  g/l i przy stałych pozostałych parametrach hodowli. W przypadku stosowania kazeiny przyrost biomasy i białka całkowitego linowo wzrasta wraz ze wzrostem stężenia początkowego kazeiny, niemniej proteolityczna aktywność właściwa jest wyższa w hodowlach przy niższym początkowym stężeniu kazeiny (Rys. 2).



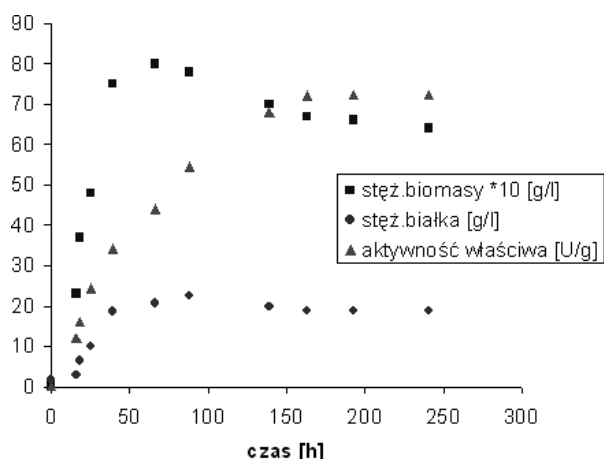
Rys. 2. Wpływ początkowego stężenia kazeiny na maksymalną wartość proteolitycznej aktywności właściwej uzyskanej w trakcie hodowli okresowej

Należy zauważyć, że kazeina stanowi nie tylko źródło azotu, ale i węgla. A jak wskazują doniesienia literaturowe w wysokich stężeniach często dochodzi do represji katabolicznej i zahamowania sekrecji proteaz [9]. Potwierdziły to dane

uzyskane z hodowli *B.licheniformis* przy różnym początkowym stężeniu glukozy. Dlatego też stężenie węglowodanów zwykle utrzymywane jest na niskim poziomie (<4 g/l) i dodawane są one do medium produkcyjnego w sposób ciągły lub porcjami, uzupełniając wyczerpywane składniki [10].

Dla mezofilnych szczepów *Bacillus* optymalne temperatury prowadzenia procesu produkcji proteaz mieszczą się w zakresie od 30° do 40°C, choć dla gatunków termofilnych mogą sięgać do 60°C. Wartość pH, w większości przypadków, powinno być zbliżone do obojętnego, a dla szczepów alkalofilnych – do zasadowego. Dla wykorzystywanego szczepu *B. licheniformis* optymalne warunki wzrostu i produkcji proteaz ustalono na 40°C i pH 7.0. W celu uzyskania efektywnej produkcji proteaz ważne jest także zapewnienie odpowiedniej ilości rozpuszczonego w podłożu tlenu. Osiąga się to stosując napowietrzanie, zazwyczaj w zakresie 0,7–1,0 vvm [3, 10]. Jak pokazały dane z hodowli *B. licheniformis* umiarkowane obroty wytrząsarki sprzyjają produkcji aktywnego białka. Maksymalna wartość proteolitycznej aktywności właściwej wyniosła 8,8 U/g w hodowli okresowej niewytrząsanej i wzrastała do wartości 31,7 przy 50 obr./min. i do 58,6 przy 100 obr./min. Przy wyższych obrotach (150–300 obr./min.) wartość ta systematycznie już spadała (12,8 U/g przy 300 obr./min.). Wysoka wydajność produkcji aktywnego białka została zachowana w przypadku mieszania hodowli przez pompę cyrkulującą (w zakresie 12,5–34,2 ml/s).

Zauważalny jest ścisły związek pomiędzy wytwarzaniem proteaz przez *Bacillus*, a fazą wzrostu tych bakterii. Z reguły znaczące wydzielanie zewnątrzkomórkowych enzymów rozpoczyna się w momencie przejściowym pomiędzy fazą wzrostu eksponencjalnego a fazą stacjonarną [11,12]. Potwierdziły to dane uzyskane dla hodowli *B. licheniformis* (Rys. 3).



Rys. 3. Zmiana stężenia biomasy i produkowanego białka całkowitego oraz aktywności właściwej w trakcie hodowli okresowej prowadzonej przy stężeniu początkowym kazeiny 9 g/l

Wydzielanie zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych jest często skorelowane ze sporulacją komórek, choć rola proteaz w tym procesie nie jest do końca poznana [13]. W badaniach nad nieprzetwarzającymi mutantami *Bacillus* sp., stwierdzono pięciokrotny wzrost wydajności enzymów oraz dłuższy czas ich sekrecji [14]. Zaobserwowano także, że w przypadku szczepów, u których produkcja enzymów rozpoczynała się w środku fazy wzrostu wykładniczego, po osiągnięciu przez nie maksimum aktywności, następowała ich szybka autodeaktywacja [13].

### Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych hodowli *B. licheniformis* ustalono, że intensywna produkcja enzymów proteolitycznych, o zdefiniowanych w elektroforezie masach cząsteczkowych na 14 i 19 kDa, zachodzi w hodowlach przy niskim stężeniu kazeiny ( $\leq 3$  g/l) lub niskim stężeniu glukozy ( $\leq 4$  g/l) połączonym z wysokim ( $\geq 15$  g/l) stężeniem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Szczep rośnie i wytwarza najintensywniej produkty w 40°C i w pH 7.0, przy umiarkowanym mieszaniu poprzez wytrząsanie lub pompę cyrkulacyjną. Powyższe warunki wskazują, iż przeprowadzenie procesu wytwarzania proteaz w bioreaktorze membranowym z membraną zatrzymującą komórki i nieprzeagowany substrat a przepuszczającą powstałe o niskich masach cząsteczkowych proteazy, może prowadzić do intensyfikacji procesu. Najwięcej wątpliwości budzi zmienność stopnia produkcji aktywnych białek w poszczególnych fazach wzrostu komórek. Otwarte pozostaje pytanie, Czy wysokie stężenie komórek inicjuje produkcję aktywnych białek?

### LITERATURA

1. H.S. Joo, G. Kumar, P.G.C. Gun-Chun, K.T. Kim: Process Biochem. 38, 155 (2002).
2. M. Schallmey, A. Singh, O.P. Ward: Can. J. Microbiol. 50, 1 (2004).
3. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska: Mikrobiologia techniczna, WN PWN, Warszawa 2008.
4. P. Çalik, T.H. Özdamar: Biochem. Eng. J. 8, 61 (2001).
5. H. Gençal, C. Tarib: Enzyme Microb. Tech. 39, 703 (2006).
6. R. Gupta, Q.K. Beg, S. Khan, B. Chauhan: Appl. Microbiol. Biot. 60, 381 (2002).
7. S.S. Mabrouk, A.M. Hashem, N.M.A. El-Shayeb: Bioresource. Technol. 69, 155 (1999).
8. J. Frankena, H.W. van Verseveld, A.H. Stouthamer: Appl. Microbiol. Biot. 22, 16 (1985).
9. M.M. Kole, I. Draper, D.F. Gerson: J. Chem. Technol. Biot. 41, 197 (1988).
10. G. Kumar, H. Takagi: Biotechnol. Adv. 17, 561 (1999).
11. F.G. Priest: Bacteriological Rev. 41, 711 (1977).
12. M.A. Strauch, J.A. Hoch: Mol. Microbiol. 7, 337 (1993).
13. I.M. Chu, C. Lee, T.S. Li: Enzyme Microb. Tech. 14, 755 (1992).
14. B.L. Zamost, Q.I. Brantley, D.D. Elm: J. Ind. Microbiol. Biot. 5, 303 (1990).