

**MINIMALIZÁCIA ZDROJOV UHLÍKA VO VZŤAHU KU PRODUKCIÍ  
HYDROLÁZ BAKTÉRIAMI *BACILLUS SUBTILIS* A *BACILLUS LICHENIFORMIS*  
MINIMISATION OF CARBON SOURCES IN RELATIO TO HYDROLASES  
PRODUCTION BY CULTURES OF *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS*  
*LICHENIFORMIS***

Dana Urminská, Ján Ambróš, Eva Szabová

**ABSTRACT**

Bacterial cultures of *Bacillus* sp. viz. *Bacillus subtilis* 2267, *Bacillus subtilis* 2268, *Bacillus licheniformis* L-3 and *Bacillus licheniformis* L-7/7 used plant groats: fodder wheat and barley, and also malt, oat, amaranthus, buckwheat, soybean, rice, corn and potato seedcase - as carbon source in the nutrient medium. The best producer of amylases was found to be *Bacillus subtilis* strain 2268, which was cultured in medium consisting of 2.5 % and 5 % amaranthus. It was observed that *Bacillus licheniformis* strains L3 and 7/79 were better producers of extracellular peptidases, mainly in medium containing amarantus, wheat, buckwheat, oat and soybean. From the commercial point of view for amylases and peptidases production it is not necessary to apply main food crops such as wheat, barley, corn and rice, but materials such as potato seedcase, buckwheat and amaranthus may serve as suitable alternates in relation to sources of nutrients.

**Key words:** *Bacillus*, amylase, peptidase, carbon sources

---

**ÚVOD**

Biotechnologické výroby sú založené na využití metabolizmu, jeho medzistupňov a konečných produktov, ktoré vznikajú v bunkách mikroorganizmov, rastlín a živočíchov. Základom biotechnologických výrob je predovšetkým využívanie mikroorganizmov, z ktorých významné miesto majú baktérie, ktoré sa aplikujú pri výrobe enzýmov, organických kyselín, sacharidov, pri mliečnom kvasení a výrobe niektorých antibiotík. Mikrobiálne enzýmy majú široké uplatnenie v potravinárskom a pivovarníckom priemysle, amylázy na stekutenie a hydrolýzu škrobu a glukózových sirupov; peptidázy na hydrolýzu proteínov a úpravu mliečnych bielkovín pri výrobe syrov; pektinázy na zlepšenie extrakcie ovocných džúsov a predchádzanie tvorby zákalov vo fermentovaných džúsoch; glukózaizomeráza v produkcii sacharózových sirupov, mikrobiálne peptidázy a lipázy majú nezastupiteľné miesto v „biologických“ detergentoch (Balasubramanian et al., 2004, Salleh et al., 2006).

Baktérie rodu *Bacillus* sú aeróbne, endospóry tvoriace, Gram-pozitívne bacily. Vďaka neprítomnosti vonkajšej membrány u Gram-pozitívnych baktérií dokážu zástupcovia tohto druhu vylučovať veľké množstvo extracelulárnych proteínov priamo do živného média (Humphery-Smith, Hecker, 2006). *Bacillus subtilis* je pôdny mikroorganizmus, často izolovaný aj z vody, vzduchu a z rozkladajúcich sa zvyškov rastlín. Uvedené prostredie obsahuje široké spektrum rôznych uhlíkatých substrátov, vrátane veľkého množstva polysacharidov pochádzajúcich z rastlín, zvierat a mikroorganizmov. *Bacillus subtilis* produkuje veľké množstvo glykolytických enzýmov, napr.  $\alpha$ -amylázy, pullulázy, endo- $\beta$ -1,4-manázu, levanózu, glukán-1,4- $\alpha$ -maltohydrolázu, pektátlyázy a endo-1,4- $\beta$ -xylanázy, ktoré sú vylučované do bezprostredného okolia buniek (Sonenshein et al., 2002). Okrem týchto enzýmov *Bacillus subtilis* produkuje aj proteolytické enzýmy, a je tak vhodným organizmom pre výrobu čistých biochemikálií, nukleotidov, vitamínov a aminokyselín (Waites et al., 2005) a vo farmácii je spolu s *Bacillus licheniformis* využívaný na produkciu antibiotika

---

bacitracín (Sharma, 2004). Niektoré kmene sú využívané v ochrane rastlín proti hubovým patogénom (Waites et al., 2005). Pretože produkty metabolizmu tejto baktérie sú tradične používané v potravinárstve, je *Bacillus subtilis* klasifikovaný ako GRAS (Generally Regarded As Safe) – všeobecne považovaný za bezpečný (Walsh, 2002) a preto je prirodzeným hostiteľským organizmom využívaným pre produkciu proteínov využitím technológie rekombinantnej DNA (Schaechter et Lederberg, 2004; Waites et al., 2005). *Bacillus licheniformis* je dlhodobo používaný v priemyselnej výrobe exoenzýmov. Významné je poľnohospodárske využitie ako PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) – baktéria podporujúca rast rastlín. *Bacillus licheniformis* je možné aplikovať aj ako expresný systém pre markérové gény, pretože výsledné rekombinované druhy môžu byť využívané napr. pri rýchlejšej a efektívnej detekcii rastových podmienok vhodných pre veľkopriemyslovú výrobu, alebo pri *in situ* detekcii druhov v prírode (Tamagnini et al., 2008).

Väčšina druhov *Bacillus* je schopná rásť na/v relatívne jednoduchom živnom médiu (Todar, 2009). Všeobecne sú sacharidy výborným zdrojom uhlíka a energie, najmä glukóza, ktorá je preferovaným substrátom väčšiny mikroorganizmov (Waites et al., 2005). V priemyselnej výrobe sa ako zdroje uhlíka často používajú: glukóza, hydrolyzovaný škrob, laktóza, sušená srvátka, škrob (jačmenný, arašidová múka, ovsená múka, ražná múka, sójová múka), sacharóza alebo melasa (Smith, 2004). Zdrojmi dusíka môžu byť anorganické amónne soli a dusičnany, močovina alebo komplexné suroviny ako jačmenná múka, repná melasa, kukuričný výluh, arašidová múka, ovsená múka, bavlníková múka, ražná múka, sójová múka, sušená srvátka (Smith, 2004). Vodík a kyslík môžu byť zabezpečené z vody a organických zlúčenín. Fosfor je prístupný v anorganickej forme (Waites et al., 2005) a síra je pridávaná vo forme sulfidových a síranových solí, alebo ako súčasť komplexných surovín obsahujúcich sírne aminokyseliny (Waites et al., 2005).

Práca bola zameraná na minimalizáciu zdrojov uhlíka v živnom médiu pre kultiváciu baktérií *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* a na sledovanie vplyvu zmien v zložení živného média na produkciu vybraných hydrolytických enzýmov.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Rastlinné substráty – zdroje uhlíka v živnom médiu*

Ako zdroje uhlíka v živnom médiu pre kultiváciu baktérií rodu *Bacillus* boli použité rastlinné šroty: pšeničný, jačmenný – jačmeň kýmny a jačmeň sladovnícky, ovsený, láskavcový (láskavec metlinatý), pohánkový, sójový, ryžový, kukuričný a rozomleté zemiakové šupky (VPP SPU, s. s r.o.)

### *Použité kmene mikroorganizmov*

Ako produkčné kmene pre prípravu hydroláz boli použité kmene získané z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne - *Bacillus subtilis* -2267 (ďalej BS-2267), *Bacillus subtilis* -2268 (ďalej BS-2268), *Bacillus licheniformis* L-3 (ďalej BL-L3) a *Bacillus licheniformis* L-7/79 (ďalej BL-L7/79).

### *Zloženie živného média a kultivačné podmienky*

Pri tvorbe živnej pôdy sa vychádzalo z poznatkov Urminskej (1997) a Szabovej (2005), ktoré optimalizovali zloženie živnej pôdy pre vybrané kmene *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* pre vysokú produkciu extracelulárnych peptidáz. Zloženie optimalizovanej živnej pôdy bolo nasledovné: 1 % (hm.%) sušeného mlieka, 0,3 % (hm.%) kvasničného autolyzáta, 0,5 % (hm.%) škrobu a 20 % (obj.%) prídavku sladinky. pH živného média bolo

pred sterilizáciou upravené na 8,4.

V práci bol škrob nahradený komplexnejšou formou, ktorou boli rastlinné šroty z plodín: pšenica, jačmeň jarný sladovnícky, jačmeň jarný krmny, sušené šupky zo zemiakov, láskavec (metliny so semenami), pohánka, sója, ovos, ryža natural a kukurica. Ako referenčné zložky živnej pôdy boli použité čistá glukóza a kukuričný škrob. Kultivácia prebiehala v klimatizovanej miestnosti, v kultivačných baniach o objeme 1000 cm<sup>3</sup>, s objemom média 100 cm<sup>3</sup> na závesnej trepačke pri 280 ot.min<sup>-1</sup> a teplote 37 °C. Doba kultivácie bola 48 hodín. Aerácia média bola zabezpečená cez priedušnú zátku. Po uplynutí času kultivácie boli bakteriálne bunky odstredenú 4000 ot. min<sup>-1</sup> počas 10. minút (Beckmann Avanti J-25). V supernatante bola stanovená aktivita extracelulárnych amyláz a peptidáz fotometrickou metódou reakciou s chromogénnym substrátom (UV-VIS Spectrophotometer Jasco V-530).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

V pôvodnej, optimalizovanej živnej pôde pre kultiváciu *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* bol ako základný zdroj uhlíka použitý čistý kukuričný škrob. Tento substrát bol nahradzovaný inými zdrojmi, komplexnými rastlinnými surovinami, s cieľom znížiť ekonomickú náročnosť produkcie enzýmov. Možnou nevýhodou takýchto rastlinných surovín sú endogénne aktivity  $\alpha$ - a  $\beta$ -amyláz,  $\beta$ -glukanáz, peptidáz, lipáz, lipoxygenáz a fytáz (Kent, Evers, 1994). Základná charakteristika substrátov je uvedená v tabuľke 1.

**Tabuľka 1** Obsah sacharidov v rastlinných substrátoch

Vzorka	škrob	redukujúce sacharidy <sup>1</sup>	neredukujúce sacharidy <sup>2</sup>	celkové sacharidy	vláknina	sušina
	%					
pšeničný šrot	55,61	1,350	0,650	2,000	2,10	91,71
krmny jačmeň šrot	52,0	0,950	2,550	3,500	3,50	89,79
jačmeň jarný šrot	29,63	0,510	0,490	1,000	3,85	93,23
zemiakové šupy	47,39	1,250	1,950	3,200	3,75	93,06
láskavec metlinatý šrot	11,96	0,650	0	0,650	13,84	91,70
pohánka šrot	61,82	0,325	0,550	0,875	1,20	90,32
sójový šrot	0	0,425	7,175	7,600	8,65	93,24
ovsený šrot	33,80	0,630	0,645	1,275	11,57	91,63
ryža NATURAL šrot	64,93	0,500	0,175	0,675	0,96	90,76
kukuricičný šrot	57,12	0,425	1,575	2,000	2,40	93,28

Vysvetlivky: <sup>1</sup> redukujúce sacharidy - glukóza, fruktóza, maltóza

<sup>2</sup> neredukujúce sacharidy - sacharóza

Rastlinné substráty, predovšetkým šroty, sa považujú za komplexné zdroje, ktoré okrem sacharidových zložiek obsahujú aj dusíkaté látky, lipidy, minerálne prvky a vitamíny. Aplikované substráty obsahovali rôzne množstvá dusíkatých látok a bielkovín (Tab. 2).

**Tabuľka 2** Obsah dusíkatých látok v rastlinných substrátoch

Názov vzorky	Celkový N, %	Celkový N * koef., %	Bielkovinový N, %
Pšeničný šrot	1,543	8,795	1,452
Jačmenný šrot (kŕmny)	1,122	6,395	1,017
Jačmeň jarný (sladovnícky)	1,613	9,194	1,578
Zemiakové šupky	1,473	8,838	0,793
Láskavec	2,245	12,797	1,473
Pohánka	1,683	10,098	1,403
Sójový šrot	4,840	27,59	4,770
Ovsený šrot	1,599	9,322	1,522
Ryžový šrot	0,982	5,843	1,052
Kukuričný šrot	1,515	9,090	1,403

Chemické zloženie pšeničného zrna tvorí 13,6 % vody, 10 - 16 % bielkovín, 63,8 % sacharidov, 2,2 % lipidov, 2,4 % vlákniny a 2 % popolovín (Špaldon et al., 1986). Zo sacharidov obsahuje priemerne 57,5 % škrobu, 1,78 % maltózy a 0,58 % sacharózy (Vojtaššáková et al., 1999). Jačmenný šrot obsahuje 10 % bielkovín, 1,88 % lipidov, 71 % sacharidov a 2,4 % minerálnych látok (Vojtaššáková et al., 1999). Obsah škrobu je v priemere 58,47 %. Množstvo voľnej glukózy 0,1 % je oproti voľnej sacharóze 0,98 % nízke. Chemické zloženie zrna ovsu tvorí 11,48 % vody, 11,49 % bielkovín, (niekedy aj viac ako 18 %) a vysoký obsah tuku - 5 až 7. Zaujímavosťou ovsu je obsah bezdusíkatých látok, najmä škrobu, dextrínov a látok obsahujúcich cukry, zvlášť vysoký je obsah pentózanov (Špaldon et al., 1986; Karabínová et al., 1997; Vojtaššáková et al., 1999). Pohánka obsahuje dobre stráviteľné sacharidy (71 % – 75 %), z toho v priemere 57 % škrobu, bielkoviny (8,3 % – 12 %), tuky (1,5 % – 3,3 %) a minerálne látky (1,4 % – 3,5 %) (Vojtaššáková et al., 1999). Zrno láskavca je významným zdrojom bielkovín, obsahuje 16,8 % proteínov s dobre vybilancovaným zložením esenciálnych aminokyselín (Francis et al., 2006). Kukurica podľa Vojtaššákovvej et al., (1999) obsahuje 9 % bielkovín, 3,86 % lipidov, 72,21 % sacharidov a 1,3 % minerálnych látok. Obsah škrobu je okolo 63 %, voľnej glukózy 0,225 % a sacharózy 1,3 %. Ryža obsahuje priemerne 7,22 % proteínov, 2,20 % lipidov, 76,2 % sacharidov, z ktorých až 72 % tvorí škrob a 1,2 % minerálnych látok (Vojtaššáková et al., 1999). Sója je charakteristická vysokým obsahom proteínov (24 – 50 %) a lipidov (9,8 – 27,8 %). Naproti tomu má nízky obsah sacharidov (19 – 35 %), obzvlášť škrobu (0,5 – 9 %) (Vojtaššáková et al., 1999).

Najvyšší obsah škrobu bol stanovený v ryži, a to 64,93 %, potom v pohánke lúpanej 61,82 % a v kukurici, 57,12 %. Naproti tomu, láskavec metlinatý je plodina, ktorá obsahuje len veľmi nízke koncentrácie škrobu, do 12 %. Najvyšší obsah celkových sacharidov bol stanovený v sóji, a to 7,60 %, ďalej v jačmeni kŕmnom 3,50 % a zemiakových šupkách 3,20 %. Láskavec metlinatý obsahoval najmenej celkových sacharidov 0,65 %, čo boli vlastne čisté redukujúce sacharidy – glukóza, fruktóza a maltóza. Naproti tomu, najvýdatnejší zdroj vlákniny bol práve láskavec metlinatý 13,84 %, ďalej ovsený šrot 11,57 % a sója 8,65 %. Najchudobnejším zdrojom vlákniny bola ryža natural s obsahom 0,96 %. Podiel sušiny varíroval od 89,79 % pri jačmeni kŕmnom, po 93,24 % v sóji. Obsah dusíka zohráva významnú úlohu, hlavne v podobe bielkovín a aminokyselín, ktoré tvoria základné stavebné komponenty bunkovej hmoty.

## potravinárstvo

Obsah celkového dusíka bol najväčší v sóji 4,84 %, ďalej v laskavci metlinatom 2,24 % a v pohánke 1,68 %. Najmenej celkového dusíka obsahovala ryža. V obsahu bielkovinového dusíka dominovala sója 4,77 %, jačmeň jarný 1,57 % a ovsený šrot 1,52 %. Najmenej bielkovinového dusíka sa nachádzalo v zemiakových šupách.

### *Extracelulárne amylázy*

Kultiváciou baktérií v živnej pôde, ktorá obsahovala čistý kukuričný škrob (Tab. 3) boli získané referenčné hodnoty, pretože produkcia amyláz je podmienená prítomnosťou škrobu. Kultivácia s prídavkom ostatných substrátov bola vždy realizovaná s koncentráciou 0,5 % až 10 % s jedným bakteriálnym kmeňom. Na základe experimentálnej práce, pri ktorej sa okrem aktivity extracelulárnych enzýmov posudzovala aj konzistencia živného média, možnosť premiešavania, a tým aj prestupu kyslíka do živného média, sa kultivácia ostatných bakteriálnych kmeňov uskutočnila iba v živnom médiu s takou koncentráciou uhlíkatého substrátu, ktorá umožňovala rovnomerné premiešavanie a aeráciu média.

**Tabuľka 3** Aktivita amyláz, [ $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ].

Substrát – zdroj uhlíka, koncentrácia	BS – 2267	BS - 2268	BL - L3	BL - L7/79
Kukuričný škrob 0,5%	5,6	5,43	7,69	6,16
Glukóza 0,5%	2,80	2,07	1,68	1,68
1%	3,15	1,88	2,07	2,62
1,5%	2,62	2,26	2,07	6,48
Pšeničný šrot 0,5%	13,75	3,83	3,66	3,66
1%	3,15	3,32	3,49	2,62
2,5%	3,83	7,46	2,07	1,88
5%	1,48	1,88	1,88	5,90
7,5%	1,04	-	-	-
10%	4,48	-	-	-
Šrot z jačmeňa kŕmneho 0,5%	4,80	2,80	13,02	13,26
1%	4,32	2,44	3,32	12,28
2,5%	15,60	1,68	8,02	8,58
5%	1,04	1,48	1,48	5,75
7,5%	-	-	6,34	-
10%	-	-	2,80	-
Šrot z jačmeňa jarného 0,5%	4,64	2,80	2,80	3,60
1%	3,66	3,15	4,00	3,90
2,5%	3,32	9,70	2,62	2,44
5%	1,04	1,88	7,32	1,88
7,5%	-	3,40	-	-
10%	-	7,74	-	-
Zemiakové šupy 0,5%	4,92	3,66	3,83	15,94
1%	4,96	3,49	4,80	3,83
2,5%	4,70	4,32	17,15	4,16
5%	4,40	3,15	14,55	2,98
7,5%	-	-	2,44	-
10%	-	-	2,62	-

**potravinárstvo**

Láskavec metlinatý	0,5%	5,40	4,35	17,35	3,94
	1%	6,60	5,62	5,40	4,52
	2,5%	7,57	21,60	7,18	4,80
	5%	10,60	24,60	8,72	7,88
	7,5%	12,65	-	-	-
	10%	5,40	-	-	-
Šrot z pohánky	0,5%	5,22	4,00	3,86	2,44
	1%	4,58	2,62	4,32	2,80
	2,5%	4,96	1,52	2,80	1,60
	5%	2,44	1,88	2,80	1,76
	7,5%	-	-	-	4,96
	10%	-	-	-	4,80
Sójový šrot	0,5%	5,75	4,22	4,48	4,45
	1%	7,35	4,00	4,06	4,80
	2,5%	7,57	2,70	4,48	4,83
	5%	5,75	3,66	4,48	4,19
	7,5%	-	2,15	-	-
	10%	-	zákal - tuky	-	-
Ovsený šrot	0,5%	4,71	3,80	3,05	2,94
	1%	4,48	3,69	2,66	2,87
	2,5%	4,29	3,83	2,51	2,15
	5%	4,29	4,42	2,07	3,87
	7,5%	-	-	3,46	-
	10%	-	-	3,93	-
Ryžový šrot	0,5%	4,00	2,62	2,22	2,91
	1%	3,32	2,44	2,66	1,96
	2,5%	2,07	1,08	0,95	1,13
	5%	0,60	1,04	0,95	1,04
	7,5%	0,00	-	-	-
	10%	0,00	-	-	-
Kukuričný šrot	0,5%	3,01	1,26	1,26	2,03
	1%	3,66	1,16	1,72	2,30
	2,5%	4,03	0,73	1,08	1,72
	5%	2,03	1,72	1,35	1,04
	7,5%	-	-	-	2,33
	10%	-	-	-	2,44

Kultivačný pokus pre overenie metabolizmu baktérií produkujúcich extracelulárne hydrolázy sa realizoval v substráte s čistou glukózou, ktorá bola v koncentrácii 0,5 %, 1,0 % a 1,5 %. Predpokladalo sa, že produkcia amyláz bude minimálna. Potvrdili sa tak závery **El-Banna et al., (2007)**, ktorí zistili, že maximálna produkcia  $\alpha$ -amyláz pomocou *Bacillus subtilis* bola po 48 h inkubácii pri 40 °C a pH 7,5. Z viacerých sacharidov bol škrob (1 %) najlepším zdrojom uhlíka. Pre maximálnu produkciu alfa-amyláz baktériou *Bacillus subtilis* 147 **Avdiuk a Vabanets (2008)** odporúčajú ako optimálny zdroj uhlíka 0,1 % nerozpustný škrob a ako zdroj

dusíka 0,2 % dusičnan sodný, v pomere uhlík k dusíku 1:2.

Pšeničný šrot je substrát, ktorý obsahuje až 55 % škrobu. Pri kultivácii baktérií v živnej pôde so pšeničným šrotom sa výrazne zvýšila produkcia amyláz, najvyššie aktivity sa dosiahli použitím kmeňa BS-2267 pri koncentrácii 0,5 % ( $13,75 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Tento mikroorganizmus bol aplikovaný do všetkých sledovaných živných pôd, ktoré obsahovali pšeničný šrot v koncentrácii 0,5 – 10 %. Keďže živné pôdy s koncentraciou šrotu vyššou ako 5 % mali veľmi hustú konzistenciu, ktorá zabraňovala správnej a dostatočnej aerácii, pre ďalšie bakteriálne kmene bola použitá iba koncentrácia pšeničného šrotu do 5 %. Zvýšenie aktivity amyláz v živnej pôde s 10 % obsahom šrotu je pravdepodobne zapríčinené aktiváciou endogénnych rastlinných enzýmov.

Škrob, ktorý je v zrnách kŕmneho jačmeňa je vhodnejším substrátom pre *Bacillus licheniformis*, ako pre *Bacillus subtilis*. Kultivácia s celým spektrom koncentrácií jačmenného šrotu sa uskutočnila s kmeňom BL-L3. Najvyššia produkcia amyláz bola získaná kultiváciou v živnej pôde s 0,5 % jačmenným šrotom ( $13,02 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Zvýšenie koncentrácie šrotu nad 5 % opäť znamenalo zahustenie živnej pôdy, nedostatočnú aeráciu a premiešavanie, a aktiváciu endogénnych rastlinných amyláz.

Sladovnícky jačmeň obsahoval iba 29 % škrobu, zatiaľ čo kŕmny až 52 %, čo sa výrazne prejavilo aj na produkcii amyláz. Najvyššie aktivity extracelulárnych enzýmov sa stanovili v živnej pôde po kultivácii baktérií BS-2268 v prostredí 2,5 % jačmenného šrotu ( $9,70 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a BL-L3 v živnej pôde s 5 % jačmenným šrotom ( $7,32 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Nižší obsah šrotu v základnom substráte sa prejavil aj v hustote živnej pôdy, ktorá bola tekutejšia ako pri aplikácii pšenice a kŕmneho jačmeňa. Ako uvádzajú **Tang et al. (2004)**, boli polysacharidy, ako jačmenná múka, dextríny a rozpustný škrob pre rast buniek *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 a produkciu  $\beta$ -glukanázy lepšími zdrojmi uhlíka, ako mono- a disacharidy glukóza a maltóza.

Odpad pri spracovaní zemiakov na výrobu potravín ako sú rôzne polotovary, hranolky, čipsy a pod., teda zemiakové šupy s obsahom škrobu 47,39 % a bielkovinového dusíka 0,793 % bol lepším substrátom pre produkciu extracelulárnych amyláz pre kmene *Bacillus licheniformis*. Kmeň BL-7/79 lepšie rástol a produkoval enzýmy v substráte s koncentraciou 0,5 % ( $15,94 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), zatiaľ čo kmeň BL-L3 poskytol najväčšie výťažky enzýmu pri 2,5 % a 5 % substráte ( $17,15 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $14,55 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). **Shukla a Kar (2006)** zistili, že zemiakové šupy sú vhodnejším substrátom v systéme polotekej kultivácie, v porovnaní s pšeničnými otrubami, pre produkciu  $\alpha$ -amyláz termofilnými kmeňmi *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*.

Láskavec metlinatý obsahoval zo všetkých použitých substrátov najnižšiu koncentráciu škrobu, iba 11,96 %, na druhej strane sa však vyznačoval najvyšším podielom vlákniny, 13,84 %. Zaujímavosťou láskavca bola aj neprítomnosť voľných neredukujúcich sacharidov. Toto zloženie sa prejavilo v najlepšej produkcii kmeňa BS-2268 pri 2,5 % a 5 % substráte ( $21,60 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $24,60 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Pre kmeň BL-L3 boli vhodnejšie nižšie koncentrácie 0,5 %, naproti tomu kmeň BS-2267 mal svoje produkčné maximum pri 7,5 % koncentrácii ( $12,65 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), ktorá bola svojou konzistenciou polotekutá. Najnižšou produkciou enzýmov sa vyznačoval kmeň BL-7/79.

Prekvapivé výsledky boli získané pri pohánke. Na základe obsahu škrobu 61,82 % sa predpokladala oveľa vyššia produkcia amyláz všetkými produkčnými kmeňmi. Najlepšie hodnoty produkcie dosiahol kmeň BS-2267 v 0,5 % substráte ( $5,22 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Škrob pohánky pravdepodobne vytvára štruktúry, ktoré sú neprístupné pre pôsobenie glykozidáz.

Sója bola najbohatším zdrojom N-látok (4,84 %) a lipidov (18,86 %), ktoré boli uvoľňované lipázami a už pri 5 % koncentráciách vytvárali zákaly. Lipidové zákaly skresľovali aj stanovenie škrobu, ktorého priemerné množstvo podľa **Vojtaššákovéj et al. (1999)** je 5,4 %, čo je veľmi málo. Týmto zložením sója nebola vhodným substrátom pre produkciu amyláz a je potrebné využívať pri kultivácii bacilov delipidovaných sóju.

Ovsený šrot i napriek svojmu 33,8 % obsahu škrobu nebol vhodným substrátom pre produkciu amyláz. Najvyššiu aktivitu mal kmeň BS-2267 v 0,5 % substráte ( $4,71 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). V živnom médiu s obsahom 7,5 % a 10 % substrátu nastalo zvýšenie aktivity naznačujúce uvoľnenie endogénnych amyláz zo šrotu.

Ryžový šrot, charakterizovaný vysokým obsahom škrobu 64,93 % a veľmi nízkym obsahom vlákniny 0,96 %, nebol napriek očakávaniam vhodným substrátom pre produkciu amyláz. Svojim vysokým obsahom škrobu mali už 5 % roztoky nevhodnú konzistenciu, čo znemožňovalo aeráciu mikroorganizmov. Stanovená aktivita to jasne potvrdzuje. Najvyššiu aktivitu mal kmeň BS-2267 v 0,5 % substráte ( $4,00 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), ktorá predstavovala 72 % aktivity oproti čistému kukuričnému škrobu. Vhodnejšími substrátmi sú maltodextríny a hydrolyzáty ryže a kukuričnej múky s rôznymi dextrózovými ekvivalentmi, ktoré boli použité ako zdroje uhlíka pre produkciu alfa-amyláz kmeňom *Bacillus* sp. TCRDC-25A (**Bajpai, Bajpai, 1991**). Kukuričný šrot s 57,12 % obsahom škrobu nebol dobrým zdrojom pre produkciu amyláz. Hodnoty získané po kultivácii vo väčšine prípadov nedosahovali ani minimálne porovnávacie hodnoty oproti čistej glukóze.

### **Extracelulárne peptidázy**

Bakteriálne peptidázy majú najväčší komerčný význam, a to čo do objemu výroby aj počtu praktických aplikácií (**Vodrážka et al., 1998; Banerjee et al., 1999; Nascimento, Martins, 2004**). Používajú sa k výrobe bielkovinových hydrolyzátoov pre krmovinárske účely, v kožiarskom a mliekárenskom priemysle, ale najväčšie množstvo sa ich spotrebuje pri výrobe biologicky aktívnych čistiacich prostriedkov a detergentov (**Vodrážka et al., 1998; Gupta et al., 2002; Maurer, 2004**). Intenzívna pozornosť ako biotechnologického výskumu, tak aj biotechnologickej výroby sa sústredila predovšetkým na extracelulárne proteolytické enzýmy produkované všetkými druhmi mikroorganizmov (**Gupta et al., 2002; El-Safey, Abdul-Raouf, 2004; Chu, 2007; Seyedeh et al., 2007**).

Keďže syntéza a sekrécia extracelulárnych peptidáz je podmienená prítomnosťou proteínového zdroja dusíka v živnej pôde, porovnaním výsledkov kultivácie bakteriálnych kmeňov v živnom médiu s čistým kukuričným škrobom a čistou glukózou sa môže iba sledovať, ktorý kmeň sa vyznačuje najvyššou produkciou a môže mať v tomto smere komerčné využitie. Zdrojom dusíkatých látok kvasničný autolyzát, ktorý tvoril základ všetkých živných pôd. Získané hodnoty poukázali na skutočnosť, že kmene *Bacillus licheniformis*, sú lepšími producentmi peptidáz, ako kmene *Bacillus subtilis* (Tab. 6).



**Tabuľka 6** Aktivita peptidáz v [ $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]

Substrát – zdroj uhlíka, koncentrácia		BS – 2267	BS - 2268	BL - L3	BL - L7/79
Kukuričný škrob	0,5%	9,59	9,68	12,22	7,72
Čistá glukóza	0,5%	9,17	11,76	14,23	6,70
	1%	2,82	4,59	11,17	4,82
	1,5%	2,23	5,06	5,69	12,23
Pšeničný šrot	0,5%	2,94	44,11	80,22	14,11
	1%	3,76	31,05	12,23	12,23
	2,5%	15,53	6,59	20,70	24,00
	5%	5,18	4,70	5,32	6,70
	7,5%	2,00	-	-	-
	10%	2,59	-	-	-
Šrot z jačmeňa kŕmneho	0,5%	5,06	13,06	8,59	9,65
	1%	8,70	32,46	12,94	12,35
	2,5%	14,94	8,59	10,70	37,40
	5%	4,00	4,59	16,47	22,11
	7,5%	-	-	6,47	-
	10%	-	-	15,64	-
Šrot z jačmeňa jarného	0,5%	2,82	33,64	32,46	25,12
	1%	5,60	8,23	57,17	46,44
	2,5%	9,88	9,72	10,12	27,67
	5%	4,47	19,06	32,04	10,82
	7,5%	-	13,24	-	-
	10%	-	4,09	-	-
Zomleté šupy zo zemiakov	0,5%	3,41	41,64	46,58	12,12
	1%	4,70	30,84	17,29	11,29
	2,5%	4,05	36,70	36,84	12,19
	5%	2,47	11,29	22,94	18,82
	7,5%	-	-	27,88	-
	10%	-	-	3,11	-
Pomletý láskavec metlinatý	0,5%	3,41	13,67	39,52	58,08
	1%	4,35	42,98	50,11	43,76
	2,5%	15,06	15,34	45,45	92,22
	5%	9,74	16,18	32,04	30,63
	7,5%	14,11	-	-	-
	10%	6,47	-	-	-
Šrot z pohánky	0,5%	5,29	69,66	18,82	88,45
	1%	9,06	63,80	16,80	87,23
	2,5%	13,27	32,75	22,58	67,94
	5%	3,79	16,18	56,46	21,88
	7,5%	-	-	-	7,55
	10%	-	-	-	2,82
Sójový šrot	0,5%	11,10	15,86	51,75	16,94

### potravinárstvo

	1%	6,70	10,12	22,87	71,14
	2,5%	6,92	6,70	19,81	13,83
	5%	7,93	3,95	5,67	4,00
	7,5%	-	5,88	-	-
	10%	-	zákal	-	-
Ovsený šrot	0,5%	10,59	75,28	18,00	63,52
	1%	13,50	16,89	20,23	58,34
	2,5%	3,34	12,40	53,99	61,05
	5%	5,03	15,22	18,82	8,61
	7,5%	-	-	4,70	-
	10%	-	-	4,59	-
Ryžový šrot	0,5%	7,34	46,04	29,85	22,70
	1%	3,51	46,32	60,27	13,03
	2,5%	2,45	20,54	5,62	5,81
	5%	4,59	26,25	5,60	5,90
	7,5%	1,95	-	-	-
	10%	2,56	-	-	-
Kukuričný šrot	0,5%	5,90	6,75	34,98	5,34
	1%	6,07	20,18	6,28	16,63
	2,5%	18,21	53,64	21,36	59,05
	5%	7,34	13,67	18,73	6,54
	7,5%	-	-	-	6,12
	10%	-	-	-	9,01

Komplexné zdroje uhlíka, teda aplikované rastlinné šroty sa vyznačovali aj rôznym obsahom bielkovinového dusíka, pričom najvyššie koncentrácie obsahoval sójový šrot (4,7 %), sladovnícky jačmeň (1,57 %) a ovos (1,5 %), na druhej strane najmenej bielkovinového dusíka obsahovali zemiakové šupky (0,79 %).

V živnej pôde, ktorá obsahovala pšeničný šrot boli stanovené najvyššie hodnoty kultiváciou kmeňa BL-L3 v 0,5 % substráte (80,22  $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a kultiváciou kmeňa BS-2268 v 0,5 % substráte (44,11  $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Živná pôda s kŕmnym jačmeňom obsahovala 1,12 % celkového dusíka, z čoho bol bielkovinový podiel 1 %. Najvyššie aktivity dosiahol kmeň BL-7/79 pri koncentrácii 2,5 % (37,40  $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a kmeň BS-2268 pri 1 % koncentrácii substrátu (32,46  $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Podobne ako v prípade amyláz, aj pri sledovaní aktivity proteolytických enzýmov v živných pôdach s vyššími koncentraciami rastlinných šrotov dochádza ku zvyšovaniu aktivít enzýmov pravdepodobne uvoľnením endogénnych peptidáz zo substrátu.

Hodnoty obsahu celkového dusíka 1,61 % a bielkovinového dusíka 1,58 % v jačmeni jarnom boli približne o tretinu vyššie oproti kŕmnemu jačmeňu, čo sa prejavilo aj vo vyššej aktivite peptidáz. Najvyššie aktivity boli získané kultiváciou kmeňa BL-L3 v 1 % substráte (57,17  $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), kmeňa BL-7/79 v 1 % substráte (46,44  $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a kmeňa BS-2268 v 0,5 % substráte (33,64  $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Najnižšou produkciou sa vyznačoval kmeň BS-2267, kde pri koncentrácii substrátu 2,5 % sa dosiahli maximálne možné aktivity (9,88  $\mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), ktoré by sa dali porovnať s kultiváciou baktérií v médiu s 0,5 % kukuričným škrobom.

Aj keď bol obsah celkových dusíkatých látok v zemiakových šupkách 1,47 %, z ktorých len 0,79 % bolo viazaných v bielkovinách, čo predstavovalo najnižšiu hodnotu spomedzi všetkých substrátov, aktivita peptidáz dosiahla pri niektorých kmeňoch výborné hodnoty.

Najvyššie aktivity boli namerané pri kultivácii kmeňa BL-L3 v 0,5 % substráte ( $46,58 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a pri BS-2268 tiež v 0,5 % substráte ( $41,64 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Zemiakové šupky sa javia ako substrát nevhodný pre kultiváciu kmeňa BS-2267.

Láskavec metlinatý obsahoval 2,245 % celkových dusíkatých látok a 1,473 % bielkovinového dusíka. Svojím obsahom a peptidovým zložením najviac láskavec vyhovoval kmeňu BL-7/79, čo sa odrazilo aj v produkcii peptidáz pri koncentrácii substrátu 2,5 % ( $92,22 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Vysoké aktivity peptidáz boli stanovené aj v 1 % substráte kultiváciou kmeňov BL-L3 a BS-2268 ( $50,11 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $42,98 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Aj v prostredí 7,5 % substrátu boli zaznamenané mierne vyššie aktivity kmeňa BS-2267 oproti hodnotám pri 0,5 % čistej glukóze, alebo 0,5 % kukuričnom škrobe.

Pohánka obsahovala oproti láskavcu metlinatému nižší obsah celkového dusíka 1,68 % a bielkovinového dusíka 1,4 %, avšak bakteriálne kmene dokázali vyprodukovať porovnateľné aktivity peptidáz. Najvyššie aktivity boli stanovené v 0,5 % a 1 % substráte, kultiváciou kmeňov BL-7/79 a BS-2268 ( $88,45 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $87,23 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $69,66 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $63,80 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ).

Najvyšší obsah dusíkatých látok 4,84 %, a z toho bielkovinových látok 4,77 %, bol stanovený v sóji. Táto skutočnosť sa však neprejavila formou výrazného zvýšenia produkcie peptidáz. Vyššie aktivity boli zaznamenané len pri kultivácii kmeňa BL-7/79 v 1 % koncentrácii substrátu ( $71,14 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a kmeňa BL-L3 v 0,5 % substráte ( $51,75 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Soares at al., (2005) kultivovali *Bacillus subtilis* pre produkciu extracelulárnych enzýmov za použitia sójovej múčky ako kultivačného média v systéme polosuchých fermentácií, pretože zistili, že najvyššie proteázové aktivity boli  $960 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  pri polosuchej kultivácii a  $12 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$  pri submerznej kultivácii.

Ovsený šrot bol vhodnejším substrátom pre produkciu peptidáz ako pre produkciu amyláz. Obsahoval 1,6 % celkového dusíka, z čoho 1,52 % bolo viazaných v proteínoch. Najvyššie enzymatické aktivity boli stanovené v 0,5 % substráte kultiváciou kmeňov BS-2268 a BL-7/79 ( $75,28 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $63,52 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ).

Ryžový šrot obsahoval najmenej celkového dusíka 0,98% zo všetkých aplikovaných substrátov, napriek tomu kmeň BL-L3 kultivovaný v 1 % substráte produkoval až  $60,27 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$  peptidáz a kmeň BS-2268 v 1 % a 0,5 % substráte  $46,32 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $46,04 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

V kukuričnom šrote bol celkový obsah dusíkatých látok 1,51 %, z toho bielkovinový dusík tvoril 1,4 %. Toto zloženie živnej pôdy podporilo syntézu a sekréciu peptidáz u všetkých sledovaných kmeňov, predovšetkým pri koncentrácii substrátu 2,5 %. Výraznejšie sa to prejavilo pri kultivácii kmeňov BL-7/79 a BS-2268 ( $59,05 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $53,64 \mu\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$ ).

## ZÁVER

Prácou boli získané ďalšie poznatky o produkcii extracelulárnych amyláz a peptidáz druhmi *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* na/v tradičných i netradičných substrátoch. Z aplikovaných substrátov sa najvyšším obsahom škrobu vyznačoval ryžový šrot, zloženie polysacharidu však nevyhovovalo pre štiepenie amylázami rodu *Bacillus*. Najvyššiu koncentráciu bielkovinového dusíka obsahoval sójový šrot, využitie týchto látok je však limitované prítomnosťou lipidov. Pre kultiváciu baktérií rodu *Bacillus* je potrebné aplikovať delipidovaný sójový šrot. Kmeň BS-2268 bol najlepším producentom amyláz ak sa kultivoval v živnom médiu, ktoré obsahovalo 2,5% a 5% šrotu z láskavca metlinatého. Kmene *Bacillus licheniformis* BL-L3 a BL-7/79 sú lepšími producentmi extracelulárnych peptidáz, výraznejšie v pôde s láskavcom metlinatým, pšenickou, pohánkou, ovsom a sójovým

šrotom. Z komerčného hľadiska pre získanie dostatočných výťažkov amyláz a peptidáz nie je potrebné využívať základné plodiny ako pšenicu, jačmeň, kukuricu a ryžu, vhodnejšími zdrojmi živín sú alternatívne suroviny typu zemiakové šupky, pohánka a láskavec metlinatý, je však potrebné zamerať sa aj na správny výber mikroorganizmov.

## LITERATÚRA

- AVDIIUK, K. V. – VABANETS, L. D. 2008. Optimalization of cultivation conditions of the alpha-amylase producer *Bacillus subtilis* 147, In: *Mikrobiol. Z.*, vol. 70, 2008, n. 1, p. 10-16.
- BAJPAI, P. – BAJPAI P. K. 1991. Increase production of thermostable alpha-amylase enzyme by *Bacillus* sp. TCRDC-25A with maltodextrins, In: *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 31, 1991, n. 2, p. 159-164.
- BALASUBRAMANIAN, D. – BRYCE, C. F. A. – DHARMALINGAM, K. – GREEN, J. – JAYARAMAN, K. 2004. *Concepts in Biotechnology*. 3. ed. Orient Blackswan, 2004. 515 p. ISBN 978-81-7371-483-2
- BANERJEE, U. CH. – SANI, R. K. – AZMI, W. – SONI, R. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. In: *Process Biochem.*, vol. 35, 1999, p. 213 – 219.
- CHU, W. H. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. In: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, 2007, no. 3, p. 241 – 245. ISSN 1367-5435
- EL-BANNA, T. E. – ABD-AZIZ, A. A. – ABOU-DOBARA, M. I. – IBRAHIM, R. I. 2007. Production and Immobilization of alpha-amylase from *Bacillus subtilis*, In: *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 10, 2007, n. 12., p. 2039-2047.
- EL-SAFEY, E. M. – ABDUL-RAOUF, U. M. 2004. Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. In: *Inter. conferences for development and the environment in the Arab world*. Assiut Univ., March 23 – 25, 2004, p. 14.
- FRANCIS, Ch. A. – POINCELOT, R. P. – BIRD, G. W. 2006. Developing and extending sustainable agriculture: a new social contract. Philadelphia : Haworth Press, 2006. 367 p. ISBN 978-1560223320
- GUPTA, R. – BEG, Q.K. – LORENZ, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, 2002, no. 1, p. 15 – 32.
- HUMPREY-SMITH, I. – HECKER, M. 2006. Microbial proteomics: Functional biology of whole organisms. Malden : John Wiley and Sons, 2006. 512 p. ISBN 978-0-471-69975-0
- KARABÍNOVÁ, M. – ADAMOVSKEÝ, F. – GROMOVÁ, Z. – HÚSKA, J. – ILLES, L. – MOLNÁROVÁ, J. 1997. Špeciálna rastlinná výroba - obilniny. Nitra : SPU, 1997, 204 p., ISBN 80-7137-344-3
- KENT, N. L. – EVERS, A. D. 1994. Kent's technology of cereals: an introduction for students of food science and agriculture. 4. ed. Oxford : Woodhead Publishing, 1994. 334 p. ISBN 978-1-85573-361-9
- MAURER, K.H. 2004. Detergent proteases. In: *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 15, 2004, p. 330 – 334.
- NASCIMENTO, W. C. A. – MARTINS, M. L. L. 2004. Production and properties of extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. In: *Brazil. J. Microbiol.*, vol. 35, 2004, p. 91 – 96.
- SALLEH, A. B. – RAHMAN, N. Z. R. A. – BASRI, M. 2006. New Lipases and Proteases.

- Hauppauge : Nova Publishers, 2006. 159 p. ISBN 9781600210686
- SCHAECHTER, M. – LEDERBERG, J. 2004. *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, 2004. 1149 p. ISBN 9780126213614
- SEYEDEH, F. G. O. – TABANDEH, F. – YAKHCHALI, B. – EFTEKHAR, F. 2007. Enhancement of alkaline protease production by *Bacillus clausii* using Taguchi experimental design. In : *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 6, 2007, no. 22, p. 2559 – 2564.
- SHARMA, P. D. 2004. *Microbiology*. Rastogi Publications, 2004. 552 p. ISBN 9788171338559
- SHUKLA, J. – KAR, R. 2006. Potato peel as a solid state substrate for thermostable  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus* isolates, In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 22, 2006, n. 5, p. 417-422 ISSN 0959-3993
- SMITH, J. E. 2004. *Biotechnology*. 4. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2004. 271 p. ISBN 9780521540773
- SOARES, V. F. – CASTILHO, L. R. – BON, - E. P. S. – FREIRE, M. G. 2005. High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation, In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. vol. 41, 2005, p. 1-3. ISSN 0273-2289
- SONENSHEIN, A. L. – HOCH, J. A. – LOSICK, R. 2002. *Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*. ASM Press, 2002. 629 p. ISBN 978-1-55581-205-8
- SZABOVÁ, E. 2005. *Optimalizácia produkcie bakteriálnej peptidázy a jej purifikácia chromatografickými metódami : dizertačná práca*. Nitra : SPU, 2005. 107 p.
- ŠPALDON, E. et al. 1986. *Rostlinná výroba*. 1. vyd. Praha : SZN Praha, 1986. 720 p. ISBN 4029-07-124-86
- TAMAGNINI, I. et al. 2008. Generation and Comparison of Bioluminescent and Fluorescent *Bacillus licheniformis*. In: *Current Microbiology*, vol. 57, 2008, n. 3, p. 245-250 ISSN 0343-8651
- TANG, X. J. - HE, G. Q. – CHEN, Q. H. – ZHANG, X. Y. – ALI, M. A. 2004. Medium optimization for the production of thermal stable beta-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. In: *Bioresource technology*, vol. 93, 2004, n. 2, p. 175-181.
- Todar's Online Textbook of Bacteriology-(TODAR, Kenneth. 2009): <http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>
- URMINSKÁ, Dana. 1997. *Biotechnológia prípravy bakteriálnych Ser-proteáz a ich biochemická charakteristika : habilitačná práca*. Nitra : SPU, 1997. 70 p.
- VODRÁŽKA, Z. – RAUCH, P. – KÁŠ, J, 1998. *Enzymologie*. Praha : VSCHT, 1998. 171 p. ISBN 80-7080-330-4.
- VOJTAŠŠÁKOVÁ, A. – KOVÁČIKOVÁ, E. – SIMONOVÁ, E. – HOLČÍKOVÁ, K. 1999. *Obilniny a strukoviny – Cereals and Legumes*. Bratislava : ÚVTIP, 1999. 268 p. ISBN 80-85330-62-8
- WAITES, M. J. – MORGAN, N. J. – ROCKEY, J. S. – HIGTON, G. 2005. *Industrial Microbiology: An Introduction*. 3. ed. Malden : Wiley-Blackwell, 2005, 304 p. ISBN 978-0-632-05307-0
- WALSH, Gary. 2002. *Proteins: Biotechnology and Biochemistry*. 2 ed. Malden : John Wiley and Sons, 2002,425 p. ISBN 978-0-471-89907-5

**Kontaktná adresa:**

Dana Urminská, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E-mail: [Dana.Urminska@uniag.sk](mailto:Dana.Urminska@uniag.sk)

Ján Ambróš, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra.

Eva Szabová, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E-mail: [Eva.Szabova@uniag.sk](mailto:Eva.Szabova@uniag.sk)