



## Wpływ źródła węgla na indukowanie biosyntezy amylaz przez *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus amylovorus*

Krystyna J. Zielińska, Krystyna M. Stecka, Roman A. Grzybowski, Alina M. Suterska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa

### Effect of carbon source on inducing biosynthesis of amylases by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus amylovorus*

#### Summary

We studied the effect of polysaccharides: native and soluble potato starch, amylopectin, amylose, dextrin and maltodextrin, disugars – maltose, saccharose and lactose, and of simple sugars – glucose, mannose and xylose on intensity of biosynthesis amylases, being expressed as an activity of alpha-amylase and glucoamylase, contained in the liquid after cultivation of bacteria strains: *Lactobacillus plantarum* K, *Lactobacillus plantarum* C and *Lactobacillus amylovorus*. It was found that native and soluble potato starch, being used as the only source of carbon in culture medium, stimulated the process of amylases biosynthesis by the examined bacterial strains. The highest level of alpha-amylase activity, equal to 13-14 JA and of glucoamylase – 0,37-0,39 JGA in 1 ml of post-cultivation liquid was obtained after 72 h of cultivation of *Lactobacillus plantarum* K and *Lactobacillus plantarum* C when the native potato starch was the only source of carbon in medium. *Lactobacillus amylovorus* strain synthesised amylases with the highest level of alpha-amylase activity, amounting to 17 JA and glucoamylase – 0,24 JGA/ml of post-cultivation liquid, after 72 h of cultivation when the potato starch was the only carbon source in the medium. On the other hand, when the native potato starch was used, the activity of alpha-amylase was equal to 9 JA and that of glucoamylase 0,09 JGA in 1 ml of post-cultivation liquid. The amolytic activity in post-cultivation liquids was increased to smaller extent when the carbon source in culture of the examined bacterial strains was dextrin, maltodextrin, saccharose, maltose or mannose.

#### Adres do korespondencji

Krystyna Zielińska,  
Zakład Technologii  
Fermentacji,  
Instytut Biotechnologii  
Przemysłu  
Rolno-Spożywczego,  
ul. Rakowiecka 36,  
02-532 Warszawa;  
e-mail:  
zielinska@ibprs.pl,

**biotechnologia**

4 (63) 182–193 2003

#### Key words:

*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus amylovorus*, enzymes, biosynthesis, amylases.

## 1. Wprowadzenie

Metabolizm węglowodanów przez bakterie fermentacji mlekowej może przebiegać na drodze kilku szlaków, dlatego między innymi te mikroorganizmy wykazują zdolności adaptacyjne do zmieniających się warunków środowiska. Stosunkowo niedawno poznana cecha niektórych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, polegająca na zdolności wykorzystywania skrobi skleikowanej i natywnej, jest uwarunkowana możliwością biosyntezy specyficznych enzymów amylolitycznych. Jednak bakterie fermentacji mlekowej bardzo rzadko charakteryzują się zdolnością do fermentacji natywnej skrobi. Wykryto nieliczne szczepy, izolowane z przewodu pokarmowego, w tym ze żwacza zwierząt, które mogą hydrolizować natywną skrobię zbożową (1,2).

Większość scharakteryzowanych amylaz, wytwarzanych przez niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej, należy do enzymów wydzielanych przez komórki bakterii do podłoża hodowlanego. Ilość wydzielanych amylaz zależy od fazy rozwoju komórek bakterii amylolitycznych, warunków ich hodowli oraz źródła węgla w podłożu hodowlanym (2). Sacharydy i polisacharydy, obecne w środowisku hodowlanym bakterii fermentacji mlekowej, mogą nie tylko stanowić substraty w reakcjach enzymatycznych, ale również mogą indukować biosyntezę enzymów amylolitycznych lub ulegać biokonwersji do innych związków polisacharydowych (3).

Do roku 1980 scharakteryzowano i opisano wiele szczepów bakterii fermentacji mlekowej z rodzajów: *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*, wytwarzających amylazy hydrolizujące skrobię skleikowaną (4).

W ostatnich 20 latach wyizolowano i scharakteryzowano kilka szczepów bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus*, wytwarzających amylazy zdolne do hydrolizy natywnej skrobi kukurydzianej i natywnej skrobi z manioku. Szczepy te należą do gatunków: *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* oraz *Lactobacillus manihotivorans* (1,5-10).

W wydaniu systematyki mikroorganizmów Bergeya (11) z roku 1986 po raz pierwszy podano charakterystykę bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus amylophilus* i *Lactobacillus amylovorus*, w tym opisano zdolności tych gatunków bakterii do wytwarzania amylaz hydrolizujących natywną skrobię kukurydzianą.

Amylolityczne bakterie fermentacji mlekowej, takie jak *Lactobacillus amylovorus* i *Lactobacillus amylophilus*, w stacjonarnej fazie wzrostu, wytwarzają najwyższe aktywności alfa-amylazy w podłożu zawierającym skrobię kukurydzianą jako jedyne źródło węgla. Wiadomo, że maltoza jest optymalnym źródłem węgla dla biosyntezy alfa-amylazy przez szczep *Lactobacillus amylovorus*, a sacharoza jest optymalnym dla biosyntezy alfa-amylazy przez szczep *Lactobacillus amylophilus*; zastosowanie glukozy hamuje biosyntezę amylaz przez omawiane gatunki bakterii (2).

Enzymy amylolityczne, biosyntetyzowane przez niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej, mogą być wydzielane do podłoża hodowlanego przez: *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus amylophilus* i *Lactobacillus plantarum* A-6, *Lactococcus lactis*

(12,13), lub należą do enzymów wewnątrzkomórkowych (szczyepy bakterii fermentacji mlekowej izolowane z przewodu pokarmowego) (14,15).

Cotta (15), badając optymalne warunki hodowli bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych ze żwacza, stwierdził, że zależnie od składu pożywki amylazy były związane z komórkami bakterii lub wydzielane do cieczy hodowlanej.

Na podstawie wyników badań nad indukowaniem biosyntezy amylaz przez *Lactobacillus amylovorus* i *Lactobacillus amylophilus* stwierdzono, że zawartość skrobi kukurydzianej w środowisku hodowlanym pobudza wytwarzanie amylazy przez oba gatunki bakterii, natomiast inne cukry proste, dwucukry, polisacharydy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego w różnym stopniu indukują lub hamują ich wytwarzanie (2).

Celem pracy było określenie wpływu różnych węglowodanów stanowiących jedyną źródło węgla w podłożu hodowlanym na wzrost bakterii fermentacji mlekowej i biosyntezę enzymów amylolitycznych. Do badań wybrano szczepy wyizolowane i scharakteryzowane przez autorów pracy: *Lactobacillus plantarum* K, *Lactobacillus plantarum* C i dla porównania amylolityczny szczep *Lactobacillus amylovorus* z kolekcji DSM. Wybrane szczepy charakteryzują się zdolnością do szybkiego namnażania biomasy i biosyntezy amylaz i wykazujące przy tym aktywność antybakteryjną (1,10,16,17).

W ostatnich latach obserwuje się gwałtowny rozwój badań nad bakteriami fermentacji mlekowej i bardzo szybki postęp wiedzy o ich fizjologii, metabolizmie oraz genetyce. Dzięki wynikom tych prac próbuje się udoskonalić dotychczasowe sposoby wykorzystania bakterii fermentacji mlekowej oraz wskazać nowe obszary ich zastosowań w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, w rolnictwie, a nawet w przemyśle chemicznym do rozkładu tworzyw biodegradowalnych.

## 2. Materiał i metody badań

### 2.1. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej

Do badań użyto szczepy bakterii charakteryzujące się zdolnością do biosyntezy amylaz:

- *Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p (16),
- *Lactobacillus plantarum* C KKP/788/p (17),
- *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531.

### 2.2. Podłoże hodowlane do badania fermentacji węglowodanów

Bakterie hodowano w ciekłym podłożu MRS (18) zawierającym, jako źródło węgla glukozę lub w miejsce glukozy następujące węglowodany: natywną skrobię ziem-

niaczaną, skrobię rozpuszczalną Zulkowskiego (firmy Fluka BioChemika), amylozę, dekstrynę, amylopektynę, maltodekstrynę, maltozę, sacharozę, laktozę, D-ksylozę (firmy SIGMA), stosowane podobnie jak glukoza w ilości 2% w stosunku do objętości podłoża.

### 2.3. Warunki hodowli bakterii

Bakterie hodowano w kolbach o pojemności 100 cm<sup>3</sup>, w termostacie przy stałej temperaturze 37°C, w warunkach względnie beztlenowych. Czas hodowli wynosił 72 h.

### 2.4. Metody badań

#### 2.4.1. Oznaczanie liczby bakterii (j.t.k.) – metodą płytkową (19)

Liczbę jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) bakterii fermentacji mlekowej (zawartych w 1 ml hodowli), oznaczano metodą dziesięciokrotnych rozcieńczeń i wysiewu kolejnych rozcieńczeń na płytce Petriego zawierające podłoże MRS (18) zestawione agarom z dodatkiem 0,01% purpury bromokrezolowej, stanowiącej wskaźnik zmiany pH podłoża.

#### 2.4.2. Sposób przygotowania cieczy pohodowlanej do oznaczania aktywności enzymów amylolitycznych

Po zakończeniu hodowli bakterie odwirowywano przy zastosowaniu wirówki przepływowej Alfa Laval o szybkości obrotów 16 000/min. Ciecz pohodowlaną przeznaczoną do oznaczania aktywności enzymów oczyszczano dwustopniowo, wstępnie metodą mikrofiltracji, przy zastosowaniu kolejno filtrów Pall-Filtron (typ HT – 0,45 µm i 0,20 µm) i użyciu aparatu do ultrafiltracji Mini-Ultralab firmy Pall-Filtron, przy ciśnieniu roboczym pompy około 10 psi (0,069 MPa).

Drugi etap przygotowania cieczy pohodowlanej, wstępnie poddanej procesowi mikrofiltracji, do oznaczania aktywności amylaz stanowiła dializa. Proces dializy prowadzono przy użyciu selektywnych błon celulozowych (firmy SIGMA), które przepuszczają cząsteczki o ciężarze poniżej, a zatrzymują powyżej 12 kDa. Po napełnieniu woreczków celulozowych cieczą pohodowlaną, zanurzano je w przepływowym naczyniu wypełnionym wodą destylowaną, stosując przemywanie wodą przez 24 h. W ten sposób ciecz pohodowlaną zawartą w woreczkach oczyszczano od niewykorzystanych składników podłoża oraz wytworzonych przez bakterie niskocząsteczkowych metabolitów w tym kwasów organicznych.

### 2.4.3. Oznaczanie aktywności alfa-amylazy metodą kolorymetryczną (6,7,20)

Alfa-amylaza (1,4-alfa-D-glukan-glukanohydrolaza) EC 3.2.1.1., wytwarzana przez mikroorganizmy, hydrolizuje wiązania 1,4-alfa-D-glikozydowe w polisacharydach.

Zasada metody oznaczania aktywności alfa-amylazy polega na enzymatycznej hydrolizie rozpuszczalnej skrobi ziemniaczanej Zulkowskiego do dekstryn i spektrofotometrycznym pomiarze intensywności wybarwienia próbki pod wpływem działania jodu, przy długości fali 620 nm.

Za jednostkę aktywności alfa-amylazy (A) przyjęto ilość enzymu, która w czasie 30 minut w warunkach oznaczenia rozkłada 10 mg skrobi Zulkowskiego do dekstryn.

### 2.4.4. Oznaczanie aktywności glukoamylazy metodą kolorymetryczną (21)

Glukoamylaza (1,4-alfa-D-glukan-glukozohydrolaza) EC 3.2.1.3. wytwarzana przez mikroorganizmy, hydrolizuje wiązania 1,4-alfa- i 1,6-alfa-glikozydowe w polisacharydach.

Zasada metody oznaczania aktywności glukoamylazy polega na określeniu stężenia glukozy powstałej z hydrolizowanej skrobi. Glukoza wytwarzana pod wpływem oksydazy glukozowej, przechodzi w glukonian z wydzieleniem nadtlenu wodoru, następnie glukonian w reakcji z fenolem i 4-feniloantypiryną, pod wpływem peroksydazy, przechodzi w fenazon o czerwonym zabarwieniu. Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do zawartości glukozy.

Za jednostkę aktywności glukoamylazy GA przyjęto ilość enzymu, która w ciągu 60 minut w temperaturze 55°C, przy pH 4,5, w warunkach oznaczenia, uwalnia ze skrobi rozpuszczalnej 1 mg glukozy.

## 3. Omówienie wyników i dyskusja

Intensywny wzrost szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* obserwowano, wówczas gdy w podłożach znajdowały się sacharoza, glukoza i w przypadku *Lactobacillus plantarum* K i C maltoza. W tych doświadczeniach po 72 h hodowli w 1 ml podłoża liczba bakterii wynosiła  $10^9$  j.t.k./ml. W przypadku zastąpienia wymienionych cukrów dekstryną, maltodekstryną, rozpuszczalną i natywną skrobią ziemniaczaną, laktozą i mannozą przyrost biomasy bakterii szczepów *Lactobacillus plantarum* K i C był niższy, liczba bakterii wynosiła  $10^8$  j.t.k./ml, natomiast szczep *Lactobacillus amylovorus* intensywnie namnażał się przy zastosowaniu jako źródła węgla dekstryny i rozpuszczalnej skrobi ziemniaczanej w 1 ml hodowli liczba bakterii wynosiła  $(3,2-9,4) \times 10^9$ .

Spośród testowanych węglowodanów zastosowanie amylopektyny, amylozy lub D-ksylozy, jako jedyne źródła węgla w podłożu, powodowało przyrost biomasy

bakterii na poziomie ( $10^7$  j.t.k./ml) w przypadku szczepów *Lactobacillus plantarum* C i *Lactobacillus amylovorus*. Natomiast szczep *Lactobacillus plantarum* K, hodowany w pożywce zawierającej te węglowodany, charakteryzował się jeszcze słabszym wzrostem – rzędu  $10^6$  j.t.k./ml (tab. 1).

Tabela 1

Wpływ źródła węgla na przyrost biomasy badanych szczepów po 72 godzinach hodowli

Źródło węgla	Liczba bakterii, j.t.k/ml		
	<i>Lactobacillus plantarum</i> K	<i>Lactobacillus plantarum</i> C	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
natywna skrobia ziemniaczana	$(1,2-2,6) \times 10^8$	$(1,1-3,2) \times 10^8$	$(1,3-3,4) \times 10^8$
rozpuszczalna skrobia ziemniaczana	$(3,3-8,0) \times 10^8$	$(3,4-8,0) \times 10^8$	$(3,2-9,4) \times 10^9$
amylopektyna	$(2,5-6,7) \times 10^6$	$(4,3-9,7) \times 10^7$	$(3,2-9,6) \times 10^7$
amyloza	$(1,8-5,2) \times 10^6$	$(3,5-8,5) \times 10^7$	$(4,2-8,4) \times 10^7$
dekstryna	$(4,3-9,2) \times 10^8$	$(4,4-9,4) \times 10^8$	$(3,6-9,3) \times 10^9$
maltodekstryna	$(3,5-8,9) \times 10^8$	$(1,3-4,9) \times 10^8$	$(1,2-5,0) \times 10^8$
maltoza	$(2,4-6,6) \times 10^9$	$(2,5-7,5) \times 10^9$	$(4,4-8,3) \times 10^8$
sacharoza	$(3,4-9,3) \times 10^9$	$(3,4-8,8) \times 10^9$	$(1,4-8,3) \times 10^9$
laktoza	$(1,1-5,6) \times 10^8$	$(1,0-2,6) \times 10^8$	$(2,4-8,6) \times 10^8$
glukoza	$(2,6-9,7) \times 10^9$	$(4,6-9,4) \times 10^9$	$(4,7-9,8) \times 10^9$
mannoza	$(1,7-3,4) \times 10^8$	$(2,4-7,4) \times 10^8$	$(2,6-7,6) \times 10^8$
D-ksyloza	$(1,5-5,0) \times 10^6$	$(2,3-6,8) \times 10^7$	$(3,3-8,4) \times 10^7$

Amylazy wytwarzane przez badane szczepy bakterii wydzielane są do podłoża hodowlanego w logarytmicznej i stacjonarnej fazie ich wzrostu. Zależnie od węglowodanów obecnych w podłożach hodowlanych, które pobudzały lub hamowały biosyntezę enzymów amylolitycznych, aktywność alfa-amylazy i glukoamylazy w cieczach po hodowli bakterii była bardzo zróżnicowana.

W wyniku hodowli *Lactobacillus plantarum* K najwyższe aktywności amylaz uzyskano w przypadku stosowania natywnej i rozpuszczalnej skrobi ziemniaczanej. Wynosiły one odpowiednio dla alfa-amylazy 12-14 JA/ml i dla glukoamylazy 0,20-0,39 JGA/ml cieczy pohodowlanej. Wówczas gdy stosowano jako jedyne źródła węgla: dekstrynę, sacharozę, maltodekstrynę, maltozę, mannozę, laktozę i D-ksylozę, aktywność alfa-amylazy wynosiła od 6 do 10 JA/ml cieczy pohodowlanej. Najniższe aktywności alfa-amylazy uzyskano w przypadku stosowania amylopektyny lub glukozy jako źródła węgla, odpowiednio 5 i 4 JA/ml.

Po hodowli badanego szczepu bakterii w podłożach zawierających następujące cukry: dekstrynę, maltodekstrynę, maltozę, sacharozę, aktywność glukoamylazy wynosiła od 0,10 do 0,20 JGA w 1 ml cieczy pohodowlanej. W wyniku hodowli *Lactobacillus plantarum* K w podłożach zawierających amylopektynę, laktozę, glukozę, mannozę lub D-ksylozę, stwierdzono jedynie ślady lub brak aktywności tego enzymu (tab. 2).

Tabela 2

Aktywność amylaz syntetyzowanych przez szczep *Lactobacillus plantarum* K po 72 h hodowli

Źródło węgla	Aktywność amylaz w 1 ml cieczy pohodowlanej	
	alfa-amylaza (JA)	glukoamylaza (JGA)
natywna skrobia ziemniaczana	14	0,39
rozpuszczalna skrobia ziemniaczana	12	0,20
amylopektyna	5	0,05
amyloza	6	0,09
dekstryna	10	0,20
maltodekstryna	9	0,19
maltoza	9	0,14
sacharoza	10	0,10
laktoza	9	0,02
glukoza	4	0,01
mannoza	7	0,01
D-ksyloza	6	brak

Szczep bakterii *Lactobacillus plantarum* C wytwarzał amylazy, których aktywność wynosiła 12-13 JA/ml i 0,21-0,37 JGA/ml, wówczas gdy źródłem węgla była rozpuszczalna lub natywna skrobia ziemniaczana oraz aktywności rzędu 11-12 JA/ml i 0,15 JGA/ml, gdy źródłem węgla była dekstryna lub maltodekstryna.

W przypadku stosowania maltozy lub sacharozy – aktywność alfa-amylazy wynosiła odpowiednio 11 i 12 JA/ml, a nieco niższe aktywności uzyskano po hodowli bakterii w podłożu zawierającym laktozę – 9 JA/ml cieczy pohodowlanej. Spośród testowanych cukrów prostych biosyntezę alfa-amylazy indukowała D-ksyloza i mannoza, aktywność wynosiła wówczas 10–9 JA/ml, a hamowała amylopektyna, amyloza i glukoza, aktywność wynosiła odpowiednio 2, 4 i 4 JA/ml.

Aktywność glukoamylazy wytworzonej przez bakterie tego szczepu, przy zastosowaniu jako źródła węgla amylozy, sacharozy lub amylopektyny, wynosiła odpowiednio: 0,07, 0,05 i 0,05 JGA/ml cieczy pohodowlanej; w wyniku hodowli *Lactobacillus plantarum* C z użyciem pozostałych badanych cukrów stwierdzono ślady lub brak aktywności glukoamylazy (tab. 3).

Tabela 3

Aktywność amylaz syntetyzowanych przez szczep *Lactobacillus plantarum* C po 72 h hodowli

Źródło węgla	Aktywność amylaz w 1 ml cieczy pohodowlanej	
	alfa-amylaza (JA)	glukoamylaza (JGA)
1	2	3
natywna skrobia ziemniaczana	13	0,37
rozpuszczalna skrobia ziemniaczana	12	0,21
amylopektyna	2	0,05

1	2	3
amyloza	4	0,07
dekstryna	12	0,15
maltodekstryna	11	0,15
maltoza	11	0,12
sacharoza	12	0,05
laktoza	9	0,03
glukoza	4	brak
mannoza	9	ślady
D-ksyloza	10	brak

*Lactobacillus amylovorus* po hodowli w podłożu zawierającym rozpuszczalną skrobię ziemniaczaną stanowiącą źródło węgla wytwarzał enzymy amyrolityczne o aktywności odpowiednio 17 JA/ml i 0,24 GA/ml oraz nieco niższe 14 JA/ml i 0,14-0,09 GA/ml cieczy pohodowlanej, gdy skrobię zastąpiono maltozą lub sacharozą. W przypadku zastąpienia optymalnego źródła węgla dla tego szczepu, czyli rozpuszczalnej skrobi ziemniaczanej jej formą natywną lub amylopektyną aktywność alfa-amylazy, wynosiła 9-10 JA/ml, aktywność glukoamylazy odpowiednio – 0,09 i 0,05 JGA/ml cieczy pohodowlanej. Po hodowli tego szczepu w podłożu zawierającym laktozę poziom aktywności alfa-amylazy wynosił 10 JA/ml, przy braku aktywności glukoamylazy w cieczy pohodowlanej.

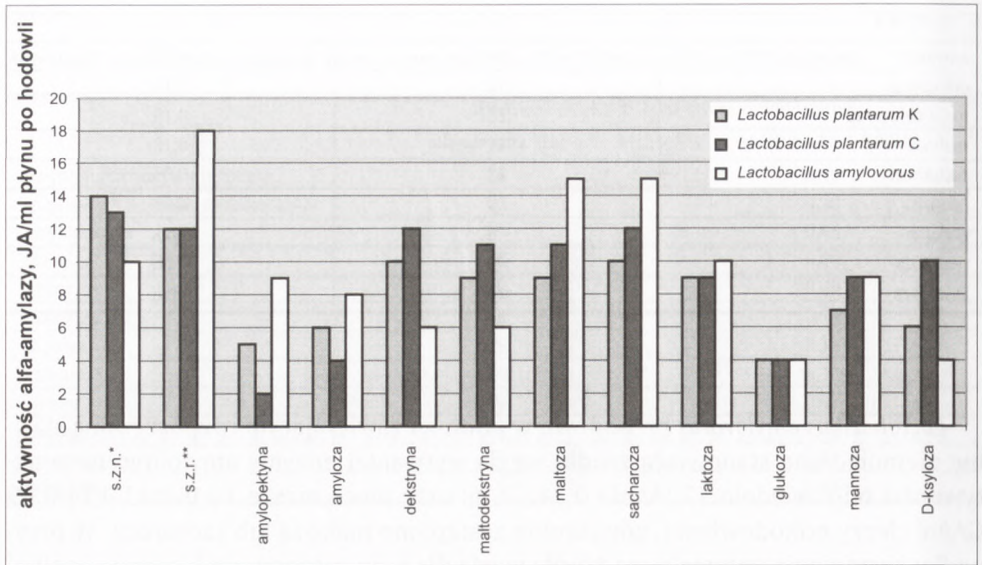
W efekcie zastosowania do hodowli bakterii D-ksylozy lub glukozy aktywności amylaz w cieczy pohodowlanej były niewielkie lub śladowe, zatem można sądzić, że te węglowodany w badanych warunkach nie stymulowały biosyntezy enzymów amyrolitycznych przez badany szczep *Lactobacillus amylovorus* (tab. 4).

Tabela 4

Aktywność amylaz syntetyzowanych przez szczep *Lactobacillus amylovorus* po 72 h hodowli

Źródło węgla	Aktywność amylaz w 1 ml cieczy pohodowlanej	
	alfa-amylaza (JA)	glukoamylaza (JGA)
natywna skrobia ziemniaczana	9	0,09
rozpuszczalna skrobia ziemniaczana	17	0,24
amylopektyna	9	0,05
amyloza	7	0,04
dekstryna	5	0,09
maltodekstryna	6	0,10
maltoza	14	0,14
sacharoza	14	0,09
laktoza	10	brak
glukoza	3	brak
mannoza	8	brak
D-ksyloza	3	brak





Rys. 1. Porównanie aktywności alfa-amylazy w cieczach po 72 godzinnej hodowli badanych szczepów bakterii. Zastosowany cukier – jako jedyne źródło węgla; s.z.n.\* – skrobia ziemniaczana natywna, s.z.r.\*\* – skrobia ziemniaczana.

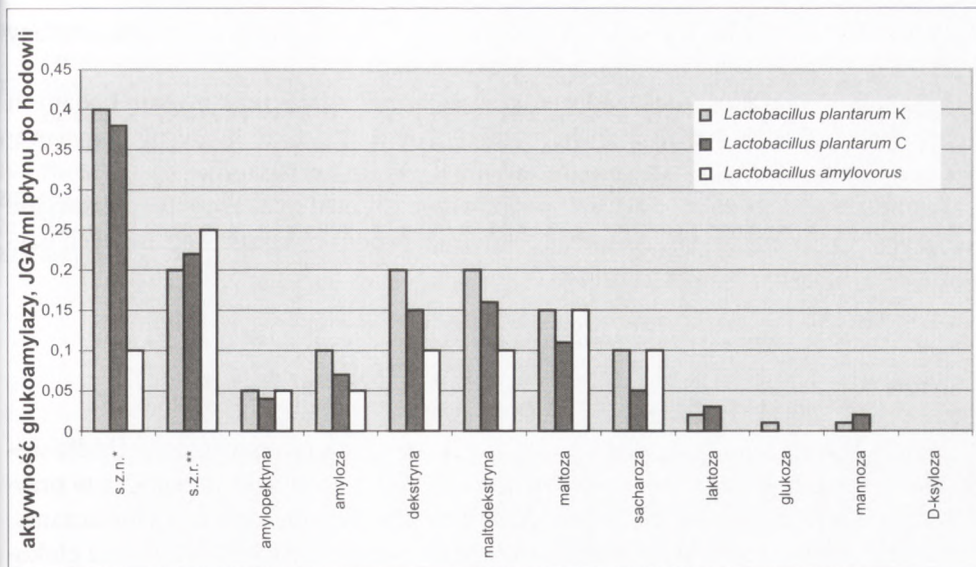
Na rysunkach 1 i 2 przedstawiono wpływ źródła węgla na poziom aktywności biosyntetyzowanych enzymów alfa-amylazy i glukoamylazy przez badane szczepy bakterii.

Na podstawie analizy tych danych stwierdzono, że optymalnym źródłem węgla dla indukowania biosyntezy alfa-amylazy przez szczepy *Lactobacillus plantarum* K i *Lactobacillus plantarum* C, była natywna skrobia ziemniaczana, natomiast dla szczepu *Lactobacillus amylovorus* rozpuszczalna skrobia ziemniaczana.

Podobnie jak w przypadku alfa-amylazy szczepy *Lactobacillus plantarum* K i *Lactobacillus plantarum* C wytwarzały w czasie hodowli glukoamylazę, wówczas gdy jedynym źródłem węgla w podłożu była natywna skrobia ziemniaczana. Znacznie niższe aktywności tego enzymu, uzyskano hodując bakterie w podłożu, zawierającym rozpuszczalną skrobię ziemniaczaną i w kolejności dekstrynę, maltodekstrynę, maltozę, sacharozę, amylozę lub amylopektynę. Laktoza, glukoza, mannoza lub D-ksyloza, stosowane jako jedyne źródło węgla, hamowały wytwarzanie glukoamylazy przez te szczepy.

W hodowli szczepu *Lactobacillus amylovorus* uzyskiwano znacznie wyższe aktywności glukoamylazy, wówczas gdy w podłożu znajdowała się rozpuszczalna skrobia ziemniaczana. Zastosowanie laktozy, glukozy i D-ksylozy hamowało biosyntezę glukoamylazy.

Podsumowując można stwierdzić, że węglowodany, które indukują proces biosyntezy enzymów amylolitycznych są na ogół jednocześnie korzystne w syntezie



Rys. 2. Porównanie aktywności glukoamylazy w cieczach po 72 godzinnej hodowli badanych szczepów bakterii. Zastosowany cukier – jako jedyne źródło węgla; s.z.n.\* – skrobia ziemniaczana natywna, s.z.r.\*\* – skrobia ziemniaczana.

biomasy bakterii, z wyjątkiem glukozy, która jest optymalnym źródłem węgla dla wzrostu bakterii, a ogranicza wytwarzanie enzymów amylolitycznych – tę zależność stwierdzono u wszystkich badanych szczepów bakterii.

Przedstawione wyniki badań znajdują w ogólnym zarysie potwierdzenie w danych literaturowych, dotyczących amylolitycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, o cechach zbliżonych do badanych szczepów.

Pompeyo i in. (2), w wyniku badań nad wpływem źródła węgla na biosyntezę alfa-amylazy przez szczep *Lactobacillus amylovorus*, wyizolowany przez Nakamurę (10) stwierdzili, że skrobia kukurydziana, amylopektyna, amyloza, a także maltoza i sacharoza indukowały wytwarzanie tego enzymu. Z kolei wielu badaczy zajmujących się tym zagadnieniem wykazało hamujący wpływ glukozy na wytwarzanie amylaz przez bakterie fermentacji mlekowej (12,22).

W pracy wykazano, że amylazy, biosyntetyzowane przez badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej: *Lactobacillus plantarum* K, *Lactobacillus plantarum* C i *Lactobacillus amylovorus*, hydrolizują skrobię ziemniaczaną, w sposób charakterystyczny dla działania alfa-amylazy i glukoamylazy.

Burger-Cassler, Pompeyo i in. (22,2), stwierdzili, że efekt hydrolizy skrobi kukurydzianej przez szczep *Lactobacillus amylovorus* jest charakterystyczny dla działania alfa-amylazy. Natomiast Giraud i wsp. (6-8) wyizolowali i opisali szczep *Lactobacillus plantarum* A6, hydrolizujący surową skrobię manioku do dekstryn, maltozy i glukozy. Na podstawie wyników badań dotyczących charakterystyki amylaz *Lactobacillus*

*plantarum* A6 stwierdzono, że oprócz enzymów o głównej aktywności alfa-amylazy szczep ten wytwarza niewielkie ilości glukoamylazy.

Wykonanie opisanych doświadczeń pozwoliło na scharakteryzowanie badanych szczepów w aspekcie kierowania ich metabolizmem, w celu indukowania biosyntezy enzymów amylolitycznych oraz intensyfikacji wzrostu bakterii.

Wyniki pracy, oprócz wartości poznawczych, zawierają aspekty aplikacyjne i będą wykorzystane do opracowania technologii produkcji kultur starterowych używanych do konserwowania żywności i pasz.

#### 4. Wnioski

1. Sacharoza, glukoza, dekstryna i maltodekstryna stanowią najlepsze źródła węgla dla wzrostu bakterii *Lactobacillus plantarum* K i *Lactobacillus plantarum* C, a w przypadku szczepu *Lactobacillus amylovorus*, również rozpuszczalna skrobia ziemniaczana.

2. Najwyższy poziom aktywności alfa-amylazy – wynoszący 13-14 JA oraz glukoamylazy 0,37-0,39 JGA w 1 ml cieczy pochodzącej, uzyskano po 72 h hodowli *Lactobacillus plantarum* C i *Lactobacillus plantarum* K, wówczas gdy jedynym źródłem węgla w podłożu była natywna skrobia ziemniaczana.

3. Szczep *Lactobacillus amylovorus* wytwarzał enzymy amylolityczne o aktywności alfa-amylazy – 17 JA/ml, glukoamylazy – 0,24 JGA/ml cieczy po 72 h hodowli, wówczas gdy w podłożu jedynym źródłem węgla była rozpuszczalna skrobia ziemniaczana.

#### Literatura

1. Zielińska K. J., (1996), Pr. Inst. Lab. Bad. Prz. Sp., 67-81.
2. Pompeyo C. C., Gomez M. S., Gasparian S., Morlon-Guyot J., (1993), Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 266-269.
3. Kuncewicz A., Panfil-Kuncewicz H., (1998), *Bakterie fermentacji mlekowej*, Monografie, Wyd. PŁ, 98-109.
4. Nakamura L. K. (1981), Intern. J. Syst. Bacteriol., 31, 1, 56-63.
5. Agati V., Gujot J. P., Marlon-Gujot J., Talamond P., Hounhouigan D. J., (1998), J. Appl. Microbiol., 85 (3), 512-520.
6. Giraud E. L., Brauman A., Keleke S., Lelong B., Raimbault M., (1991), Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 379-383.
7. Giraud E. L., Raimbault M., (1993), J. Appl. Bacteriol., 75, 276-282.
8. Giraud E., Champailier A., Raimbault M., (1994), Appl. Environm. Microbiol., 60, 12, 4339-4323.
9. Guyot J. P., Calderon M., Morlon-Guyot J., (2000), J. Appl. Microbiol., 88 (1), 176-182.
10. Nakamura L. K., Crowell C. D., (1979), Dev. Ind. Microbiol., 20, 531-540.
11. Kandler O., Weiss N., (1986), *Genus Lactobacillus*, 1209-1234, Eds. Sneath P. H. A., Mair N. C., Sharpe M. E., Holt J. G., Bergeys Man. Syst. Bacteriol., vol. 2, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
12. Domań M., Targoński Z., Bardowski J., (2001), XXXII Sesja Naukowa KTiChŻ PAN „Technologia żywności a oczekiwania konsumentów” SGGW, WTŻ.
13. Łaniewska-Moroz Ł., Warmińska-Radyko I., (1998), Biotechnologia, 1 (40), 117-128.
14. Champ M., Szylit O., Raibaud P., Ait-Abdelkader N., (1983), J. Appl. Bacteriol., 55, 487-493.
15. Cotta M. A., (1988), Appl. Environm. Microbiol., 54, 3, 772-776.

16. Zielińska K., Sawicka-Żukowska R., Stecka K., Miecznikowski A., Suterska A., (2000), Nowy szczep *Lactobacillus plantarum*. Patent nr 179838.
17. Zielińska K., Miecznikowski A., Suterska A., (1998), Nowy szczep bakterii *Lactobacillus plantarum* C. Zgłoszenie patentowe nr P. 330023.
18. de Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E., (1960), J. Appl. Bacteriol., 23, 1, 130-135.
19. PN-ISO 4833. (1998), Ogólne zasady oznaczania liczby drobnoustrojów.
20. Procedura badawcza (2001), PB-ZF/GB-03, IBPRS.
21. Procedura badawcza (2001), PB-ZF/GB-04, IBPRS.
22. Burgess-Cassler A., Imam S., (1991), Curr. Microbiol., 23, 207-210.