

KATARZYNA CZACZYK, AGNIESZKA MARCINIAK, WOJCIECH BIAŁAS,
ANNA MUELLER, KAMIŁA MYSZKA

WPLYW CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH NA BIOSYNTEZĘ LIPOPEPTYDÓW PRZEZ *BACILLUS* SPP.

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie czy bakterie z rodzaju *Bacillus* są zdolne do syntezy lipopeptydów (surfaktyna, iturina) i w jaki sposób warunki środowiskowe wpływają na produkcję tych związków. W badaniach użyto dziewięciu szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*. Badając wpływ poszczególnych czynników środowiskowych, warunki hodowli modyfikowano poprzez zmienną dostępność źródła azotu i węgla, pH, temperaturę oraz czas. Wydajność biosyntezy lipopeptydów oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Plan doświadczeń i analizę wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego Design of Experiments.

W pierwszym etapie eksperymentów określono wydajność biosyntezy surfaktyny i ituriny w warunkach optymalnych. Wykazano, że badane szczepy *Bacillus* spp. charakteryzowały się zróżnicowanymi zdolnościami do biosyntezy wymienionych związków. Największą wydajność produkcji surfaktyny wykazał szczep *Bacillus cereus* (70,85 mg/l). Biosynteza ituriny kształtowała się na bardzo niskim poziomie (0,01 – 0,35 mg/l). W drugim etapie badań określono wpływ czynników środowiskowych na wydajność produkcji lipopeptydów. Obiektem badań były cztery szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*, najefektywniejsze pod względem produkcji lipopeptydów, dla których przeprowadzono hodowle w warunkach ustalonych na podstawie wybranego modelu planowania doświadczeń. Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono, że największy wpływ na biosyntezę surfaktyny przez badane szczepy miała dostępność źródła azotu, pH oraz interakcje pomiędzy pH podłoża hodowlanego i zawartością glukozy.

Słowa kluczowe: *Bacillus* spp., lipopeptydy, surfaktyna, iturina

Wstęp

Drobnoustroje są zdolne do biosyntezy związków, które nie odgrywają istotnej roli w budowie ich struktur komórkowych, dostarczaniu energii czy prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Określane są one mianem metabolitów wtórnych (drugorzędowych), a ich obecność nie jest niezbędna do wzrostu i rozmnażania się mikroor-

Dr hab. K. Czaczyk, mgr inż. A. Marciniak, mgr inż. W. Białas, mgr A. Mueller, mgr inż. K. Mysza, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

ganizmów [2]. Uważa się, że ich tworzenie poprawia możliwości przystosowawcze drobnoustrojów do danych warunków środowiska i jest alternatywnym mechanizmem obronnym komórki. Do metabolitów wtórnych wytwarzanych przez drobnoustroje należą m.in. związki powierzchniowo czynne (biosurfaktanty). Substancje te, adsorbując się na powierzchni komórki mogą istotnie wpływać na hydrofobowość powierzchni komórek ich producentów. Zdolności do wytwarzania biosurfaktantów mają m.in. bakterie z rodzaju *Bacillus* [1, 9]. Niektóre szczepy *Bacillus* spp. wytwarzają lipopeptydy (m.in. subtilizinę, surfaktinę, iturinę i fengycinę) o właściwościach powierzchniowo czynnych. Związki te zbudowane są z cyklicznego łańcucha peptydowego, w skład którego wchodzi różne aminokwasy powiązane z łańcuchem kwasu tłuszczowego [6]. Substancje te charakteryzują się amfifilową strukturą, tzn. mają regiony o naturze hydrofilowej (aminokwasy tworzące cykliczny peptyd) i regiony o naturze hydrofobowej (łańcuch węglowodorowy). Orientacja przestrzenna tych regionów zależy od hydrofilowego lub hydrofobowego charakteru powierzchni komórki bakteryjnej. Gdy powierzchnia komórki ma charakter hydrofilowy, cząsteczki lipopeptydów układają się w ten sposób, że cykliczny peptyd jako część polarna adsorbuje się na powierzchni, natomiast węglowodorowy łańcuch wystawiony jest do otaczającego środowiska. Odwrotnie jest w przypadku hydrofobowych właściwości powierzchni komórki, wówczas cykliczny peptyd jest wystawiony do otaczającego środowiska, podczas gdy węglowodorowy łańcuch adsorbuje się na powierzchni. Skutkiem tego, po adsorpcji lipopeptydów, hydrofilowe szczepy stają się bardziej hydrofobowe, a szczepy hydrofobowe stają się bardziej hydrofilowe [1].

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie czy bakterie z rodzaju *Bacillus* są zdolne do syntezy lipopeptydów (surfaktyny, ituriny) i w jaki sposób warunki środowiskowe wpływają na produkcję tych związków.

Material i metody badań

Drobnoustroje

W badaniach użyto 9 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*. *B. megaterium*, *B. subtilis* oraz *B. cereus* otrzymano z Instytutu Leków w Warszawie (obecnie Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego). Pozostałe szczepy pochodziły z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. *B. cagulans* 6, *B. circulans* 7 i *B. circulans* 8 zostały wyizolowane ze słomy łubinowej [13], *B. brevis*, *B. alcalophilus* i *B. firmus* pochodziły ze ścieków przemysłu spożywczego [14]. Przynależność gatunkową tych bakterii potwierdzono za pomocą testów API 50 CHB (BioMerieux).

Warunki hodowli

Doświadczenia prowadzono na podłożu stosowanym do namnażania i identyfikacji bakterii z rodzaju *Bacillus* [17], w warunkach dynamicznych (100 obr./min). Badając wpływ poszczególnych czynników środowiskowych warunki hodowli modyfikowano poprzez zmienną dostępność źródła azotu (pepton kazeinowy: 0, 10 i 20 g/l), zmienną dostępność źródła węgla (glukoza: 0, 5 i 10 g/l), zróżnicowane pH (5, 7, 9), temperaturę (30, 37 i 45°C) i czas (48 – 72 h). Jako optymalne warunki hodowli przyjęto podstawowy skład podłoża (10 g/l peptonu kazeinowego i 5 g/l glukozy), pH równe 7 i temperaturę 37°C.

Biosynteza związków powierzchniowo czynnych

Po zakończonej hodowli 50 ml płynnej hodowli *Bacillus* spp. odwirowywano przez 25 min (7000 g) w temp. 4°C w celu usunięcia komórek. Supernatant наносono na szczyt kolumny do ekstrakcji w fazie stałej (SEP-PAK, Bond Elut C₁₈, Agilent Technologies). Następnie kolumnę przemywano sukcesywnie przy użyciu 20 ml wody dejonizowanej oraz 40 ml 50% roztworu metanolu. Związki powierzchniowo czynne wmywano z kolumny za pomocą 20 ml metanolu. Eluat odparowywano w wyparce próżniowej i surowy ekstrakt zawieszano w 1ml fazy chromatograficznej przeznaczonej do oznaczania określonych związków.

Związki z grupy surfaktin oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy użyciu chromatografu cieczowego MERCK-HITACHI (zestaw obejmował: automatyczny podajnik prób MERCK-HITACHI L-7250, pompę MERCK-HITACHI L-7100, detektor DAD MERCK-HITACHI L-7455). Oznaczenia prowadzono przy długości fali 205 nm w temp. 30°C. Do oznaczeń zastosowano kolumnę ODS-Hypersil (200 mm x 4,6 mm, 5 µm, Hewlett-Packard). Przy oznaczaniu surfaktyny jako eluent stosowano acetonitryl/3,8 mM kwas trifluorooctowy (80:20), a ituriny – acetonitryl/10 mM octan amonu (3:4), przy przepływie 1 ml/min. Próby наносono na szczyt kolumny w ilości 50 µl. Identyfikacji jakościowej i ilościowej dokonano metodą standardu zewnętrznego (standard surfaktyna – SIGMA) z wykorzystaniem powierzchni pików [12].

Doświadczenia nad wpływem czynników środowiskowych na biosyntezę związków powierzchniowo czynnych przez *Bacillus* spp. prowadzono stosując program komputerowy Design of Experiments 6.02. firmy Stat-Easy z Minneapolis (USA). Do analizy statystycznej wykorzystano wartości kodowe zamiast wartości rzeczywistych badanych zmiennych, co znacznie ułatwiło interpretację otrzymanych wyników (tab. 1).

Tabela 1

Poziomy zmienności badanych czynników.
Variation levels of investigated factors.

Czynnik Factor	Wartości kodowe / Coded values		
	-1	0	1
	Wartości rzeczywiste / Actual values		
Temperatura / Temperature [°C]	30	37	45
Glukoza / Glucose [g/l]	0	5	10
Pepton / Peptone [g/l]	0	10	20
pH / pH	5	7	9
Czas / Time [h]	6	27	48

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie eksperymentów określono wydajność biosyntezy surfaktyny i ituriny A w warunkach optymalnych. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tab. 2. Badane szczepy *Bacillus* spp. charakteryzowały się zróżnicowanymi zdolnościami do biosyntezy tych związków. Największą wydajność produkcji surfaktyny wykazał szczep *B. cereus* (70,85 mg/l). Pod względem ilości syntetyzowanej surfaktyny wyróżniały się także szczepy *B. firmus* (43,28 mg/l), *B. circulans* 7 (34,22 mg/l) i *B. coagulans* 6 (21,23 mg/l). Wydajność biosyntezy ituriny A przez badane szczepy drobnoustrojów kształtowała się na bardzo niskim poziomie (od 0,01 do 0,35 mg/l), a największą produkcję obserwowano w przypadku *B. megaterium*.

Tabela 2

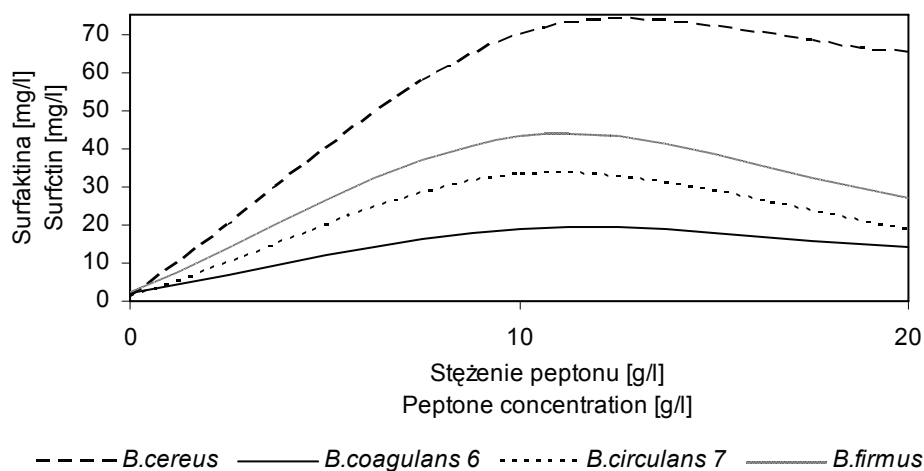
Biosynteza surfaktyny i ituriny A przez badane szczepy *Bacillus* spp.
Surfactin and iturin A biosynthesis by examined species of *Bacillus* spp.

Szczep Species	Surfaktyna [mg/l] Surfactin [mg/l]	Iturina A [mg/l] Iturin A [mg/L]
<i>B. megaterium</i>	7,795 ±1,212	0,351±0,020
<i>B. subtilis</i>	0,616 ±0,025	0,099±0,012
<i>B. cereus</i>	70,845±5,200	0,247±0,014
<i>B. coagulans</i> 6	21,231±1,811	0,138±0,009
<i>B. circulans</i> 7	34,216±2,112	0,128±0,008
<i>B. circulans</i> 8	0,306±0,012	0,014±0,002
<i>B. brevis</i>	0,126±0,010	0,222±0,019
<i>B. alcalophilus</i>	1,509±0,089	0,095±0,010
<i>B. firmus</i>	43,284±3,234	0,222±0,016

± - odchylenie standardowe/ ± - standard deviation.

W drugim etapie badań określono jaki wpływ na wydajność biosyntezy surfaktyny i ituriny A ma dostępność składników odżywczych i pH środowiska hodowlanego. Obiektem badań były 4 szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus* (*B. cereus*, *B. firmus*, *B. circulans* 7 i *B. coagulans* 6), najefektywniejsze pod względem produkcji lipopetydów, na których przeprowadzono hodowle w warunkach ustalonych na podstawie wybranego modelu planowania doświadczeń. Zastosowanie metody powierzchni odpowiedzi dało możliwość określenia wpływu poszczególnych czynników środowiskowych warunkujących zmiany badanej cechy, jak i wzajemnych korelacji pomiędzy nimi.

Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono, że największy wpływ na biosyntezę surfaktyny przez *B. cereus* miała dostępność źródła azotu ($p = 0,0067$) oraz interakcja pomiędzy pH podłoża hodowlanego i zawartością glukozy ($p = 0,0143$). Wraz ze wzrostem stężenia peptonu w podłożu od 0 do 15 g/l obserwowano zwiększenie produkcji badanego związku, a następnie nieznaczny jego spadek (rys. 1). Podobne tendencje obserwowano w przypadku pozostałych trzech badanych szczepów *Bacillus* spp., dla których wraz ze zwiększeniem stężenia peptonu od 0 do 12 g/l następował wzrost wydajności biosyntezy tego związku, a następnie nieznaczne jego zmniejszenie (rys. 1).

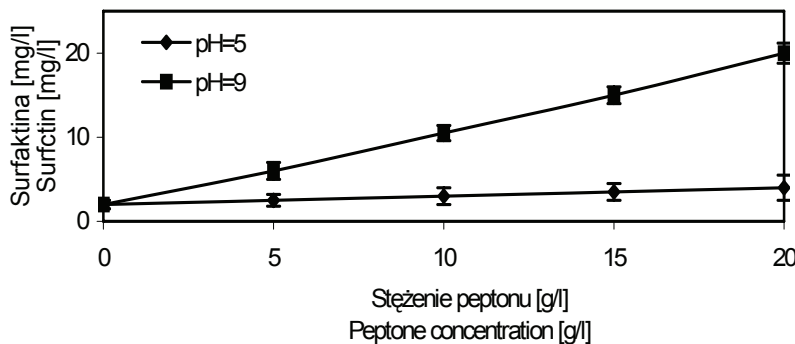


Rys. 1. Przekrój przez powierzchnię odpowiedzi dla *Bacillus* spp. (biosynteza surfaktyny).

Fig. 1. Perturbation plot for *Bacillus* spp. (surfactin biosynthesis).

Istotny wpływ na biosyntezę surfaktyny przez badane drobnoustroje miało także pH podłoża hodowlanego. W przypadku szczepów *B. coagulans* 6, *B. circulans* 7 i *B. firmus* wraz ze wzrostem stężenia peptonu w środowisku hodowlanym zwiększała się produkcja surfaktyny, przy czym w podłożu o pH = 5 wzrost ten był niewielki, a w pH = 9 obserwowano znaczący przyrost zawartości tego związku (rys. 2). Biosynteza surfaktyny warunkowana była również interakcjami pomiędzy pH podłoża hodowlanego

a zawartością glukozy ($p < 0,0001$). Dla żadnego z badanych szczepów nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy biosyntezą ituriny A, a składem podłoża hodowlanego.

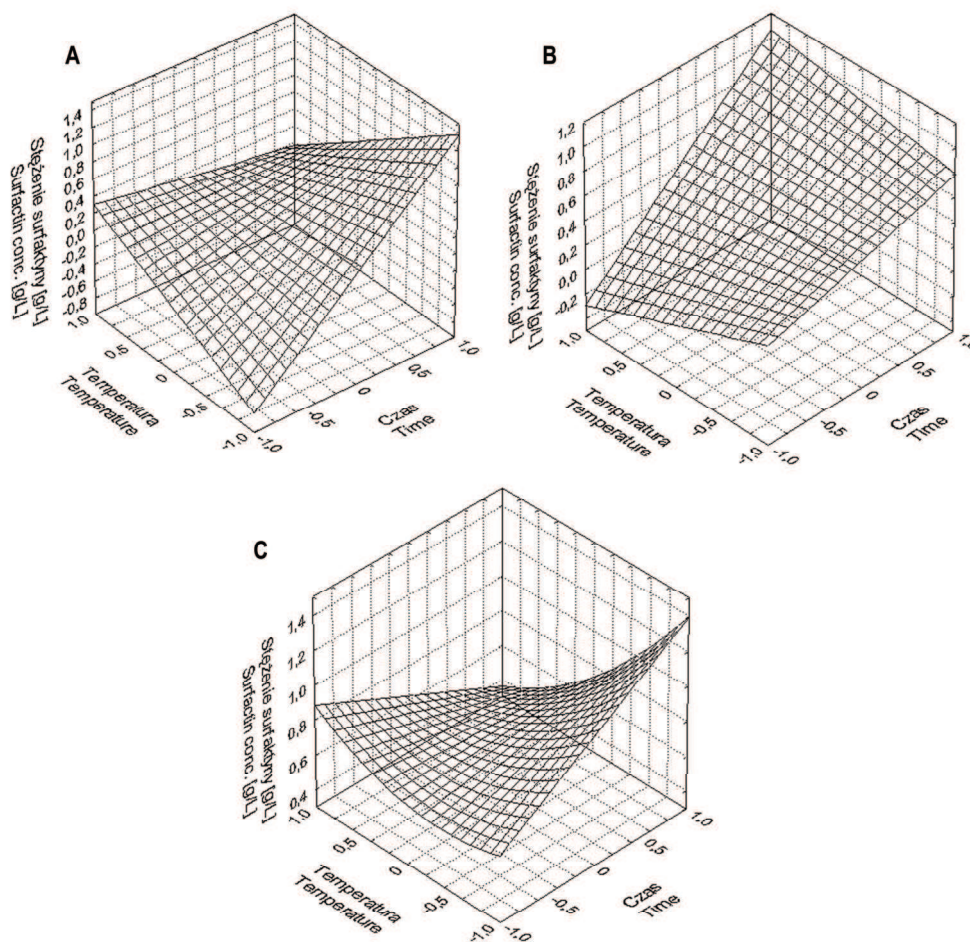


Rys. 2. Wpływ zawartości peptonu oraz pH podłoża na biosyntezę surfaktyny przez *B. coagulans* 6.

Fig. 2. The effect of peptone content and basis' pH on surfactin biosynthesis by *B. coagulans* 6.

W kolejnym etapie badań określono wpływ czynników środowiskowych (temperatura i czas) na wydajność biosyntezy surfaktyny i ituriny A przez badane szczepy *Bacillus* spp. Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem szczepu *B. cerues* nie wykazały statystycznie istotnych zależności pomiędzy produkcją tych związków a warunkami prowadzenia hodowli. W przypadku pozostałych badanych szczepów (*B. coagulans* 6, *B. circulans* 7 i *B. firmus*) wraz z wydłużaniem okresu prowadzenia hodowli obserwowano zwiększenie biosyntezy surfaktyny (rys. 3). Spośród badanych wartości temperatury najkorzystniejsza do uzyskania wysokiej wydajności surfaktyny była temp. 30°C. Wpływ na biosyntezę lipopeptydów miały także interakcje pomiędzy czasem a temperaturą prowadzenia hodowli. Dla żadnego z badanych szczepów nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy warunkami prowadzenia hodowli a biosyntezą ituriny A.

We wszystkich wariantach doświadczeń czynnikiem, który miał największy wpływ na wydajność biosyntezy surfaktyny było stężenie peptonu w podłożu hodowlanym. Jego optymalny dodatek wynosił 10-15 g/l. Wzrost dostępności azotu w środowisku hodowlanym wykorzystywany jest przez drobnoustroje na produkcję aminokwasów i białek powierzchniowych, które odpowiedzialne są za hydrofobowość powierzchni komórki [3, 11] i teoretycznie zależność ta wykazuje dodatnią korelację prostoliniową. Rezultaty uzyskane w tej pracy wskazują, że przy optymalnej dostępności źródła azotu w podłożu hodowlanym następuje intensyfikacja biosyntezy związków powierzchniowo czynnych i jest to czynnik, który może powodować obniżenie hydrofobowości powierzchni komórek *Bacillus* spp. w tych warunkach.



Rys. 3. Współzależność wydajności biosyntezy surfaktyny, temperatury i czasu prowadzenia hodowli *Bacillus* spp.: A – *B. coagulans* 6, B – *B. circulans* 7, C – *B. firmus* (czas i temperaturę prowadzenia hodowli wyrażono w wartościach kodowych).

Fig. 3. Relationship between surfactin biosynthesis, temperature and time of culture for *Bacillus* spp.: A – *B. coagulans* 6, B – *B. circulans* 7, C – *B. firmus* (time and temperature, respectively, were expressed by coded values).

Przedstawione wyniki, dotyczące wpływu odczynu środowiska hodowlanego na wzrost biosyntezy surfaktyny wskazują, że najkorzystniejsze do uzyskania wysokiej wydajności tego związku było pH = 9. Znaczący wpływ na biosyntezę związków powierzchniowo czynnych mają nie tylko poszczególne czynniki, ale również wzajemne interakcje pomiędzy nimi. Istotne statystycznie powiązania obserwowano pomiędzy odczynem środowiska hodowlanego a dostępnością źródła węgla i azotu w podłożu oraz między temperaturą a czasem prowadzenia hodowli. Produkcja związków po-

wierzchniowo czynnych przez drobnoustroje stanowiła przedmiot badań wielu autorów [1, 5, 7, 8, 10]. Wśród bakterii z rodzaju *Bacillus*, zdolnych do syntezy biosurfaktantów wymienia się *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* i *Bacillus pumilus* [1, 4, 6, 9, 10, 15].

Prowadzone w ostatnich latach badania nad zwiększeniem wydajności lipopeptydów, otrzymywanych na drodze mikrobiologicznej, obejmowały także modyfikacje składu podłoża. Wyniki wskazują, że istotną rolę w tym procesie odgrywa dostępność źródła azotu, wykorzystywanego przez bakterie jako materiał do biosyntezy lipopeptydów. Wykazano także, że biosyntezie surfaktyny przez *Bacillus* spp. sprzyja pH powyżej 5 i temp. 30°C [1, 16]. Potwierdzają to także wyniki uzyskane w niniejszej pracy, gdzie zaobserwowano, że podłożem odpowiednim do produkcji lipopeptydów było podłoże o wysokim stężeniu peptonu. W większości wariantów doświadczeń optymalną temperaturą do biosyntezy tych substancji była temp. 30°C. Wykazano także zwiększenie wydajności surfaktyny przez badane szczepy *Bacillus* spp. wraz ze wzrostem pH.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki świadczą o tym, że skład podłoża i sposób prowadzenia hodowli mogą w istotny sposób wpływać na wydajność związków powierzchniowo czynnych, jakkolwiek ich tworzenie jest zawsze wypadkową warunków środowiskowych i cech gatunkowych. Uzyskane wyniki dają możliwość wyjaśnienia zależności między zmianami hydrofobowości powierzchni komórek *Bacillus* spp. w różnych warunkach środowiskowych, a adhezją tych drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych.

Wnioski

1. Skład podłoża i warunki hodowli w istotny sposób wpływały na biosyntezę związków powierzchniowo czynnych przez bakterie z rodzaju *Bacillus* spp., jakkolwiek ich tworzenie jest zawsze wypadkową warunków środowiskowych i cech gatunkowych
2. Badane szczepy *Bacillus* spp. charakteryzowały się zróżnicowanymi zdolnościami do biosyntezy surfaktyny i ituriny A. Największą wydajność surfaktyny wykazywał szczep *B. cereus* (70,85 mg/l). Wydajność biosyntezy ituriny A kształtowała się na bardzo niskim poziomie (od 0,01 do 0,35 mg/l).
3. Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono, że największy wpływ na produkcję lipopeptydów miała obecność źródła azotu w podłożu hodowlanym, pH środowiska oraz interakcje pomiędzy zawartością glukozy a pH.
4. Obserwowano zwiększenie biosyntezy surfaktyny wraz z wydłużeniem okresu prowadzenia hodowli. Najbardziej korzystną temperaturą do uzyskania wysokiej wydajności biosyntezy surfaktyny było 30°C.

Praca była prezentowana podczas XXXVII Ogólnopolskiej Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN, Gdynia, 26 – 27.IX.2006.

Literatura

- [1] Ahimou F., Jacques P., Deleu M.: Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzym. Microb. Technol.*, 2000, **27**, 749-754.
- [2] Bennett J. W., Bentley R.: What's in a name? – Microbial secondary metabolism. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1989, **34**, 1-28.
- [3] Castellanos T., Ascenico F., Bashan Y.: Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **33**, 1-9.
- [4] Cooper D. G., Goldenberg B. G.: Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, **53**, 224-229.
- [5] Domańska A., Kisielewska E.: Charakterystyka powierzchniowo czynnych metabolitów drobnoustrojów. *Post. Mikrobiol.*, 1996, **35** (4), 427-447.
- [6] Duitman E., Hamoen L., Rembold M., Venema G., Seitz H., Saenger W., Bernhard F., Reinhardt R., Schmidt M., Ullrich C., Stein T., Leenders F., Vater J.: The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Poc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, **96**(23), 13294-13299.
- [7] Lin S.C., Chen Y.C., Lin Y.M.: General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactant analysis and purification. *J. Chrom. A*, 1998, **825**, 149-159.
- [8] Mazurkiewicz J.: Związki powierzchniowo czynne wytwarzane przez mikroorganizmy. *Żywność. Technologia. Jakość*, 1996, **3** (8), 60-69.
- [9] Mazurkiewicz J., Kisielewska E.: Poszukiwanie szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* produkujących związki powierzchniowo czynne. *Żywność. Technologia. Jakość*, 1996, **1**(6), 51-60.
- [10] Razafindralambo H.: Contribution to the study of surface-active properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides. 1996, <http://www.bib.fsagx.ac.be/library/base/eng/these/1996/raz.html>.
- [11] Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D.: Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Proc. Biochem.*, 2003, **38**, 909-914.
- [12] Thomashow L.S., Bonsall R.F., Weller D.M.: Detection of antibiotics produced by soil and rhizosphere microbes *in situ*: examples of HPLC systems for antibiotics produced *in situ*. 2002, <http://www.wsu.edu/~mavrodi/Documents/Table2.pdf>
- [13] Trojanowska K., Gulewicz K., Stachowiak B.: Identification of bacterial strain isolated from lupine composts and their fungistatic activity. *Proc. Conference Lupine in Modern Agriculture, Olsztyn-Kortowo 1997*, pp. 257-263.
- [14] Trojanowska K., Sadowska K., Nowak J., Lasik M.: Charakterystyka mikroflory termofilnej występującej w ściekach przemysłu spożywczego. *Mat. XXXIII Sesji Nauk. KTChZ PAN, Lublin 2002*, s.279.
- [15] Tsuge K., Ano T., Shoda M.: Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Arch. Microbiol.*, 1996, **165** (4), 243-251.
- [16] Wei Y.H., Chu I.M.: Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, **22**, 724-728.
- [17] Williams O.B.: Tryptone medium for the detection of flat sour spores. *Food Res*, 1936, **3**, 217-221.

THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS INFLUENCING LIPOPEPTIDE BIOSURFACTANTS BIOSYNTHESIS BY BACILLUS SPP.

S u m m a r y

The purpose of these investigations was to determine the effect of environmental factors (nutrient concentrations, temperature, pH and time of culture) on surfactin and iturin biosynthesis by *Bacillus* spp. The studies were carried out with nine *Bacillus* spp. strains (also isolated from natural environments). To compare the effect of each factor on surface-active compounds production, the experiments were designed as a factorial search with the three levels for each variable and response surface method was used. The ability to lipopeptide biosurfactants production by examined *Bacillus* spp. strains was investigated using HPLC technique. Experiment design and results analysis were done by DoE programme.

In the first step of experiments production of surfactin and iturin in optimal conditions was investigated. It has been shown that the yield of biosynthesis of lipopeptide biosurfactants by examined *Bacillus* spp. strains varied according to species of bacteria. The highest production of surfactin was observed for *Bacillus cereus* (70,85 mg/l). Iturin biosynthesis was very poor in these conditions (from 0,01 to 0,35 mg/l). In the second step of investigations an influence of environmental factors on lipopeptide biosurfactants was investigated. The target of this tests were of four different *Bacillus* spp. strains, the most effective towards to lipopeptide production for whom culturing was done in designed conditions according to DoE model. Conducted experiments indicate that availability of nitrogen source, pH, interactions between pH in culture medium and content of glucose, influenced the surfactin production in all used strains. Statistically significant correlations were also noted between examined factors.

Key words: *Bacillus* spp., lipopeptide, surfactin, iturin ☒