

Bakterijų, išskirtų iš dirvožemio, produkuojamų celiuliazinių aktyvumo tyrimai ir įvairių terpių panaudojimo galimybės celiuliazinių susidarymui

Ieva Gaidė,

Dalia Čižeikienė

Kauno technologijos universitetas,
Radvilėnų pl. 19,
50254 Kaunas, Lietuva
El. paštas ieva.sendzikaite@ktu.edu

Celiuliazės fermentai yra svarbūs skaidant lignoceliuliozinę žaliavą (ir celiuliozę), kuri yra gausiausias augalų biomasės komponentas. Taip galima gauti įvairius bioproduktus ir biokurą, kurie yra nekenksmingi aplinkai. Šio darbo tikslas – iširti iš dirvožemio išskirtų bakterijų gaminamų celiuliazinių aktyvumą ir nustatyti fermentacijos sąlygų, įvairių mitybinių terpių įtaką bakterijų augimui ir jų produkuojamų celiuliazinių aktyvumui. Šiame darbe buvo tirtos bakterijos, paimitos iš gamtinės aplinkos. Iš dirvožemio išskirti ir pagal morfologinius požymius atrinkti 43 bakterijų izoliatai. Iš jų celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo šeši bakterijų izoliatai. Papildomai iš penkių žinomų *Bacillus* genčiai priklausančių bakterijų, anksčiau išskirtų iš gamtinės aplinkos, atrinkta *B. subtilis* 88, pasižymėjusi didžiausiu celiuliaziniu aktyvumu. *Bacillus subtilis* rūšies bakterija buvo kultivuota devyniose skirtingose terpėse 30 °C ir 45 °C temperatūrose. Didžiausias celiuliazinis aktyvumas buvo gautas po 24 val. kultivavimo 30 °C temperatūroje, terpėje, kurią sudarė „Nutrient“ sultinys ir gliukozė (5 g l⁻¹). Kultivuojant *B. subtilis* bakterijas melasos terpėje, celiuliazinis aktyvumas, palyginti su MRS ir „Nutrient“ sultiniais, buvo panašus arba net didesnis.

Raktažodžiai: dirvožemio bakterijos, *Bacillus* genties bakterijos, celiuliazinis aktyvumas, melasa

ĮVADAS

Celiuliozė yra gausiausias augalų biomasės komponentas, randamas Žemėje (Tomme et al., 1995). Pastaruoju metu tai didelio susidomėjimo sulaukęs atsinaujinantis šaltinis, kuriame gausu lignoceliuliozės, jis yra perdirbimas į vertingus bioproduktus. Celiuliozė yra mechanškai atsparus bei chemiškai inertiškas polimeras, taip yra dėl daugybės vandenilinių jungčių, kurios susidaro jungiantis makromolekulėms. Būtent dėl šios savybės celiuliozė yra konstrukcinė augalų medžiaga, medienoje jos yra apie 30–50 %, o vilnoje net iki 90 %. Kitaip negu kiti junginiai, celiuliozė yra mažai tirpsta vandenyje, todėl jos konversija tampa svarbiu uždaviniu technologams skaidant

lignoceliuliozę. Augalų likučiai (nukritę lapai, smulkios durpės, šiaudai) turi daug celiuliozės, tai pagerina dirvožemio struktūrą. Mikroorganizmai pagreitina celiuliozės irimą, o gebėjimas celiuliozę panaudoti kaip energijos ir anglies šaltinį yra vienas iš svarbiausių medžiagų srauto biosferoje procesų (Behera et al., 2017).

Atlikti tyrimai su celiuliazėmis, hemiceliuliazėmis ir pektinazėmis atskleidė šių fermentų biotechnologinį potencialą įvairiose srityse, pavyzdžiui, maisto, alaus ir vyno pramonėje, pašarų gamyboje, tekstilės ir popieriaus pramonėje, žemdirbystėje (Bhat, 2000). Celiuliazinių paklausa yra gana didelė. Manoma, kad jos poreikis laikui bėgant tik augs. Celiuliazinių kompleksas atlieka pagrindinį vaidmenį skaidant biologiškai skaidžias

medžiagas iki gliukozės, o ši gali būti fermentuojama į bioetanolį. Celiuliazės turi platų pritaikymo spektrą – baltymų išgavimas iš sojos pupelių ir kokoso riešutų, acto gavimas iš citrusinių vaisių minkštimo. Celiuliazės naudojamos ankštims pašalinti nuo sojos pupelių. Taip pat jas galima naudoti modifikuojant lipnius ryžius ar gerinant popieriaus kokybę. Vis dėlto pats svarbiausias celiuliazų pritaikymas yra celiuliozinių atliekų pavertimas gliukoze. Įvairios biomasės atliekos, lignoceliuliozinė žaliava, popieriaus atliekos, šiaudai yra plačiai naudojami kaip anglies šaltinis pramoninei celiuliazų hidrolizės produktų fermentacijai (Yang et al., 2013). Celiuliozės skaidymas yra kompleksinis procesas, kuriame dalyvauja keli fermentai (Mickevičius, 2008). Celiuliazės yra skirstomos į tris pagrindines grupes: endoglukanazę (endo-1, 4- β -gliukanazė EC 3.2.1.4); celobiohidrolazę arba egzoglukanazę (egzo-1, 4- β -gliukanazė EC 3.2.1.91) ir β -gliukozidazę (1, 4- β -gliukozidazė EC 3.2.1.21) (Gao et al., 2008).

Celiuliazės produkuoja gamtoje paplitę mikroorganizmai (Gusakov, 2011). Celiulioziniai fermentai randami augaluose, vabzdžiuose, bakterijose, grybuose (Watanabe, Tokuda, 2010; Duan, Feng, 2010). Dėl plataus celiuliazų taikymo tiek maisto, tiek ir chemijos pramonėje mokslininkai tiria celiuliazes gaminančius mikroorganizmus ir jų produkuojamas celiuliazes, vertina ir parenka optimalias sąlygas joms susidaryti (de Castro et al., 2010; Varnaitė ir kt., 2008; 2011; Dutta et al., 2008; Čižeikienė ir kt., 2018; Sendžikaitė ir kt., 2018). Ankstesniuose darbuose buvo tirti celiuliazes produkuojantys *Penicillium* genties mikroskopiniai grybeliai, nustatytos optimalios sąlygos, kuriomis celiuliazinis aktyvumas buvo didžiausias. Tirtos *Penicillium funiculosum* gaminamų celiuliazų galimybės skaidyti skirtingas atliekas (de Castro et al., 2010).

Lignoceliuliozės turinčias atliekas galima perdirbti naudojant iš bakterijų išskirtas celiuliazes, taip sumažinant cheminių metodų naudojimą pramonėje. Tyrimai, susiję su bakterijomis, išgautomis iš dirvožemio ir produkuojančiomis celiuliazes, – svarbūs ir atliekami laiku.

Šio darbo tikslas – ištirti iš dirvožemio išskirtų bakterijų gaminamų celiuliazų aktyvumą ir nustatyti fermentacijos sąlygų, įvairių mitybinių terpių įtaką bakterijų augimui ir jų produkuojamų celiuliazų aktyvumui.

METODAI IR SĄLYGOS

Naujų bakterijų išskyrimas iš dirvožemio ir celiuliaziniu aktyvumu pasižyminčių bakterijų atranka

Dirvožemio ėminiai buvo imti Kauno mieste iš 5–10 cm gylio. Paimta 1 g dirvožemio ir sumaišyta su 9 ml steriliu 0,9 % NaCl tirpalu. Mišinys purtytas 1 min. kratytuve (Environmental Shaker – Incubator ES-20), tokiu būdu mikroorganizmai atskirti nuo dirvožemio dalelių. Paimta 0,1 ml suspensijos ir pasėta Petri lėkštelėse su mitybos agaroterpe („Nutrient“ agaras, OXOID). Mikroorganizmai kultivuoti termostate 48 val. 37 °C temperatūroje aerobinėmis sąlygomis. Po kultivavimo pagal morfologinius požymius išskirti 43 izoliatai. Išskirti mikroorganizmai išgryninti persėjant po vieną koloniją ant šviežio „Nutrient“ agaro, padauginči skystoje „Nutrient“ terpėje ir ilgalaikiam saugojimui suspenduoti 25 % glicerolio tirpale kriomėgintuvėliuose bei saugoti –80 °C temperatūroje gilaus šaldymo šaldiklyje. Bakterijų izoliatai persėti į Petri lėkštes su minimalia agarizuota terpe, kurioje vienintelis anglies šaltinis buvo 0,5 % karboksimetilceliuliozė (KMC), kultivuoti tris paras aerobinėmis sąlygomis inkubatoriuje 37 °C temperatūroje. Po to tikrintas jų celiuliazinis aktyvumas naudojant kongo raudonąją dažą (kokybinis celiuliazų aktyvumo nustatymas pateiktas žemiau).

Atrinkti izoliatai, pasižymėję celiuliaziniu aktyvumu, buvo tirti toliau. Tam izoliatai buvo auginti tris paras skystoje „Nutrient“ sultinio terpėje 37 °C temperatūroje. Vėliau tirtas jų celiuliazinis aktyvumas esant skirtingoms temperatūroms – 30 °C ir 50 °C, naudojant 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentą (DNS), kuris paruoštas $1 \pm 0,01$ g 3,5-dinitrosalicilo rūgšties ir $30 \pm 0,1$ g natrio-kalio tartratai ištirpinus 100 ml 0,4 M NaOH tirpale (kiekybinis celiuliazų aktyvumo nustatymas aprašytas žemiau).

Anksčiau išskirtų, *Bacillus* genčiai priklausančių, bakterijų celiuliazinio aktyvumo tyrimas

Papildomai tirtas penkių *Bacillus* genčiai priklausančių bakterijų (*B. subtilis* 45, *B. subtilis* 88, *B. coagulans* 84, *B. subtilis* subsp. *subtilis* MI1, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* MI2) celiuliazinis aktyvumas. Tris paras bakterijos augintos termostatuojamame

kratytuve (Environmental Shaker – Incubator ES-20) MRS sultinyje (Bioline, Italy) Erlenmėjerio kolbose esant 30 °C temperatūrai ir 150 apsisukimų per minutę. Po to nustatytas celiuliazinis aktyvumas, naudojant DNS reagentą. Atrinkta didžiausiu aktyvumu pasižymėjusi *B. subtilis* padermė, kuri išbandyta celiuliazijų gamybai, naudojant skirtingas terpes, taip pat ir iš cukrinių runkelių gautą melasą. Atrinkta *B. subtilis* 88 padermė buvo auginta devyniose skirtingose terpėse, kurių sudėtis pateikta lentelėje. Į 25 ml mitybinės terpės buvo inokuluota $2,4 \cdot 10^7$ ląstelių/ml. Bakterijos augintos termostatuojamame kratytuve (Shaking water bath, Witeg) (150 aps./min), esant dviem skirtingoms temperatūroms – 30 °C ir 45 °C 72 val. Fermentacijos metu kas 24 val. aseptinėmis sąlygomis paimti mėginiai ir nustatyta: (1) fermentacijos trukmės įtaka bakterijų biomasės susidarymui ir (2) fermentacijos trukmės įtaka bakterijų celiuliaziniam aktyvumui 30 °C ir 45 °C temperatūrose.

Biomasės kiekio nustatymas

Mikroorganizmų biomasės kiekis buvo nustatytas svėrimo metodu. Į 25 ml terpės buvo inokuluota $2,8 \cdot 10^7$ ląstelių/ml, bakterija auginta termostatuojamame kratytuve (Shaking water bath, Witeg) (150 aps./min.), esant dviem skirtingoms temperatūroms – 30 °C ir 45 °C 72 val. Fermentacijos metu kas 24 val. aseptinėmis sąlygomis

paimta po 1 ml kultivuojamos suspensijos, įpilta į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį, centrifuguota (8 000 aps./min., 10 min.). Gauta skysta fazė nupilta, o mėgintuvėlis su atskirta biomase pasvertas. Biomasės kiekis gautas atėmus tuščio mėgintuvėlio svorį iš mėgintuvėlio su mikroorganizmų biomase svorio. Biomasės kiekis išreikštas miligramais litre ($g\ l^{-1}$).

Kokybinis celiuliazinio aktyvumo nustatymas

Kokybinis celiuliazinio aktyvumo nustatymo metodas remiasi specifine sąveika tarp kongo raudonojo (angl. *Congo red*) dažo ir polisacharidų. Kokybinis celiuliazinis aktyvumas nustatytas remiantis I. Sendžikaite ir kt. (2018).

Kiekybinis celiuliazinio aktyvumo nustatymas

Kiekybinis celiuliazinio aktyvumo nustatymas atliktas naudojant DNS rūgšties reagentą. Kiekybiniam celiuliaziniam aktyvumui nustatyti kaip substratas naudoti KMC milteliai, jie ištirpinti 0,1 M citratiname buferyje (pH 5), paruoštas 1 % KMC tirpalas. Į 0,9 ml 1 % KMC tirpalo, pašildyto iki 50 °C temperatūros, vandens vonioje įpilta 0,1 ml tiriamojo fermento tirpalo. Kontrolinis mėginys ruoštas sumaišius 0,9 ml 1 % KMC tirpalo ir 0,1 ml citratinio buferio. Fermentinės hidrolizės reakcija vykdyta 50 °C temperatūroje 60 min. Reakcija sustabdyta mėgintuvėlius ištraukus, staigiai atvėsinus ir įpylus 1 ml DNS

Lentelė. Terpės, naudotos bakterijų *B. subtilis* 88 auginimui

Table. Media used for *B. subtilis* 88 cultivation

Terpės Nr. Media No.	Terpės sudėtis / Media
1	10 g l ⁻¹ melasa, + 5 g l ⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l ⁻¹ peptonas 10 g l ⁻¹ molasses, + 5 g l ⁻¹ yeast extract, + 5 g l ⁻¹ peptone
2	20 g l ⁻¹ melasa, + 5 g l ⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l ⁻¹ peptonas 20 g l ⁻¹ molasses, + 5 g l ⁻¹ yeast extract, + 5 g l ⁻¹ peptone
3	30 g l ⁻¹ melasa, + 5 g l ⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l ⁻¹ peptonas 30 g l ⁻¹ molasses, + 5 g l ⁻¹ yeast extract, + 5 g l ⁻¹ peptone
4	MRS sultinys + 10 g l ⁻¹ KMC* / MRS broth + 10 g l ⁻¹ CMC*
5	„Nutrient“ sultinys / Nutrient broth
6	„Nutrient“ sultinys“ + 10 g l ⁻¹ KMC* / Nutrient broth + 10 g l ⁻¹ CMC*
7	„Nutrient“ sultinys“ + 10 g l ⁻¹ gliukozė / Nutrient broth + 10 g l ⁻¹ glucose
8	„Nutrient“ sultinys“ + g l ⁻¹ KMC* / Nutrient broth + 5 g l ⁻¹ CMC*
9	„Nutrient“ sultinys“ + g l ⁻¹ gliukozė / Nutrient broth + 5 g l ⁻¹ glucose

* KMC – karboksimetilceliuliozė / CMC, carboxymethyl cellulose

reagento. Turinys gerai sumaišytas, o mėgintuvėliai pamerkti į verdančio vandens vonią ir kaitinti 5 min. Po kaitinimo mėginiai nedelsiant atvėsinti, praskiesti 6 ml distiliuoto vandens, sumaišyti ir spektrofotometru (Genesys 10 UV) matuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Celiuliazinis aktyvumas išreikštas aktyvumo vienetais mililitre (AV/ml) ir apskaičiuotas pagal 1 formulę:

$$AV / ml = \frac{GEV \times PF}{60 \times 0,1}; \quad (1)$$

GEV – gliukozės ekvivalento vertė standartinėje tiesėje, μmol ; PF – praskiedimo faktorius; 60 – fermentinės hidrolizės trukmė, min.; 0,1 – fermento kiekis reakcijos mišinyje, ml.

Vienas fermento aktyvumo vienetas gali išskirti 1 μmol gliukozės ekvivalento iš celiuliozės filtro popieriaus per 1 min., esant tam tikroms analizės sąlygoms. Nustatant celiuliazinį aktyvumą sudaryta standartinė tiesė iš įvairios koncentracijos gliukozės tirpalų (0,278; 0,55; 1,11; 1,66; 2,22; 2,77; 5,55 $\mu\text{mol/ml}$), iš jos skaičiuota tiriamojo mėginio gliukozės ekvivalento vertė. Spektrofotometru (Genesys 10UV) išmatuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis įvairios koncentracijos gliukozės tirpalais. Gliukozės ekvivalento vertės μmol tiriamuose tirpaluose apskaičiuotos iš standartinės gliukozės tiesės.

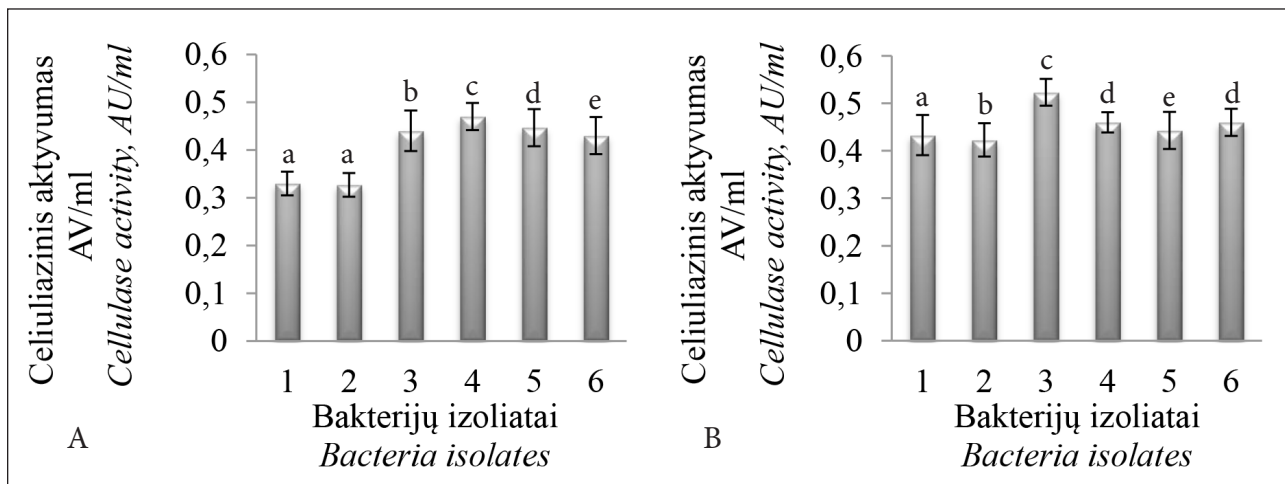
Eksperimentai kartoti tris kartus, iš gautų rezultatų išvesti vidurkiai, apskaičiuoti standartiniai nuokrypiai ir statistinis vertinimas buvo atliktas naudojant „Excel“ programinę įrangą.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Dirvožemio bakterijų celiuliazinis aktyvumas

Iš dirvožemio išskirti 43 bakterijų izoliatai, jie pasėti ant karboksimetilceliuliozės (KMC) terpės, bakterijos augintos tris paras ir tikrintas kokybinis celiuliazinis aktyvumas naudojant kongo raudonojo dažą. Celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo šeši išskirti bakterijų izoliatai. Šių šešių izoliatų celiuliazinis aktyvumas 30 °C ir 50 °C temperatūrose pateiktas 1 pav.

Iš dirvožemio išskirtų bakterijų izoliatų celiuliazinis aktyvumas buvo nuo $0,33 \pm 0,02$ iki $0,47 \pm 0,03$ AV/ml. Mažiausiu celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo izoliatas Nr. 1 – $0,33 \pm 0,02$ AV/ml ir izoliatas Nr. 2 – $0,32 \pm 0,02$ AV/ml. Bakterijų izoliatai Nr. 6, Nr. 3 ir Nr. 5 pasižymėjo didesniu aktyvumu – atitinkamai 22 %, 24 % ir 25,5 %. Bakterija Nr. 4 buvo nustatyta kaip turinti didžiausią celiuliazinį aktyvumą 30 °C temperatūroje, jos aktyvumas buvo 31 % didesnis ($0,47 \pm 0,03$ AV/ml), palyginti su mažiausiu celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjusiu izoliatu.



1 pav. Bakterijų celiuliazinis aktyvumas (AV/ml) 30 °C (A) ir 50 °C temperatūrose (B)

Fig. 1. Cellulase activity (AU/ml) of 6 bacteria isolates at 30°C (A) and at 50°C (B)

Pastaba: tarp vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide, skirtumai yra esminiai, $P < 0,05$.

Note: Means not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

Esant 50 °C temperatūrai mažiausiu celiulazi-
niu aktyvumu pasižymėjo taip pat izoliatas Nr. 2,
kaip ir esant 30 °C temperatūrai. Celiulaziniai ak-
tyvumai bakterijų Nr. 1, Nr. 5, Nr. 4 ir Nr. 6 buvo
didesni – atitinkamai 2 %, 4 %, 7 % ir 7 %, paly-
ginti su izoliato Nr. 2. Didžiausiu celiulaziniu ak-
tyvumu ($0,52 \pm 0,03$ AV/ml) 50 °C temperatūroje
pasižymėjo izoliatas Nr. 3 – 20 % didesniu nei
izoliatas Nr. 2. Didesnis celiulazinis aktyvu-
mas buvo izoliato Nr. 3 esant 50 °C temperatūrai
($0,52 \pm 0,03$ AV/ml) nei 30 °C temperatūrai.

***Bacillus* genties bakterijų celiulazinis aktyvumas**

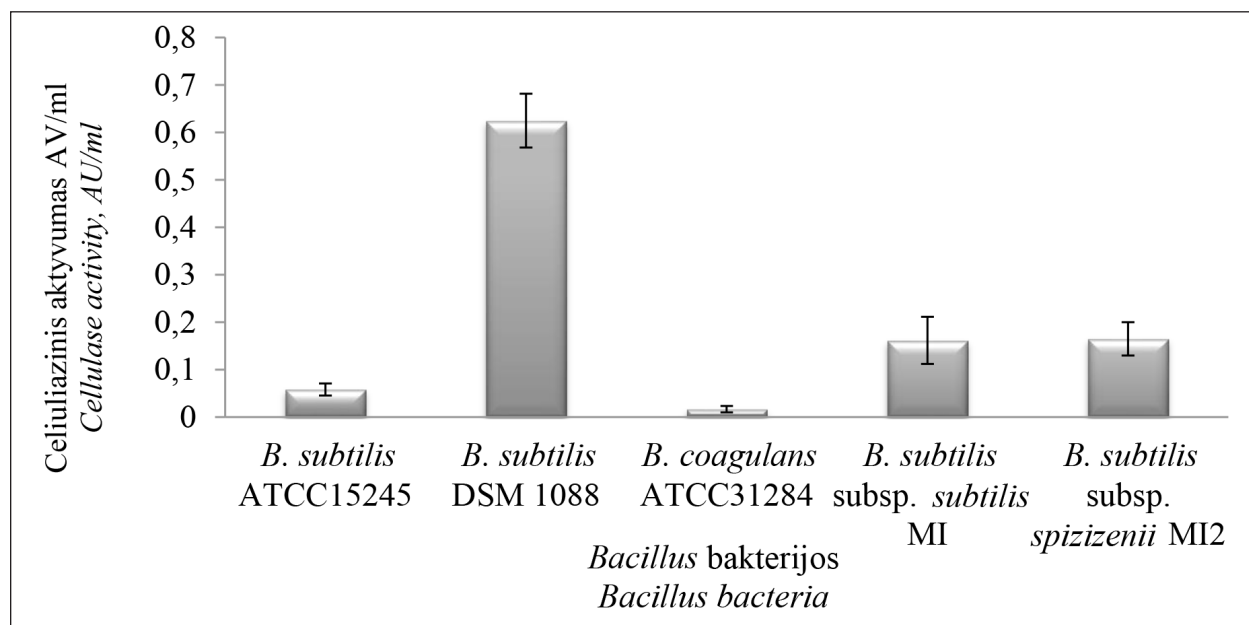
Nustatytas *Bacillus* genties bakterijų celiulazinis
aktyvumas (AV/ml) pateiktas 2 pav. Mažiausiu
celiulaziniu aktyvumu pasižymėjo *Bacillus coa-
gulans* 84 – $0,02 \pm 0,005$ AV/ml, šiek tiek didesniu
aktyvumu – *B. subtilis* 45 ($0,06 \pm 0,01$ AV/ml).
B. subtilis subsp. *subtilis* MI ir *B. subtilis* subsp.
spizizenii MI2 pasižymėjo panašiais celiulazi-
niais aktyvumais, atitinkamai 23 % ir 24 % di-
desniais nei *B. coagulans*. Didžiausiu celiulaziniu
aktyvumu ($0,63 \pm 0,07$ AV/ml) išsiskyrė *B. sub-
tilis* 88, kuris buvo didesnis net 97 %, palyginti
su *B. coagulans* 84. Ši bakterija buvo tirta toliau
vertinant celiulazių susidarymą įvairiose terpėse,
įskaitant melasos terpę.

Panašias *Bacillus* genties mikroorganizmų ce-
liulazinio aktyvumo vertes gavo ir kiti mokslininkai,
tirdami MRS sultinių, kukurūzų ir cukranendrių
šalutinių produktų terpes. A. K. Manharas ir kt.
(2016) taip pat tyrė *B. subtilis* bakterijas, išskirtas iš
fermentuotų sojos pupelių, bei jų celiulazinį ak-
tyvumą. *B. subtilis* AMS6 didžiausiu celiulaziniu
aktyvumu pasižymėjo, kai buvo auginama 37 °C
temperatūroje, MRS sultinyje, ir siekė $0,54$ AV/ml.
Mokslininkai S. A. Ladeira ir kt. (2015) tyrė ter-
mofilines *Bacillus* genties bakterijas, išskirtas iš
dirvožemio. Didžiausiu celiulaziniu aktyvumu
($0,29$ AV/ml) *Bacillus* sp. SMIA-2 pasižymėjo,
kai buvo auginama 70 °C temperatūroje, skystoje
terpėje, praturtintoje kukurūzų ir cukranendrių
šalutiniais produktais.

Fermentacijos trukmės įtaka *B. subtilis* 88 biomasės susidarymui

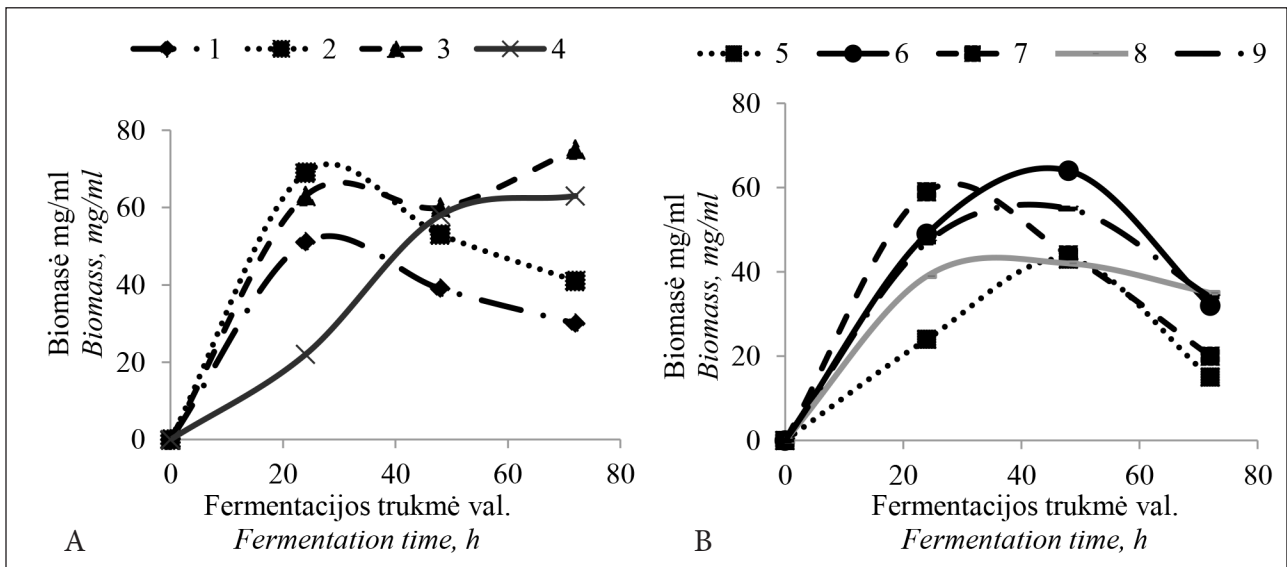
B. subtilis 88 buvo kultivuota devyniose skirtingose
terpėse esant skirtingoms temperatūroms – 30 °C
ir 45 °C. Bakterijų *B. subtilis* 88 biomasės susida-
rymo priklausomybė nuo kultivavimo trukmės 30
ir 45 °C temperatūrose pateikta 3 ir 4 pav.

Kultivuojant *B. subtilis* 88 bakterijas melasos
terpėje 10 g l^{-1} ir 20 g l^{-1} esant skirtingoms tempe-
ratūroms, biomasės kiekis pasiekė didžiausias ver-
tes (10 g l^{-1} : 30 °C – $51 \pm 5 \text{ g l}^{-1}$, 45 °C – $38 \pm 3 \text{ g l}^{-1}$,



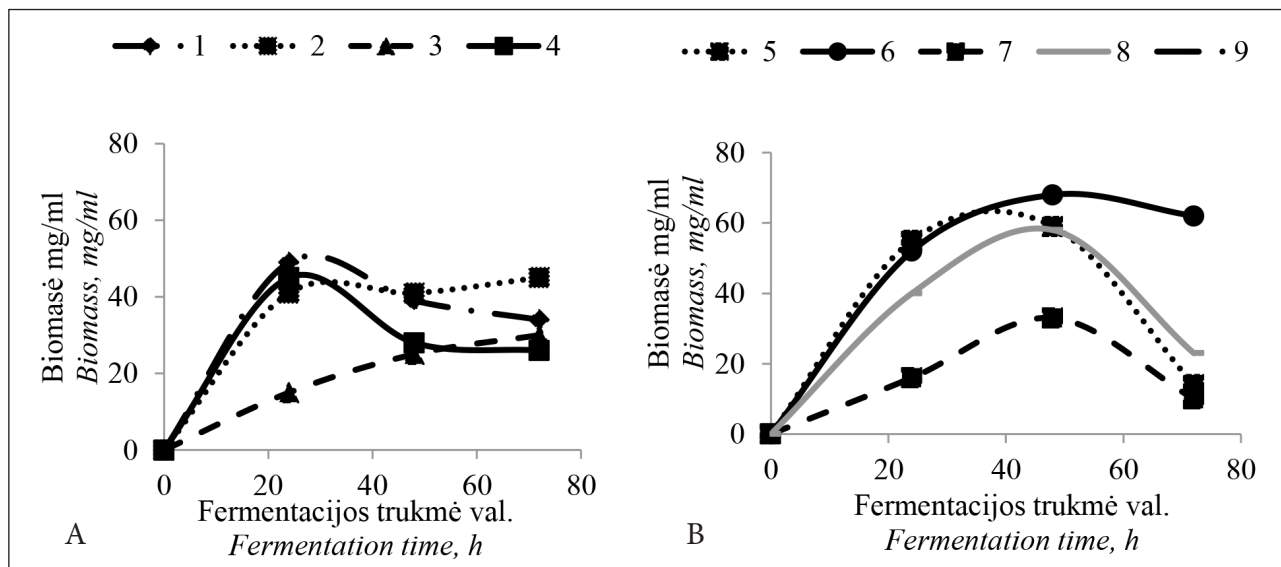
2 pav. *Bacillus* genties bakterijų celiulazinis aktyvumas (AV/ml) po trijų parų auginimo MRS sultinyje 30 °C temperatūroje

Fig. 2. Cellulase activity (AU/ml) of bacteria belonging to *Bacillus* genus after 3-day cultivation in MRS broth at 30°C



3 pav. Fermentacijos trukmės įtaka *B. subtilis* 88 biomasės (g l^{-1}) susidarymui, bakterijas kultivuojant 30°C temperatūroje skirtingose terpėse: 1 – 10 g l^{-1} melasa, + 5 g l^{-1} mielių ekstraktas, + 5 g l^{-1} peptonas; 2 – 20 g l^{-1} melasa, + 5 g l^{-1} mielių ekstraktas, + 5 g l^{-1} peptonas; 3 – 30 g l^{-1} melasa, + 5 g l^{-1} mielių ekstraktas, + 5 g l^{-1} peptonas; 4 – MRS sultinys + 10 g l^{-1} KMC; 5 – „Nutrient“ sultinys; 6 – „Nutrient“ sultinys“ + 10 g l^{-1} KMC; 7 – „Nutrient“ sultinys“ + 10 g l^{-1} gliukozė; 8 – „Nutrient“ sultinys“ + 5 g l^{-1} KMC; 9 – „Nutrient“ sultinys“ + 5 g l^{-1} gliukozė

Fig. 3. Influence of fermentation time on *B. subtilis* 88 bacterial biomass (g l^{-1}) formation at 30°C in different media: 10 g l^{-1} molasses, + 5 g l^{-1} yeast extract, + 5 g l^{-1} peptone (1); 20 g l^{-1} molasses, + 5 g l^{-1} yeast extract, + 5 g l^{-1} peptone (2); 30 g l^{-1} molasses, + 5 g l^{-1} yeast extract, + 5 g l^{-1} peptone (3); MRS broth + 10 g l^{-1} CMC (4); Nutrient broth (5); Nutrient broth + 10 g l^{-1} CMC (6); Nutrient broth + 10 g l^{-1} glucose (7); Nutrient broth + 5 g l^{-1} CMC (8); Nutrient broth + 5 g l^{-1} glucose (9)



4 pav. Fermentacijos trukmės įtaka *B. subtilis* 88 bakterijų biomasės (g l^{-1}) susidarymui, bakterijas kultivuojant 45°C temperatūroje skirtingose terpėse: 1 – 10 g l^{-1} melasa, + 5 g l^{-1} mielių ekstraktas, + 5 g l^{-1} peptonas; 2 – 20 g l^{-1} melasa, + 5 g l^{-1} mielių ekstraktas, + 5 g l^{-1} peptonas; 3 – 30 g l^{-1} melasa, + 5 g l^{-1} mielių ekstraktas, + 5 g l^{-1} peptonas; 4 – MRS sultinys + 10 g l^{-1} KMC; 5 – „Nutrient“ sultinys; 6 – „Nutrient“ sultinys“ + 10 g l^{-1} KMC; 7 – „Nutrient“ sultinys“ + 10 g l^{-1} gliukozė; 8 – „Nutrient“ sultinys“ + 5 g l^{-1} KMC; 9 – „Nutrient“ sultinys“ + 5 g l^{-1} gliukozė

Fig. 4. Influence of fermentation time on *B. subtilis* 88 bacterial biomass (g l^{-1}) formation at 45°C in different media: 10 g l^{-1} molasses, + 5 g l^{-1} yeast extract, + 5 g l^{-1} peptone (1); 20 g l^{-1} molasses, + 5 g l^{-1} yeast extract, + 5 g l^{-1} peptone (2); 30 g l^{-1} molasses, + 5 g l^{-1} yeast extract, + 5 g l^{-1} peptone (3); MRS broth + 10 g l^{-1} CMC (4); Nutrient broth (5); Nutrient broth + 10 g l^{-1} CMC (6); Nutrient broth + 10 g l^{-1} glucose (7); Nutrient broth + 5 g l^{-1} CMC (8); Nutrient broth + 5 g l^{-1} glucose (9)

20 g l⁻¹ : 30 °C – 69 ± 6 g l⁻¹, 45 °C – 49 ± 5 g l⁻¹) per pirmas 24 val., vėliau biomasės kiekis mažėjo. 30 g l⁻¹ melasos ir MRS sultinio terpėse biomasės kiekis augo 72 val., o po 72 val. buvo didžiausias (atitinkamai 30 g l⁻¹: 30 °C – 75 ± 6 g l⁻¹, 45 °C – 30 ± 4 g l⁻¹, MRS: 30 °C – 63 ± 5 g l⁻¹, 45 °C – 30 ± 4 g l⁻¹).

Didžiausias biomasės kiekis „Nutrient“ sultinyje su 10 g l⁻¹ KMC, 5 g l⁻¹ KMC ir 5 g l⁻¹ gliukozės buvo pasiektas po 48 val. auginimo, esant 30 °C, tiek ir 45 °C. „Nutrient“ sultinyje ir „Nutrient“ sultinyje, papildytame 10 g l⁻¹ gliukozės, didžiausias biomasės prieaugis skyrėsi priklausomai nuo temperatūros: „Nutrient“ sultinio terpėje esant 30 °C po 48 val. (43 ± 4 g l⁻¹), o 45 °C – po 24 val. (45 ± 5 g l⁻¹), „Nutrient“ sultinio terpėje su 10 g l⁻¹ gliukozės atvirkščiai – esant 30 °C po 24 val. (59 ± 6 g l⁻¹), o 45 °C – po 48 val. (68 ± 7 g l⁻¹). Biomasės kiekis šiose penkiose terpėse buvo panašus esant 30 °C ir 45 °C temperatūroms.

Auginant bakterijas 30 °C temperatūroje biomasės kiekis buvo vidutiniškai 18 % didesnis, nei kultivuojant 45 °C temperatūroje.

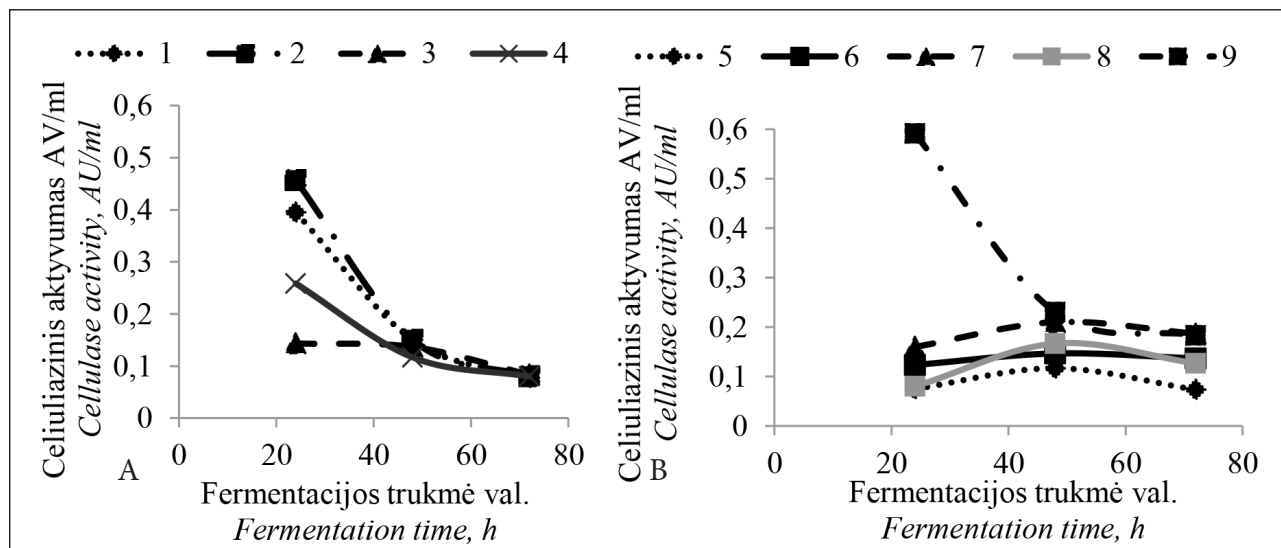
Didžiausias biomasės prieaugis buvo nustatytas po 72 val. kultivavimo esant 30 °C temperatūrai

terpėje, turinčioje 30 g l⁻¹ melasos su mielių ekstraktu (5 g l⁻¹) ir peptonu (5 g l⁻¹). Šis prieaugis siekė 75 ± 6 g l⁻¹.

Fermentacijos trukmės įtaka *B. subtilis* 88 celiuliaziniam aktyvumui

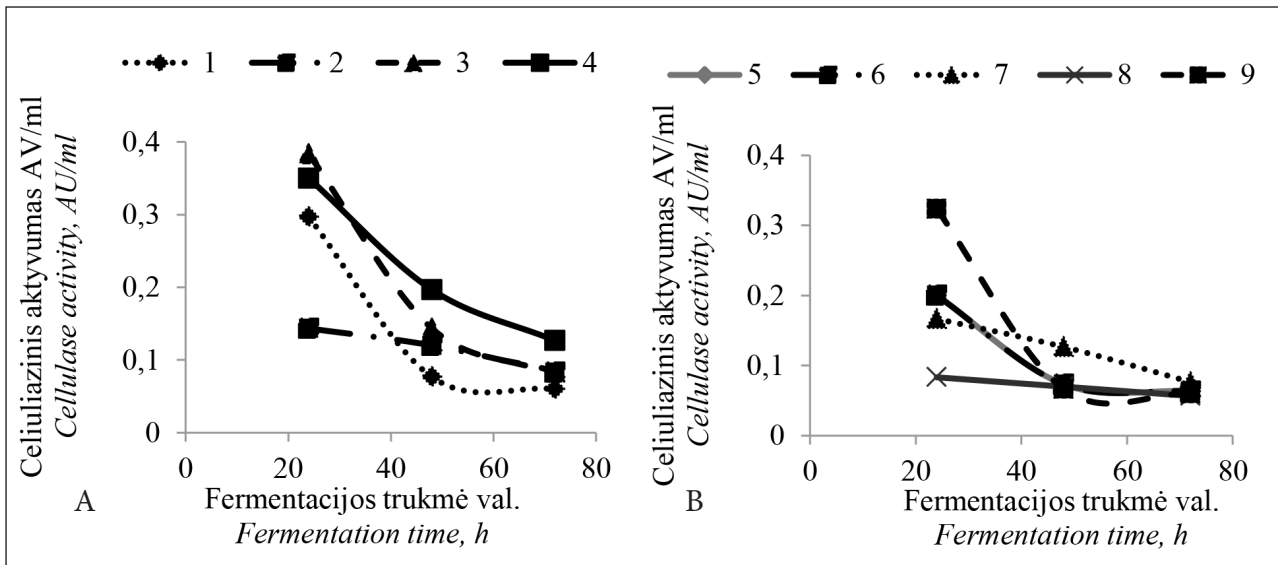
Nustatyta celiuliazijų aktyvumo priklausomybė nuo bakterijų *Bacillus subtilis* 88 kultivavimo trukmės skirtingose temperatūrose – 30 °C ir 45 °C (5 ir 6 pav.).

Daugeliu atvejų celiuliazinis aktyvumas didžiausias buvo po 24 val. kultivavimo, ši tendencija pastebima esant 30 °C ir 45 °C temperatūroms skirtingų koncentracijų melasos terpėse (10 g l⁻¹ : 30 °C – 0,4 ± 0,02 AV/ml, 45 °C – 0,3 ± 0,02 AV/ml, 20 g l⁻¹ : 30 °C – 0,46 ± 0,03 AV/ml, 45 °C – 0,14 ± 0,02 AV/ml, 30 g l⁻¹ : 30 °C – 0,14 ± 0,02 AV/ml, 45 °C – 0,38 ± 0,03 AV/ml) MRS sultinio (30 °C – 0,26 ± 0,01 AV/ml, 45 °C – 0,35 ± 0,02 AV/ml) bei „Nutrient“ su 5 g l⁻¹ gliukozės terpėse (30 °C – 0,59 ± 0,04 AV/ml, 45 °C – 0,32 ± 0,03 AV/ml). Esant 45 °C temperatūrai ir kitose „Nutrient“ sultinio terpėse didžiausias *B. subtilis* 88 celiuliazinis aktyvumas pasireiškė po 24 val. kultivavimo („Nutrient“ sultinio



5 pav. Fermentacijos trukmės įtaka bakterijų celiuliaziniam aktyvumui (AV/ml), kultivuojant 30 °C temperatūroje skirtingose terpėse: 1 – 10 g l⁻¹ melasa, + 5 g l⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l⁻¹ peptonas; 2 – 20 g l⁻¹ melasa, + 5 g l⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l⁻¹ peptonas; 3 – 30 g l⁻¹ melasa, + 5 g l⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l⁻¹ peptonas; 4 – MRS sultinys + 10 g l⁻¹ KMC; 5 – „Nutrient“ sultinys; 6 – „Nutrient“ sultinys“ + 10 g l⁻¹ KMC; 7 – „Nutrient“ sultinys“ + 10 g l⁻¹ gliukozė; 8 – „Nutrient“ sultinys“ + 5 g l⁻¹ KMC; 9 – „Nutrient“ sultinys“ + 5 g l⁻¹ gliukozė

Fig. 5. Influence of fermentation time on *B. subtilis* 88 cellulase activity (AU/ml) at 30°C in different media: 10 g l⁻¹ molasses, + 5 g l⁻¹ yeast extract, + 5 g l⁻¹ peptone (1); 20 g l⁻¹ molasses, + 5 g l⁻¹ yeast extract, + 5 g l⁻¹ peptone (2); 30 g l⁻¹ molasses, + 5 g l⁻¹ yeast extract, + 5 g l⁻¹ peptone (3); MRS broth + 10 g l⁻¹ CMC (4); Nutrient broth (5); Nutrient broth + 10 g l⁻¹ CMC (6); Nutrient broth + 10 g l⁻¹ glucose (7); Nutrient broth + 5 g l⁻¹ CMC (8); Nutrient broth + 5 g l⁻¹ glucose (9)



6 pav. Fermentacijos trukmės įtaka bakterijų celiuliaziniam aktyvumui (AV/ml), kultivuojant 45 °C temperatūroje skirtingose terpėse: 1 – 10 g l⁻¹ melasa, + 5 g l⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l⁻¹ peptonas; 2 – 20 g l⁻¹ melasa, + 5 g l⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l⁻¹ peptonas; 3 – 30 g l⁻¹ melasa, + 5 g l⁻¹ mielių ekstraktas, + 5 g l⁻¹ peptonas; 4 – MRS sultinys + 10 g l⁻¹ KMC; 5 – „Nutrient“ sultinys; 6 – „Nutrient“ sultinys“ + 10 g l⁻¹ KMC; 7 – „Nutrient“ sultinys“ + 10 g l⁻¹ gliukozė; 8 – „Nutrient“ sultinys“ + 5 g l⁻¹ KMC; 9 – „Nutrient“ sultinys“ + 5 g l⁻¹ gliukozė

Fig. 6. Influence of fermentation time on *B. subtilis* 88 cellulase activity (AU/ml) at 45°C in different media: 10 g l⁻¹ molasses, + 5 g l⁻¹ yeast extract, + 5 g l⁻¹ peptone (1); 20 g l⁻¹ molasses, + 5 g l⁻¹ yeast extract, + 5 g l⁻¹ peptone (2); 30 g l⁻¹ molasses, + 5 g l⁻¹ yeast extract, + 5 g l⁻¹ peptone (3); MRS broth + 10 g l⁻¹ CMC (4); Nutrient broth (5); Nutrient broth + 10 g l⁻¹ CMC (6); Nutrient broth + 10 g l⁻¹ glucose (7); Nutrient broth + 5 g l⁻¹ CMC (8); Nutrient broth + 5 g l⁻¹ glucose (9)

terpė – 0,08 ± 0,01 AV/ml, „Nutrient“ sultinio terpė su 10 g l⁻¹ KMC – 0,2 ± 0,01 AV/ml, 10 g l⁻¹ gliukozės – 0,17 ± 0,01 AV/ml ir 5 g l⁻¹ KMC – 0,08 ± 0,01 AV/ml). Kultivuojant 30 °C temperatūroje „Nutrient“ sultinio terpėje ir „Nutrient“ sultinio terpėse su 10 g l⁻¹ KMC, 10 g l⁻¹ gliukozės ir 5 g l⁻¹ KMC, didžiausias celiuliazinis aktyvumas buvo pasiektas po 48 val. (atitinkamai 0,12 ± 0,02 AV/ml, 0,15 ± 0,02 AV/ml, 0,21 ± 0,02 AV/ml, 0,17 ± 0,01 AV/ml).

Didžiausias *B. subtilis* 88 celiuliazinis aktyvumas buvo gautas po 24 val. kultivavimo esant 30 °C temperatūrai „Nutrient“ sultinio terpėje su 5 g l⁻¹ gliukozės. Šiuo atveju celiuliazinis aktyvumas siekė 0,59 ± 0,04 AV/ml. Mokslininkas A. P. Nandmathas ir kt. (2016) taip pat tyrė *Bacillus* genties bakterijas ir nustatė, kad celiuliazinis aktyvumas yra didžiausias, kai bakterijos kultivuojamos 30 °C temperatūroje. Mūsų tyrimo atveju, celiuliazinis aktyvumas *B. subtilis* 88 kultivuojant 30 °C temperatūroje buvo didesnis, palyginti su kultivuojamu 45 °C temperatūroje.

IŠVADOS

1. Iš visų išskirtų dirvožemio bakterijų celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo 6 bakterijų izoliatai. Jų aktyvumas buvo nuo 0,33 ± 0,02 AV/ml iki 0,52 ± 0,03 AV/ml.

2. Iš penkių *Bacillus* genčiai priklausančių bakterijų atrinkta didžiausiu celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjusi padermė, priklausanti *Bacillus subtilis* rūšiai.

3. Didžiausias celiuliazinis aktyvumas *Bacillus subtilis* 88 (0,59 ± 0,04 AV/ml) buvo gautas po 24 val. kultivavimo 30 °C temperatūroje. Terpę sudarė „Nutrient“ sultinys ir gliukozė (5 g l⁻¹).

4. Melasą būtų galima naudoti kaip pigų anglies šaltinį bakterijų kultivavimui ir celiuliazijų gavimui. Kultivuojant *B. subtilis* bakterijas melasos terpėje, celiuliazinis aktyvumas, palyginti su MRS ir „Nutrient“ sultiniais, buvo panašus arba net didesnis.

LITERATŪRA

1. Behera B. C., Sethi B. K., Mishra R. R., Dutta S. K., Thatoi H. N. 2017. Microbial cellulases – diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: a review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. Vol. 15(1). P. 197–210.
2. Bhat M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. Vol. 18. P. 355–383.
3. Čižeikienė D., Juodeikienė G., Damašius J. 2018. Use of wheat straw biomass in production of L-lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus *Lactobacillus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Vol. 15. P. 185–191.
4. De Castro A. M., de Albuquerque de Carvalho M. L., Leite S. G. F., Pereira N. Jr. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. 37(2). P. 151–158.
5. Duan C. J., Feng J. X. 2010. Mining metagenomes for novel cellulase genes. *Biotechnology Letters*. Vol. 32(12). P. 1765–1775.
6. Dutta T., Sahoo R., Sengupta R., Ray S. S., Bhattacharjee A., Ghosh S. 2008. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. 35(4). P. 275–282.
7. Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F., Xi Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*. Vol. 99(16). P. 7623–7629.
8. Gusakov A. V. 2011. Alternative to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*. Vol. 29(9). P. 419–425.
9. Ladeira S. A., Cruz E., Delatorrea A. B., Barbosa J. B., Martins M. L. 2015. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 18(2). P. 110–115.
10. Manhar A. K., Bashir Y., Saikia D., Nath D., Gupta K., Konwar B. K., Kumar R., Namsa N. D., Mandal M. 2016. Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An *in-vitro* study with regards to application as an animal feed additive. *Microbiological Research*. Vol. 186–187. P. 62–70.
11. Mickevičius V. 2008. *Biokatalizatoriai organinėje sintezėje*: mokomoji knyga. Vilnius: Vilniaus pedagoginio universiteto leidykla. 98 p.
12. Nandimath A. P., Kharat K. R., Gupta S. G., Kharat A. S. 2016. Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 10(13). P. 410–419.
13. Sendžikaitė I., Čižeikienė D., Raudonienė V., Paškevičius A. 2018. Mikroskopinių grybų, išskirtų iš gamtinės aplinkos, produkuojamų celiuliazinių aktyvumo tyrimai. *Žemės ūkio mokslai*. Nr. 25(4). P. 198–204.
14. Tomme P., Driver D. P., Amandoron E. A., Miller R. C. Jr., Antony R., Warren J., Kilburn D. G. 1995. Comparison of fungal (family I) and bacterial (family II) cellulose-binding domain. *Journal of Bacteriology*. Vol. 177(15). P. 4356–4363.
15. Varnaitė R., Paškevičius A., Raudonienė V. 2011. Cellulose degradation in rye straw by micromycetes and their complexes. *Ekologija*. Vol. 54. No. 1. P. 29–31.
16. Varnaitė R., Raudonienė V., Bridžiuviene D. 2011. Enzymatic biodegradation of lignin-cellulose complex in plant origin material. *Materials Science (Medžiagotyra)*. Vol. 17(1). P. 99–103.
17. Watanabe H., Tokuda G. 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*. Vol. 55. P. 609–632.
18. Zhang X. Z., Percival Zhang Y. H. 2013. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. In: *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. John Wiley & Sons. P. 131–146.

Ieva Gaidė, Dalia Čižeikienė

THE STUDY OF BACTERIA CELLULASES ISOLATED FROM THE SOIL AND POSSIBILITIES OF USING DIFFERENT MEDIA FOR THE FORMATION OF CELLULASES

S u m m a r y

Enzymes cellulases are important because of their ability to decompose cellulose, which is a part of lignocellulosic biomass. It is possible to produce bioproducts and biofuels that are environmentally friendly using these enzymes. It is relevant to investigate cellulases produced by bacteria, which are found in air or soil. The aim of this work is to investigate the activity of cellulases produced by bacteria isolated from the soil and to determine the influence of fermentation conditions and different nutrient media on the growth of bacteria and the activity of cellulases produced by them. In the present work, we investigated bacteria, which were isolated from natural environmental sources. 43 bacteria isolates were isolated from the soil. It was found that six isolates showed cellulolytic activity. In addition, five different *Bacillus* sp. bacteria, which were isolated from the environment earlier, were tested. The highest cellulolytic activity was produced by *B. subtilis* 88. The influence of cultivation time, temperature and medium was studied. The highest cellulases activities were obtained in Nutrient broth with glucose (5 g l⁻¹) at 30°C after 24 h of fermentation. In addition, molasses is a by-product of the sugar industry, which can be applied to cultivate bacteria belonging to *Bacillus* genus and produce bioproducts. In this work, cellulases activities of *B. subtilis* 88 after cultivation in the molasses medium were obtained similar or even higher compared with those of MRS and Nutrient broths.

Keywords: soil bacteria, *Bacillus* sp., cellulases activities, molasses