

URSZULA JANKIEWICZ

WPLYW WARUNKÓW HODOWLI  
NA POZIOM AKTYWNOŚCI ENDOPEPTYDAZY  
SYNTETYZOWANEJ PRZEZ GLEBOWE BAKTERIE  
*Pseudomonas fluorescens*

EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON THE LEVEL  
OF ENDOPEPTIDASE ACTIVITY BY SOIL BACTERIA  
*Pseudomonas fluorescens*

Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii SGGW

*Summary:* This paper characterizes in biochemical sense a bacteria strain isolated from the soil, identified as *Pseudomonas fluorescens*. It has been affirmed that this strain in experimental conditions synthesizes extracellular endopeptidase, which is an inductive enzyme. High activity of this enzyme appears along with the presence of peptide substrate in soil. Adding of the ions  $\text{Ca}^{2+}$  into the nutrient causes an increase in endopeptidase activity. Inorganic sources of carbon and nitrogen in the substrate significantly decrease the level of enzymatic activity. Substantial inhibition of this enzyme's synthesis was observed in presence of the glucose (concentration greater than 1%) in the culture medium. Endopeptidase activity remained constant in the wide range of pH (6,5–8,0). The highest enzymatic activity was detected after 36 hours of bacteria breeding in the temperature of 25°C. The highest enzymatic activity was observed in the late log phase of bacteria growth and the early stationary phase. Based on zymogram, the presence of one band of the endopeptidase activity was affirmed, that is synthesized extracellularly by this strain.

*Słowa kluczowe:* peptydaza zewnątrzkomórkowa, endopeptydaza, *Pseudomonas fluorescens*.

*Key words:* extracellular peptidase, endopeptidase, *Pseudomonas fluorescens*.

## WSTĘP

Peptydazy są to enzymy z klasy hydrolaz występujące u wszystkich organizmów żywych i uczestniczące w szeregu niezbędnych dla życia procesów fizjologicznych i biochemicznych. Białka jako podstawowe składniki komórkowe są rozkładane z udziałem enzymów proteolitycznych wewnątrzkomórkowych oraz syntetyzowane wciąż na nowo.

W zależności od położenia w łańcuchu białkowym rozkładanego wiązania peptydowego wyróżnia się egzopeptydazy i endopeptydazy. Zaliczane do egzopeptydaz aminopeptydazy i karboksypeptydazy rozkładają wiązania peptydowe skrajnie położone, odpowiednio z N- lub C-końca łańcucha polipeptydowego. W odróżnieniu od nich endopeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe położone wewnątrz łańcucha polipeptydowego. Enzymy te klasyfikuje się zazwyczaj na podstawie ich katalitycznego działania i budowy centrum aktywnego wyróżniając: peptydazy serynowe, cysteinowe, metalopeptydazy oraz nieopisane dotychczas u bakterii peptydazy aspartylowe [Barrett i in. 1998].

Mikroorganizmy zdolne są do syntezy enzymów proteolitycznych zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i zewnątrzkomórkowych. Peptydazy wewnątrzkomórkowe są ważne ze względu na wewnątrzkomórkowy obrót białkowy. Enzymy zewnątrzkomórkowe są odpowiedzialne za rozkład białek w środowisku bytowania mikroorganizmów. Niskocząsteczkowe produkty reakcji katalizowanych przez te enzymy mogą przenikać przez błonę komórkową i stanowią dla mikroorganizmów źródło energii. Zewnątrzkomórkowe peptydazy ze względu na swoje właściwości i łatwość pozyskiwania znalazły zastosowanie m.in. w przemyśle chemicznym, spożywczym i paszowym. Dlatego intensywne badania nad właściwościami oraz regulacją biosyntezy tych enzymów wynikają z potrzeb praktycznych

U bakterii z rodzaju *Pseudomonas* stwierdzono obecność wewnątrzkomórkowych aminopeptydaz, karboksypetydaz oraz endopeptydaz [Levy, Goldman 1967; Jankiewicz, Bielawski 2002ab; Korza, Bochtler 2005]. Pozakomórkowo bakterie z tego rodzaju syntetyzują przede wszystkim endopeptydazy. Znanych jest kilka psychrofilnych szczepów z gatunku *P. fluorescens*, które powodują psucie się produktów mlecznych i mięsnych [Schokker, van Boekel 1997; Burger i in. 2000]. W literaturze naukowej natomiast niewiele miejsca poświęca się endopeptydazom syntetyzowanym przez bakterie glebowe, chociaż te enzymy odgrywają istotną rolę w rozkładzie występujących w ich środowisku resztek białkowych. W ten sposób wzbogacają one glebę w cenne składniki. Wyizolowany szczep bakterii jest ciekawym obiektem badań, ponieważ ma także zdolność do intensywnej syntezy piowerdyny – sideroforu, chelatu żelaza [Jankiewicz 2006].

Celem badań w prezentowanej pracy było zbadanie wpływu niektórych warunków hodowli na poziom zewnątrzkomórkowej endopeptydazy syntetyzowanej przez szczep *P. fluorescens*.

## METODYKA BADAŃ

### 1. Materiał biologiczny

Materiałem badawczym był izolat z gleby, gatunku bakterii *Pseudomonas fluorescens*.

TABELA 1. Wybrane cechy morfologiczne i biochemiczne szczepu bakterii

Pałeczki Gram	–
Opis kolonii	drobne, śluzowate barwy żółto-miodowej
Katalaza	+
Oksydaza	+
Utlenianie podłoża Hugh-Leifsona	+
Fermentacja w podłożu Hugh-Leifsona	–
Rozkład azotanów (V) do azotanów (III)	–
Rozkład cytrynianów na podłożu Simmonsa	+
Wzrost w temp. 4°C	–
Wzrost w temp. 37°C	+
Wzrost w temp. 42°C	–

Identyfikację drobnoustrojów przeprowadzono na podstawie klasycznych testów biochemicznych (katalaza, oksydaza) i testów Microgen (UK) obejmujących 24 cechy biochemiczne (tab. 1) oraz analizy mikroskopowej.

## 2. Warunki hodowli bakterii i skład stosowanych pożywek

Do przechowywania i namnażania bakterii wykorzystywano podłoże King B. We wszystkich doświadczeniach hodowle bakterii prowadzono w kolbach o pojemności 250 cm<sup>3</sup> zawierających 50 cm<sup>3</sup> podłoża.

Hodowlę bakterii prowadzono w większości doświadczeń przez 36 godzin w temperaturze 25°C z ciągłym wstrząsaniem (150 cykli na minutę). Po tym czasie płyn pohodowlany odwirowywano, osad komórek odrzucano, w uzyskanym supernatancie oznaczano aktywność endopeptydazy. W doświadczeniach, w których badano zależność poziomu aktywności endopeptydazy od czasu hodowli, pobierano sterylnie, co 12 godzin po 3 cm<sup>3</sup> płynnej kultury bakteryjnej w celu wykonania oznaczeń.

W większości doświadczeń bakterie hodowano na pożywce podstawowej: mineralnej o składzie: 0,03% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,03% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,05% NaCl, 0,0015% FeCl<sub>3</sub> wzbogaconej 1,50% tryptonu i 0,25% ekstraktu drożdżowego, odczyn pożywki doprowadzano do pH 7,0 przed autoklawowaniem przez dodanie odpowiedniej ilości 1 M NaOH.

W doświadczeniach, w których badano zmiany w poziomie aktywności endopeptydazy w zależności od odczynu podłoża, pH pożywki podstawowej doprowadzano do wymaganego za pomocą 1 M NaOH lub 1 M HCl. W doświadczeniach, w których badano wpływ składników podłoża hodowlanego na poziom uzyskiwanej aktywności, stosowano w składzie pożywki podstawowej zamiast tryptonu inne substraty pokarmowe. Odczyn pożywki doprowadzano do pH 7,0 dodając 1 M HCl lub NaOH. W doświadczeniach, w których badano wpływ glukozy lub soli nieorganicznych na poziom aktywności endopeptydazy, do pożywki podstawowej dodawano odpowiednie ilości

roztworu glukozy lub soli nieorganicznych. Roztwory glukozy i soli nieorganicznych sterylizowano poprzez filtrację i dodawano do wysterylizowanej uprzednio pożywki podstawowej. Wszystkie podłoża bakteryjne przygotowywano na wodzie dejonizowanej i sterylizowano w autoklawie przez 17 minut w temp. 121°C.

Aktywność wzrostu bakterii określano na podstawie wzrostu gęstości optycznej pożywek ( $OD_{600\text{ nm}}$ ).

### 3. Oznaczenia enzymatyczne

Aktywność endopeptydazy oznaczano w obecności jako substratu 1% roztworu azokazeiny w 100 mM buforze Tris-HCl o pH 7,0. Inkubację prowadzono 60 minut w 37°C. Reakcję przerywano stosując 10% TCA. Absorbancję mierzono przy długości fali 360 nm. Jako jednostkę aktywności przyjęto absorbancję przeliczoną na 1 cm<sup>3</sup> płynu pohodowlanego ( $A_{360}$ ). Jako produktywność endopeptydazy badanego szczepu określano stosunek wartości  $A_{360}/OD_{600}$ .

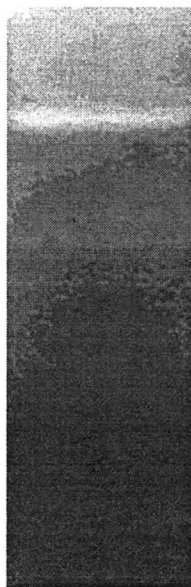
### 4. Zymogramy

Zymogramy uzyskiwano po elektroforetycznym rozdziale białek płynu pohodowlanego zgodnie z procedurą opisaną przez Laemmli [1970]. Elektroforezę natywną prowadzono na 10% żelu poliakryloamidowym z unieruchomioną 0,1% hemoglobina. Po rozdziale elektroforetycznym żele inkubowano w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 7,0 przez 20 minut w temperaturze 37°C, wybarwiano je w 0,1% czerni amidowej, a następnie płukano w 7% kwasie octowym. Aktywność proteolityczną wykrywano na podstawie obecności jasnych (niezabarwionych pasm) na niebieskim tle żelu.

Wszystkie wyniki o charakterze liczbowym prezentowane w tej pracy stanowią średnią z trzech niezależnych powtórzeń, błąd średni, oznaczający maksymalne względne odchylenie wyników pomiarów od średniej, nie przekraczał 7%.

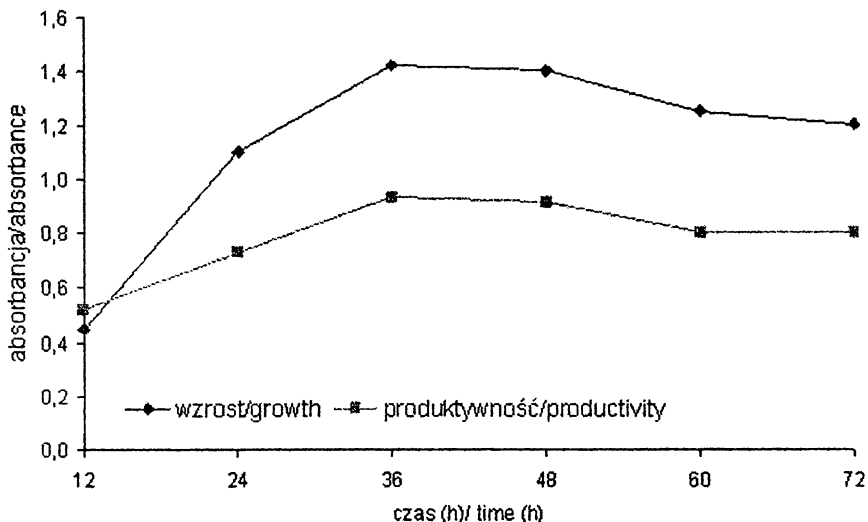
## WYNIKI BADAŃ

Po rozdziale elektroforetycznym białek płynu pohodowlanego uzyskanego po 36-godzinnej hodowli bakterii na pożywce podstawowej na zymogramie widoczne było jedno pasmo aktywności enzymatycznej. Miejsce hydrolizy hemoglobiny wyznaczał prążek widoczny na żelu w postaci przejaśnienia (fot. 1). Pozwala to sądzić, że badany szczep w warunkach doświadczeń syntetyzował jedno zewnątrzkomórkowe białko o aktywności endopeptydazowej. Zymogramy



pasma aktywności  
endopeptydazy  
band of endopeptidase  
activity

FOTOGRAFIA 1. Zymogram płynu pohodowlanego  
PHOTO 1. Zymogram of cell-free culture supernatant



RYSUNEK 1. Wzrost bakterii i produktywność endopeptydazy uzyskiwane na pożywce podstawowej w temperaturze 25°C

FIGURE 1. Growth and productivity of endopeptidase in basal medium at 25°C

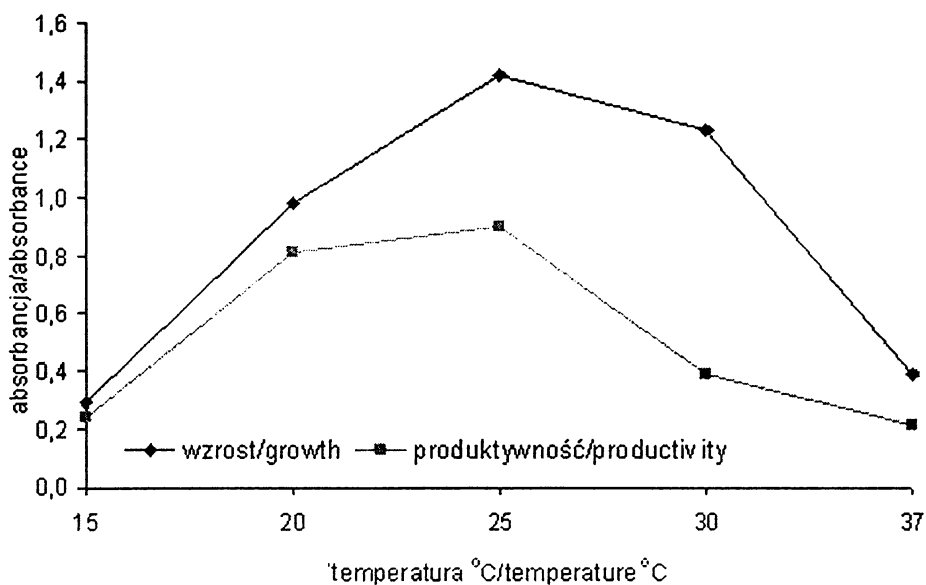
uzyskiwane po rozdzielach elektroforetycznych płynów hodowlanych z pozostałych doświadczeń prezentowały taki sam obraz jak na fotografii 1, dlatego nie umieszczono ich w pracy.

Aktywność endopeptydazy w płynie pohodowlanym wykrywano już w 12. godzinie hodowli bakterii, jednak najwyższa produktywność tego enzymu pojawiała się w pożywce w 36. godzinie hodowli (rys. 1). W dalszym czasie hodowli produktywność utrzymywała się niemalże na stałym poziomie, wykazując niewielki spadek po 60 godzinach hodowli.

Temperatura hodowli okazała się również istotnym czynnikiem wpływającym na poziom oznaczanej aktywności. Produktywność endopeptydazy w płynie pohodowlanym była najwyższa w hodowlach bakterii prowadzonych w temperaturze 25°C (rys. 2). Niższy o około 30% poziom produktywności uzyskiwano w hodowlach prowadzonych w temperaturze 30°C i 37°C. Podobnie, podczas hodowli bakterii w temperaturze niższej niż 25°C uzyskiwano mniejszą produktywność tego enzymu.

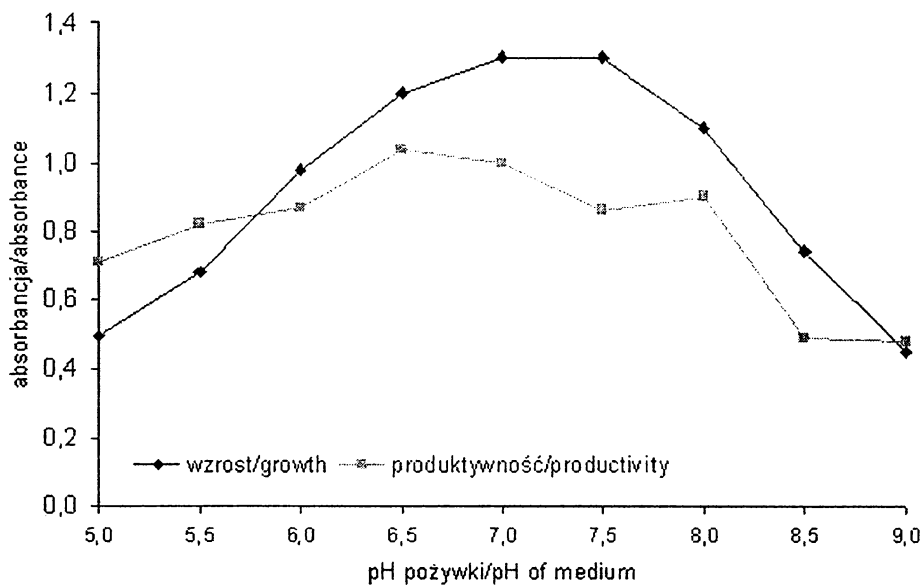
Badany szczep bakterii wykazywał zdolność do wzrostu i syntezy enzymu w szerokim zakresie pH (5,0–9,0), jednak najwyższą produktywność enzymu uzyskiwano w pH 6,5–7,0 (rys. 3). Prawie trzykrotnie niższą aktywność endopeptydazy uzyskiwano w hodowlach bakterii na pożywkach o skrajnych wartościach pH: 9,0 i 5,0.

W doświadczeniu, w którym badano zależność aktywności endopeptydazy od składu podłoża hodowlanego, zastąpiono w podłożu podstawowym trypton poprzez inne składniki organiczne oraz nieorganiczne (tab. 2). Najwyższą aktywność endopeptydazy uzyskiwano podczas hodowli bakterii na pożywkach, gdzie źródłem węgla i azotu były związki organiczne, takie jak: trypton, bulion odżywczy, pepton sojowy czy hydrolizat kazeiny, chociaż tu także obserwowano zróżnicowanie w poziomie



RYSUNEK 2. Wpływ temperatury hodowli bakterii na produktywność endopeptydazy (kultury bakterii hodowano 36 h na pożywce podstawowej)

FIGURE 2. Effect of temperature of bacterial culture on productivity of endopeptidase (bacterial culture was cultivated 36 h on the basal medium)



RYSUNEK 3. Wpływ pH pożywki hodowlanej na produktywność endopeptydazy

FIGURE 3. Effect of pH of culture medium on productivity of endopeptidase

TABELA 2. Wpływ składu podłoża hodowlanego na poziom aktywności endopeptydazy u badanego szczepu

TABLE 2. Effect of composition of culture medium on endopeptidase activity of the studied strains

Składnik pożywki Component of medium	Stężenie Concentration [%]	Aktywność Activity	Wzrost Growth	Produktywność Productivity
Pożywka podstawowa Basal medium*		1,25±0,088	1,35 ±0,095	0,93 ±0,066
Trypton – Tryptone	0,50	0,88 ± 0,062	1,00 ± 0,070	0,88 ± 0,062
Bulion odżywczy Nutrient broth	0,50 1,50	0,50 ± 0,035 0,90 ± 0,063	1,00±0,070 1,30±0,091	0,50±0,035 0,69±0,048
Pepton sojowy Soy peptone	0,50 1,50	1,00±0,070 1,10±0,077	1,18±0,083 1,23±0,086	0,85±0,060 0,89±0,062
Hydrolizat kazeiny Casamino acid	0,50 1,50	1,30±0,091 1,80±0,126	1,56±0,109 1,60±0,112	0,83±0,058 1,12±0,079
Mieszanina aminokwasów** Mixture of amino acids**	0,45 1,50	0,03±0,002 0,05±0,004	0,49±0,035 0,57±0,040	0,06±0,004 0,09±0,006
Glicerol Glycerol	0,50 1,50	0,10±0,007 0,17±0,012	0,90±0,063 0,90±0,063	0,11±0,008 0,19±0,013
Bursztynian sodu Sodium succinate	0,50 1,50	0,05±0,035 0,04±0,028	0,38±0,026 0,49±0,034	0,11±0,008 0,09±0,006
Cytrynian sodu Sodium citrate	0,50 1,50	0,02±0,001 0,03±0,002	0,45±0,031 0,5±0,035	0,04±0,003 0,06±0,004

\*1,5% trypton został zastąpiony w pożywce przez wymienione w tabeli 2 składniki; \*1.5% tryptone in the basal medium was substituted with components from Table 2; \*\*w skład mieszaniny wchodziły: Ala, Cys, Gly każdy o końcowym stężeniu 0,15% i 0,50%; \*\*amino acid mixture consisted of Ala, Cys, Gly in concentration 0.15% and 0.50% each of them

aktywności zależności od stężenia składnika i jego rodzaju. Najlepszym składnikiem pożywki podstawowej, w którego obecności uzyskiwano najwyższą aktywność badanego enzymu był hydrolizat kazeiny w stężeniu 1,5%.

Interesujących wyników dostarczyły hodowle bakterii na pożywkach zawierających mieszaninę aminokwasów. W płynie po hodowaniu uzyskiwano wówczas jedynie niewielki poziom badanej aktywności, pomimo dość intensywnego wzrostu bakterii. Podobne zjawisko obserwowano na pożywkach z glicerolem, na których aktywność endopeptydazy była kilkanaście razy niższa w porównaniu z wynikami uzyskiwanymi na pożywkach podstawowych pomimo niewielkich różnic w tempie wzrostu bakterii na obu tych podłożach.

Poziom aktywności endopeptydazy był wyjątkowo niski w hodowlach bakterii w pożywkach podstawowych, w których trypton zastąpiono przez nieorganiczne składniki, takie jak: cytrynian sodu czy bursztynian sodu. Zbadano także, czy poziom aktywności endopeptydazy jest zależny od jonów  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . Obecność w pożywce hodowlanej 0,25% chlorku wapnia spowodowała ok. 20% wzrost poziomu aktywności endopeptydazowej, natomiast 0,25% siarczan(VI) magnezu obniżył jej poziom radykalnie (tab. 3).

TABELA 3. Wpływ chlorku wapnia i siarczanu magnezu na poziom aktywności endopeptydazy  
TABLE 3. Effect of calcium chloride and magnesium sulfate on endopeptidase activity

Dodawana sól Salt added	Stężenie Concentration [%]	Aktywność Activity (A360)	Wzrost Growth	Produktywność Productivity
Pożywka podstawowa Basal medium	–	1,25±0,088	1,35±0,095	0,93±0,066
CaCl <sub>2</sub>	0,25	1,49±0,105	1,30±0,091	1,16±0,081
MgSO <sub>4</sub>	0,25	0,50±0,035	1,00±0,070	0,50±0,035

Obecność glukozy w podstawowym podłożu hodowlanym również spowodowała zmiany w poziomie aktywności badanego enzymu (tab. 4). Niskie stężenie (0,5%) tego cukru stymulowało wzrost i syntezę enzymu, wyższe stężenia powodowały znaczne obniżenie aktywności enzymatycznej przy zachowaniu intensywnego wzrostu bakterii.

## DYSKUSJA

W pracy wyizolowano ze środowiska glebowego szczep bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Na podstawie jego cech biochemicznych i morfologicznych sklasyfikowano go jako *Pseudomonas fluorescens*. Stwierdzono, że ten szczep w zastosowanych warunkach hodowli syntetyzuje pozakomórkową endopeptydazę. Większość z dotychczas opisanych szczepów *P. fluorescens* wyizolowanych z różnych środowisk syntetyzuje jedno zewnątrzkomórkowe białko enzymatyczne o aktywności endopeptydazy. Wykazano, że enzym ten ma zwykle zbliżone właściwości u różnych szczepów *P. fluorescens* [Kohlmann i in. 1991; Hellio i in. 1993; Liao, Mc Callus 1998; Koka, Weimer 2000]. Rajmohan i in. [2002] stwierdzili jednak w płynie pohodowlanym u kilku izolatów z gatunku *P. fluorescens* obecność na zymogramach jeszcze innych

TABELA 4. Wpływ stężenia glukozy na poziom aktywności endopeptydazy  
TABLE 4. Effect of glucose concentration of endopeptidase activity

Stężenie glukozy Glucose concentration [%]	Aktywność Activity	Wzrost Growth	Produktywność Productivity
Pożywka podstawowa Basal medium	1,25±0,088	1,35±0,095	0,93±0,066
0,50	1,38±0,097	1,40±0,098	0,99±0,069
1,00	0,69±0,048	1,52±0,106	0,45±0,032
1,50	0,21±0,015	1,52±0,106	0,14±0,009
2,00	0,20±0,014	1,45±0,102	0,14±0,009
2,50	0,11±0,008	1,45±0,102	0,08±0,006
3,00	0,10±0,007	1,39±0,098	0,07±0,005



pasem o mniejszej aktywności. W niniejszej pracy na zymogramach uzyskiwano pojedyncze pasmo aktywności endopeptydazy, co pozwala stwierdzić, że ten szczep syntetyzuje tylko jedną zewnątrzkomórkową endopeptydazę.

Niewielką aktywność w płynie pohodowlanym wykrywano już we wczesnej fazie logarytmicznej wzrostu, znaczący wzrost aktywności obserwowano w późnej fazie logarytmicznej i wczesnej stacjonarnej fazie wzrostu. Podobne wyniki uzyskali Hellio i in. [1993] oraz Nicodeme i in. [2005] w badaniach nad syntezą endopeptydaz przez szczepy *P. fluorescens*.

W pracy stwierdzono wyraźną zależność poziomu oznaczanej w podłożu hodowlanym aktywności endopeptydazy od temperatury oraz składu i wartości pH podłoża hodowlanego, jak też od czasu trwania hodowli bakterii.

Synteza pozakomórkowych peptydaz przez mikroorganizmy może być indukowana w obecności w podłożu hodowlanym substratu białkowego, może także zależeć od wielu innych czynników, m.in. łatwo przyswajalnych źródeł azotu, łatwo metabolizowanych cukrów czy stosunku C/N w podłożu hodowlanym. Znane są także enzymy konstytutywne, syntetyzowane przez mikroorganizmy niezależnie od składu podłoża hodowlanego.

Wyniki badań wskazujące na ścisłą zależność pomiędzy poziomem aktywności endopeptydazy oznaczanej w podłożu hodowlanym a składem pożywek hodowlanych mogą świadczyć o indukcyjnym charakterze badanego enzymu. Organiczne, peptydowe składniki pożywek stymulowały syntezę enzymu, natomiast nieorganiczne źródła węgla i azotu powodowały znaczne jej ograniczenie. Wobec braku induktora w pożywce, a więc obecności niebiałkowych źródeł węgla i azotu obserwowano jedynie śladową aktywność endopeptydazy. Podobne wyniki w badaniach nad endopeptydazami bakterii *Pseudomonas* otrzymali m.in. Malik i in. [1985] oraz Rahman i in. [2005]. Natomiast Whooley i in. [1983] stwierdzili, że u *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 synteza zewnątrzkomórkowej endopeptydazy ma charakter w dużej mierze konstytutywny.

Niską aktywność tego enzymu obserwowaną w obecności mieszaniny aminokwasów jako źródła węgla i azotu można tłumaczyć represją syntezy enzymu w obecności jego końcowego produktu. W skład mieszaniny wchodziły takie aminokwasy, jak: alanina, cysteina, i glicyna. Podobne doświadczenia wykonane przez Rahman i in. [2005] wskazują, że szczególnie silnym represorem syntezy zewnątrzkomórkowej endopeptydazy u *P. aeruginosa* jest właśnie glicyna i cysteina.

Induktorem endopeptydaz syntetyzowanych przez niektóre szczepy *Pseudomonas* mogą być jony wapnia [Nicodeme i in. 2005]. Potwierdziły to także wyniki badań przeprowadzone w ramach tej pracy, gdzie również po wzbogaceniu podłoża podstawowego w jony wapnia uzyskano wzrost poziomu aktywności. Natomiast w przypadku dodania do podstawowej pożywki hodowlanej jonów magnezu obserwowano znaczne zahamowanie aktywności, co potwierdziło wyniki badań przeprowadzonych przez Malik i in. [1985], ale jest sprzeczne z wynikami uzyskanymi przez Rahman i in. [2005]. Wyniki te są trudne do interpretacji, ponieważ jony  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  mogły wpływać na aktywność samego enzymu, a nie na tempo jego biosyntezy.

W obecności glukozy w pożywce podstawowej zaobserwowano zmiany w poziomie aktywności endopeptydazy. Niższe stężenia tego cukru (0,5%) w znacznym stopniu stymulowały wydzielanie peptydazy. W obecności wyższych stężeń glukozy obserwowano

obniżenie aktywności tego enzymu pomimo intensywnego wzrostu bakterii. Zjawisko represji syntezy peptydaz w obecności glukozy jest opisane także dla szczepu *Pseudomonas* sp. B-25, *Ps. fluorescens* CM 12 [Malik i in. 1985; Al.-Salech, Zahran 1997].

Aktywność endopeptydazy wykrywano w szerokim zakresie pH zastosowanego podłoża hodowlanego (pH 5,0–9,0), przy czym najwyższą aktywność uzyskiwano w podłożach o odczynie zbliżonym do obojętnego (pH 6,5–7,0). Podobne wyniki zostały uzyskane u *Ps. fluorescens* CM 12 oraz *Ps. fragi* [Al.-Salech, Zahran 1997; Myhara, Skura 1990]. W przeprowadzonych badaniach obserwowano wyraźną zależność poziomu aktywności enzymatycznej od temperatury hodowli. Bakterie intensywnie syntetyzowały badaną endopeptydazę w temperaturze 25°C. W niższych i w wyższych niż 25°C temperaturach hodowli uzyskiwano znacznie mniejszą produktywność enzymu. Wydaje się, że niewielkie wymagania tego szczepu bakterii względem niektórych warunków środowiskowych, tzn. odczynu środowiska oraz niezbyt wysokiej temperatury, w której intensywnie wydzielają enzym, jest ich doskonałym przystosowaniem do życia w glebie. Mikroorganizmy syntetyzujące peptydazy spełniają wyjątkowo istotne funkcje, ze względu na udział w rozkładzie obficie występujących w glebie wielu resztek białkowych.

## WNIOSKI

1. Wyizolowany z gleby szczep *Pseudomonas fluorescens* jest zdolny do syntezy pozakomórkowej endopeptydazy.
2. Najwyższa aktywność endopeptydazy w podłożu hodowlanym pojawiała się w 36. godz. hodowli, w późnej fazie logarytmicznej i wczesnej fazie stacjonarnej wzrostu bakterii.
3. Optymalną temperaturą hodowli bakterii, przy której uzyskiwano najwyższy poziom aktywności badanej endopeptydazy, było 25°C.
4. Najwyższą aktywność endopeptydazy uzyskiwano w pożywkach o odczynie zbliżonym do obojętnego.
5. Synteza pozakomórkowej endopeptydazy przez badany szczep podlega indukcji przez składniki peptydowe obecne w podłożu hodowlanym.
6. Represja kataboliczna wywołana obecnością glukozy lub niektórych aminokwasów jest jednym z mechanizmów regulujących syntezę tego enzymu.

## LITERATURA

- AL.-SALECH A., ZAHARAN A. 1997: Protease production by *Pseudomonas fluorescens* CM12 isolated from raw milk. *Egyptian J. Dairy Sci.* **25**: 327–336.
- BARRETT A.J., RAWLINGS N.D., WOESSNER J.F. 1998: Handbook of proteolytic enzymes. London: Academic Press (wydanie CD).
- BURGER M., WOODS G., MCCARTHY C., BEACHAM I. R. 2000: Temperature regulation of protease in *Pseudomonas fluorescens* LS107d2 by an ECF sigma factor and a transmembrane activator. *Microbiology* **146**: 3149–3155.

- CHESSA J.P., PETRESCU I., BENTAHIR M., VAN BEEUMEN J., GERDAY C. 2000: Purification, physico-chemical characterization and sequence of a heat labile alkaline metalloprotease isolated from a psychrophilic *Pseudomonas* species. *Biochim. Biophys. Acta* **1479**: 265–274.
- HELLIO F.C., ORANGE N., GUESPIN-MICHEL J.F. 1993: Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MF0, in the presence of various inducers. *Res. Microbiol.* **144**: 617–625.
- JANKIEWICZ U. 2006: Synteza sideroforów przez glebowe bakterie z rodzaju *Pseudomonas* w zmiennych warunkach hodowli. *Acta Sci. Polon. Agricultura* **5**: 33–44.
- JANKIEWICZ U., BIELAWSKI W. 2002 a: Purification and properties of phenylalanyl aminopeptidase synthesized by *Pseudomonas* sp. *J. Basic Microbiol.* **42**: 260–267.
- JANKIEWICZ U., BIELAWSKI W. 2002 b: Regulation of the activity of intracellular alanylaminopeptidase synthesized by *Pseudomonas* sp. *Folia Microbiol.* **47**: 230–234.
- KOHLMANN K.L., NIELSEN S.S., LADISCH M. 1991: Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *J. Dairy Sci.* **74**: 4125–4136.
- KOKA R., WEIMER B.C. 2000: Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *J. App. Microbiol.* **89**: 280–288.
- KORZA H.J., BOCHTLER M. 2005: *P. aeruginosa* LD-carboxypeptidase: a serine peptidase with a Ser-His-Glu triad and a nucleophilic elbow. *Biol. Chem.* **280**: 40802–40812.
- LAEMMLI U.K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- LEVY C.C., GOLDMAN P. 1967: The enzymatic hydrolysis of methotrexate and folic acid. *J Biol. Chem.* **242**(12): 2933–2938.
- LIAO CHING-HSING, McCALLUS D. E. 1998: Biochemical and Genetic Characterization of an Extracellular Protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 914–921.
- MALIK R.K., PRASAD R., MATUR D.K. 1985: Effect of some nutritional and environmental factors on extracellular protease production by *Pseudomonas* sp. B-25. *Le Lait* **65**: 169–183.
- MYHARA R. M., SKURA B. 1990: Centroid search optimization of cultural conditions affecting the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fragi* ATCC 4973. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 4: 530–538.
- NICODEME M., GRILL J.P., HUMBERT G., GAILLARD J.L. 2005: Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *Enzyme Microbiol. Technol.* **36**: 749–757.
- RAHMAN R.N.Z.R.A., GEOK L.P., BASRI M., SALLEH A.B. 2005: An organic solvent tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K, nutritional factor affecting protease. *Enz. Microbiol. Tech.* **36**: 749–757.
- RAJMOHAN S., DODD C. E. R., WAITES W. M. 2002: Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Ingenta Connect* **93**,2: 205–213.
- SCHOKKER E. P., VAN BOEKEL M. A. J. 1997: Production, purification and partial characterization of extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22 F. *Int. Dairy J.* **7**: 265–271.
- WHOOLEY M., O'CALLAGHAN J., McLOUGHLIN A. J. 1983: Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *J. General Microbiol.* **129**: 981–988.