

ANNA CHOIŃSKA, WOJCIECH ŁABA, ANNA RODZIEWICZ,
AGATA BOGACKA

**PROTEOLIZA KERATYNY PIÓR KURZYCH Z WYKORZYSTANIEM
POZAKOMÓRKOWYCH ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH
SZCZEPU *BACILLUS CEREUS* B5E/SZ**

Streszczenie

W hodowli bakterii *Bacillus cereus* B5e/sz na podłożu syntetycznym z dodatkiem piór kurzych biodegradacji ulegały keratyny zaliczane do białek włókienkowych. Ich hydroliza zachodziła przy udziale wydzielanych do środowiska keratynolitycznych proteaz. Enzymy te upłynniały natywną keratynę w postaci nierozpuszczalnej, a także modyfikowaną chemicznie oraz w znacznie większym stopniu keratynę rozpuszczalną. Bakteryjne keratynazy stanowiły mieszaninę względnie termostabilnych, obojętnych metaloproteaz o aktywności keratynolitycznej 10,9 JK i proteolitycznej 90,5 JP. Metodą *in silico* wykazano, że w sekwencji aminokwasowej keratyny piór kurzych zawarte są krótkie, bioaktywne peptydy z przewagą inhibitora ACE. Hydrolizat keratyny może być źródłem uzyskiwania peptydów o potencjalnym wykorzystaniu w żywności.

Słowa kluczowe: keratyna, keratynoliza, *Bacillus cereus*, proteazy, bioaktywne peptydy

Wprowadzenie

Keratyna jest białkowym komponentem pierza stanowiącym 90 % ich masy, a także składnikiem budulcowym innych wyrostków skóry kręgowców: włosów, sierści, pazurów itp. Jest to białko włókienkowe odporne na czynniki fizyczne i chemiczne oraz na działanie enzymów proteolitycznych pochodzenia zwierzęcego [12, 14]. Jego proteoliza możliwa jest z udziałem drobnoustrojowych proteaz specyficznych względem keratyn. Wśród mikroorganizmów mających uzdolnienia keratynolityczne dominującą grupę stanowią bakterie z rodzaju *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilis*, *B. cereus* i inne [6].

Większość keratynaz należy do proteaz serynowych, alkalicznych lub obojętnych [1]. W keratynolizie wyrostków skóry oprócz enzymów hydrolitycznych uczestniczą także reduktazy lub związki redukujące, które biorą udział w zrywaniu licznych mostków S-S w strukturze omawianych białek [7]. W pierwszorzędowej strukturze keratyny piór kurzych obecne są sekwencje aminokwasów odpowiadające di- i tripeptydom o aktywności biologicznej, które mogą znaleźć zastosowanie m.in. do produkcji żywności.

Analiza *in silico* struktury pierwszorzędowej keratyny piór może dostarczyć informacji na temat obecności bioaktywnych peptydów w tym białku. Spośród wielu różnych narzędzi umożliwiających uzyskanie takich informacji przydatna jest baza BIOPEP, porządkująca informacje o peptydach pochodzących z różnych źródeł. Jej twórcy zaproponowali podział bioaktywnych peptydów, pochodzących z białek żywności, biorąc pod uwagę ich funkcje.

Peptydy przeciwnadciśnieniowe stanowią najlepiej poznaną grupę bioaktywnych peptydów, których źródłem są białka żywności. Większość z nich jest inhibitorami hydrolazy peptydyldipeptydowej (enzymu przekształcającego angiotensynę I, w skrócie ACE – ang. angiotensin-I-converting enzyme) [5].

Celem pracy było zastosowanie pozakomórkowych enzymów proteolitycznych szczepu bakterii *B. cereus* B5e/sz w procesie proteolizy keratyny piór kurzych, a także ich wstępna charakterystyka. Metodą *in silico* analizowano obecność bioaktywnych peptydów w strukturze pierwszorzędowej keratyny piór.

Materiał i metody badań

Przedmiotem badań była keratyna natywnych piór kurzych, keratyna piór w postaci rozpuszczalnej oraz w celach porównawczych modyfikowana chemicznie keratyna wełny owczej (keratin azure). Keratynę rozpuszczalną otrzymano przy użyciu DMSO zmodyfikowaną metodą Wawrzkievicz i wsp. [18]. Keratyna modyfikowana chemicznie była preparatem handlowym firmy Sigma-Aldrich. Hodowle bakterii prowadzono przez 6 dob metodą wstrząsową w kolbach Erlenmeyera (250 ml) w temp. 30 °C w podłożu mineralnym z dodatkiem 0,05 % YE oraz 1 % piór [13]. Badano także przebieg keratynolizy w bioreaktorze mieszadłowym. Hodowlę prowadzono na tym samym podłożu z 1 % dodatkiem pierza przy obrotach mieszadła 500 obr./min oraz natlenieniu 1 dm³/min. Inokulum stanowiła 12-godzinna hodowla bakterii na bulionie z glukozą.

Płyny pohodowlane, po odwirowaniu biomasy komórkowej, stanowiły źródło enzymów proteolitycznych, a także innych metabolitów powstających podczas keratynolizy piór. Supernatant płynu pohodowlanego pobrany między drugą a trzecią dobą hodowli wstrząsanej był źródłem badanych proteaz i keratynaz.

Aktywność proteolityczną oznaczano zmodyfikowaną metodą Ansona wobec kazeiny w temp. 30 °C i pH 7,5 [13]. Aktywność keratynolityczną badano wobec 3 substratów: odłuszczonego pióra (10 mg/ml), keratyny wełny owczej (4 mg/ml) oraz keratyny rozpuszczalnej (2 mg/ml). Aktywność keratynaz wobec keratyny rozpuszczalnej piór kurzych oznaczano w pH 7,5 i w temp. 40 °C [10]. Badanie aktywności keratynaz wobec natywnej keratyny piór i keratyny wełny owczej prowadzono w temp. 50 °C przez 30 min, w pH 7,5, przy 400 obr./min. Jednostkę aktywności proteaz (JP) i keratynaz (JK) wyrażano jako przyrost absorbancji produktów rozpuszczalnych w TCA o 0,01 przy długości fali $\lambda = 280$ nm (keratyna rozpuszczalna, pióra) i $\lambda = 595$ nm (keratyna wełny owczej) [0,01/cm³/min]. Uwalnianie cysteiny oznaczano poprzez określenie ilości grup SH metodą Ellmana za pomocą kwasu DNTB z cystaminą [11], natomiast aminokwasów poprzez ilość grup aminowych przy użyciu TNBS [15]. Stężenie rozpuszczalnego białka oznaczano metodą Lowry'ego [9]. Aktywność reduktazy glutationowej oznaczano według metody Carlberg i Mannervik [2]. Jako enzymu referencyjnego używano reduktazy glutationowej z drożdży *S. cerevisiae* (EC 1.6.4.2). Ubytek substratu keratynowego piór w hodowli bakterii oznaczano metodą wagową.

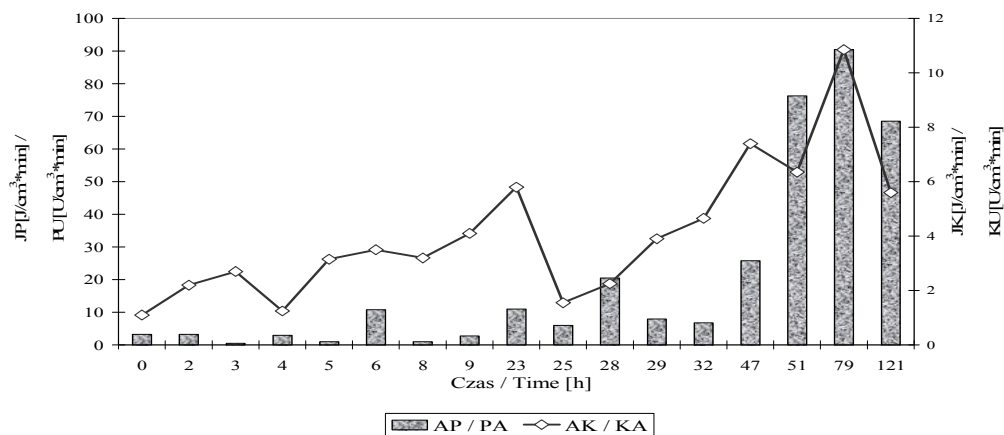
Wyznaczono optymalne warunki aktywności proteaz i keratynaz płynu hodowlanego w zakresie temp. 25 - 60 °C i pH 4 - 12, a także ich wrażliwość na inhibitory i aktywatory (1-10 mM): EDTA, PMSF, NEM, Cysteina, CaCl₂.

Wstępnie oceniono wartość białka keratynowego jako potencjalnego prekursora biologicznie aktywnych peptydów. Sekwencje keratyny piór otrzymano z bazy danych UniProtKB (<http://www.uniprot.org>). Analizę *in silico* bioaktywnych peptydów prowadzono korzystając z bazy BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/biopep>).

Wyniki i dyskusja

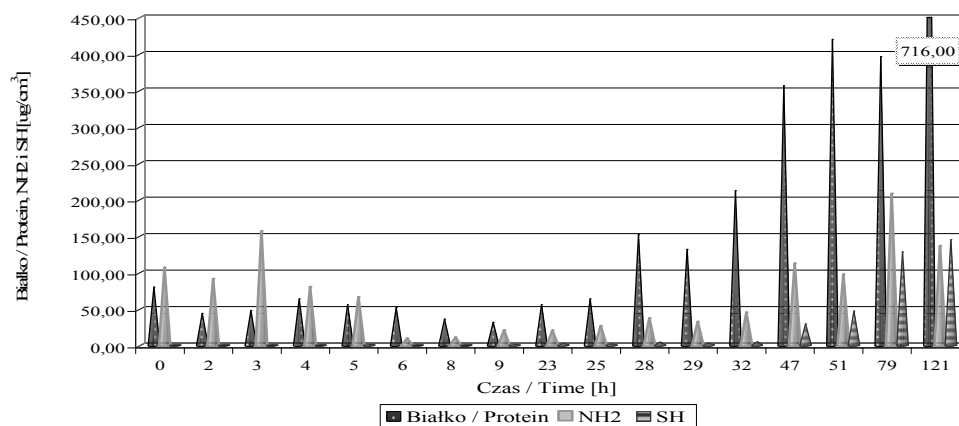
Hydroliza białek keratynowych możliwa jest z udziałem proteaz i keratynaz pochodzenia drobnoustrojowego. Obecność keratyny w ubogim podłożu hodowlanym indukuje biosyntezę tych enzymów przez mikroorganizmy. Hydroliza enzymatyczna keratyny piór wymaga zintegrowanego działania enzymów proteolitycznych i keratynolitycznych oraz dodatkowo czynników redukujących, które uczestniczą w zrywaniu mostków disiarczkowych cystyny [4]. W hodowli bakterii *B. cereus* B5e/sz w bioreaktorze na ubogim podłożu z dodatkiem piór kurzych w początkowym etapie, do 23. h, wydzielane były głównie keratynazy o aktywności 11 JK, a od 47. h proteazy, których aktywność była prawie dziesięciokrotnie wyższa i osiągnęła wartość 90 JP (rys. 1). Umożliwiło to bakteriom wykorzystanie keratyny piór jako źródła C i N. Po pierwszej dobie hodowli wykazano intensywne wydzielanie do środowiska rozpuszczalnego białka, pochodzącego z keratyny (0,72 mg/ml) oraz aminokwasów (208 µg/cm³), w tym także z grupami sulfhydrylowymi (145 µg/cm³) (rys. 2). Ostatecznym efektem keratynolizy było upłynnienie pierza oraz 56,1 % ubytek suchej masy piór. Ponad po-

łowa białka keratynowego uległa hydrolizie, stanowiąc potencjalne źródło bioaktywnych peptydów. Uzyskiwanie hydrolizatów natywnej keratyny piór w warunkach hodowli bakterii *B. cereus* B5e/sz w bioreaktorze mieszadłowym wydaje się być optymalnym rozwiązaniem ze względu na wydajność procesu.



Rys. 1. Aktywność enzymów proteolitycznych (AP) i keratynolitycznych (AK) w czasie hodowli szczepu *B. cereus* B5e/sz w bioreaktorze.

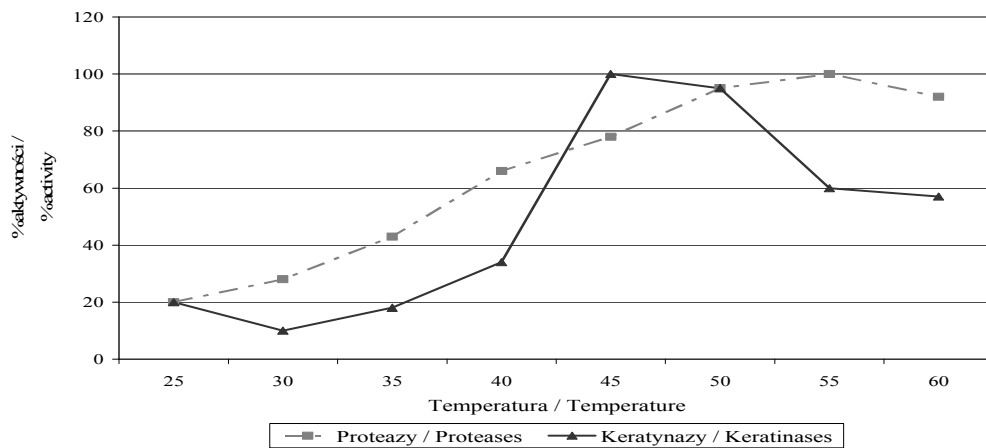
Fig. 1. Biosynthesis of proteolytic (PA) and keratinolytic (KA) enzymes while growing *B. cereus* B5e/sz strain in bioreactor.



Rys. 2. Ilość produktów, białka rozpuszczalnego, grup aminowych i sulfhydrylowych aminokwasów, uwalnianych w czasie hodowli bakterii w bioreaktorze.

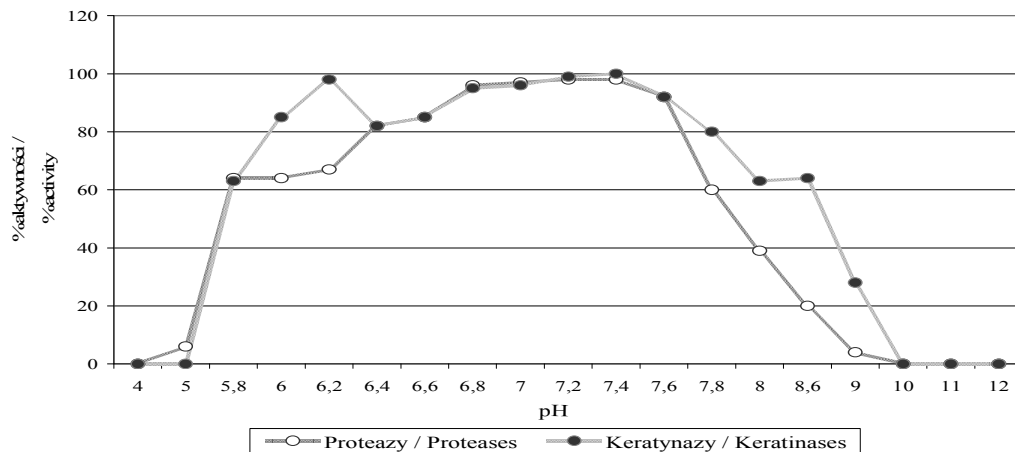
Fig. 2. Amount of products, soluble proteins, amino groups and sulfhydryl amino acids released while growing bacteria in bioreactor.

Enzymy proteolityczne i keratynolityczne zawarte w płynie pochodzonym z kultury bakterii charakteryzowano poprzez wyznaczenie optymalnych warunków ich aktywności. W zakresie temp. 25 - 60 °C proteazy miały najwyższą aktywność w temp. 55 °C, a keratynazy w temp. 45 °C (rys. 3). Zarówno w przypadku enzymów proteolitycznych, jak i keratynolitycznych najwyższe aktywności odnotowano w środowisku obojętnym o pH 6,8-7,6, a keratynaz dodatkowo w pH 6,2 (rys. 4).



Rys. 3. Wpływ temperatury na aktywność proteaz i keratynaz zawartych w płynie pochodzonym z kultury bakterii.

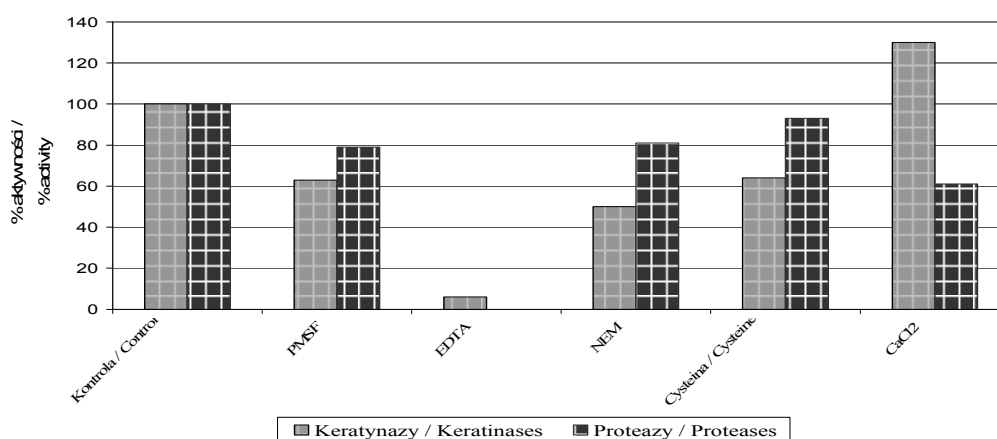
Fig. 3. Effect of temperature on the activity of proteases and keratinases contained in post-culture liquid.



Rys. 4. Wpływ pH na aktywność proteaz i keratynaz płynu pochodzonym z kultury bakterii *B. cereus* B5e/sz.

Fig. 4. Effect of pH on activity of proteases and keratinases contained in post-culture liquid of *B. cereus* B5e/sz strain

Przeprowadzone badania wykazały, że pozakomórkowe proteazy i keratynazy bakterii *B. cereus* B5/esz stanowią mieszaninę enzymów, których aktywność hamowały EDTA oraz w mniejszym stopniu PMSF i NEM. Proteazy można zaliczyć do metaloproteaz, ponieważ EDTA całkowicie hamował ich aktywność (rys. 5). Keratynazy wykazywały większą niż proteazy wrażliwość na wszystkie inhibitory, a dodatkowo aktywowały je jony wapnia. Większość enzymów produkowanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus* jest zaliczana do grupy alkalicznych proteinaz serynowych [3, 16, 21].



Rys. 5. Wpływ inhibitorów i aktywatorów na aktywność keratynaz i proteaz zawartych w płynie pohodowanym bakterii *B. cereus* B5e/sz.

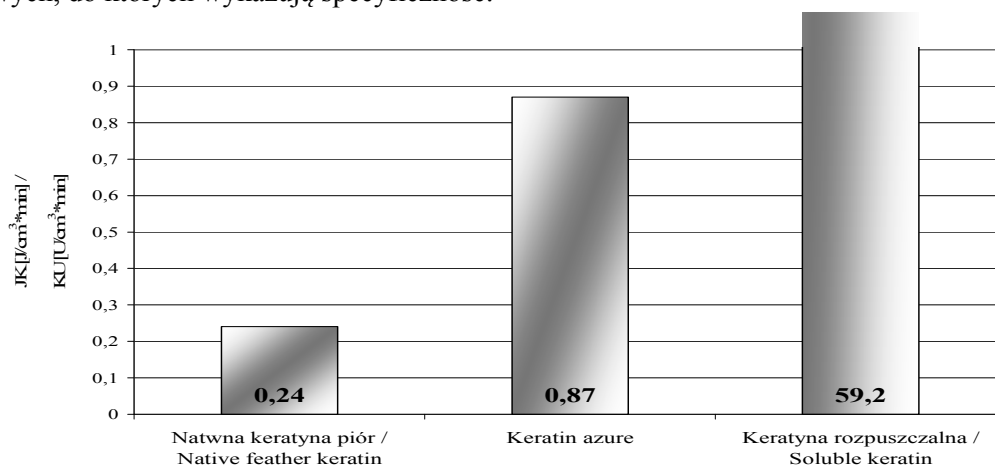
Fig. 5. Effect of inhibitors and activators on activity of keratinases and proteases contained in post-culture liquid of *B. cereus* B5e/sz strain.

Wielu badaczy sugeruje konieczność udziału enzymów redukcyjnych w procesie keratynolizy, obok enzymów proteolitycznych, np. reduktazy disulfidowej, która nie jest wydzielana do środowiska, gdyż jest enzymem związanym z błoną komórkową bakterii. W badaniach własnych również wykazano jej obecność oraz oceniono potencjalną możliwość udziału tych enzymów w sulfitolizie. Aktywność reduktazy disulfidowej w homogenacie komórek wynosiła 5,6 $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$, a w supernatancie homogenatu tylko 1,0 $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$. Większość oczyszczonych keratynaz nie degraduje całkowicie keratyny piór [4, 8, 17].

Białka keratynowe pochodzenia komórkowego oraz zawarte w wyrostkach skóry kręgowców znacznie różnią się podatnością na keratynolizę. Również sposób przygotowania substratu keratynowego i jego pochodzenie mają zasadniczy wpływ na jej końcowy efekt. W badaniach oceniono hydrolizę keratyny piór kurzych rozpuszczonej

z udziałem dimetylosulfotlenku, keratyny natywnej zawartej w piórach kurzych oraz keratyny wełny owczej modyfikowanej chemicznie.

Keratynazy zawarte w płynie pochodzącym z bakterii *B. cereus* B5e/sz wykazały najwyższą aktywność względem keratyny rozpuszczalnej, która wyniosła w optymalnych warunkach działania 59,2 JK. Znacznie niższa była wobec substratu modyfikowanego przez azurowanie (z keratyny wełny owczej) i wynosiła 0,87 JK. Najniższą aktywność wynoszącą tylko 0,24 JK wykazały keratynazy względem natywnego substratu w postaci piór kurzych (rys. 6). Dowiedziono, że ułatwiona była hydroliza rozpuszczonego substratu, wstępnie pozbawionego wiązań sieciujących, i znacznie utrudniona w ich obecności. Enzymy keratynolityczne zawarte w płynie pochodzącym z bakterii *B. cereus* B5e/sz mogą więc być wykorzystane do hydrolizy białek keratynowych, do których wykazują specyficzność.



Rys. 6. Aktywność keratynolityczna enzymów zawartych w płynach pochodzących z szczepu *B. cereus* B5e/sz wobec wybranych substratów keratynowych.

Fig. 6. Keratinolytic activity of enzymes contained in cultures of *B. cereus* B5e/sz strain towards some selected keratinous substrates.

Za pośrednictwem bazy BIOPEP, *in silico* zbadano sekwencję keratyny piór kurzych, wygenerowanej z bazy UniProtKB, pod względem obecności bioaktywnych cząsteczek peptydów. Badane białko (UniProt: P02450) składało się z 98 aminokwasów o masie molowej wynoszącej 9 972 Da. Ogółem w sekwencji aminokwasowej keratyny piór kurzych zawartych było 30 bioaktywnych dipeptydów i 3 tripeptydy, wśród których dominowały inhibitory ACE o aktywności przeciwnadciśnieniowej (tab. 1). Ponadto stwierdzono obecność dwóch dipeptydów PG i GP o aktywności antyamnezycznej, przeciwrzepliwej i regulacyjnej. Tripeptyd PGP może wykazywać

aktywność chemotaktyczną, obniżającą łaknienie i inhibitora dipeptydylopeptydazy IV (tab. 1).

Tabela 1

Bioaktywne peptydy zawarte w sekwencji aminokwasów keratyny piór kurzych; (Y) względna częstość występowania peptydów o danej aktywności [%].

Bioactive peptides contained in the amino acid sequence in chicken feather keratin; (Y) relative occurrence frequency of fragments with definite activity [%].

Liczba peptydów Number of peptides	Sekwencja peptydów Sequence of peptides	Y [%]	Aktywność biologiczna Biological activity
30	RF, FP, LPG, GP, PL, RP, LA, VP, AA, GF, VG, GI, GL, AG, GR, FG, GS, GV, GG, SG, LG, EG, PG, VR, SF, RR, CF, PT, PQ, IQP	59,68	ACE inhibitor ACE inhibitor
6	GP, LA, FP, LP, VP, VV	16,13	inhibitory / inhibitors
3	PGP, PG, GP	6,45	antyamnezyjna / antiamnesic
3	GP, PGP, PG	6,45	przeciwkrczepliwa / antithrombotic
3	GP, PGP, PG	6,45	regulacyjna / regulating
1	PGP	1,61	obniżająca łaknienie / anorectic
1	LA	1,61	regulująca proteolizę ubikwitynozależną activating ubiquitin-mediated proteolysis
1	PGP	1,61	chemotaktyczna / chemotactic

Przeprowadzona analiza *in silico* ujawniająca możliwość uzyskania bioaktywnych peptydów z keratyny piór kurzych skłania do kontynuowania badań w tym zakresie. Otrzymane wyniki stanowią wstęp do dalszych prac badawczych obejmujących keratynolizę, izolację peptydów oraz ocenę ich aktywności biologicznej.

Wnioski

1. Szczep bakterii *B. cereus* B5e/sz wykazuje zdolność biosyntezy pozakomórkowych proteaz, które efektywnie upłynniają keratynę piór kurzych.
2. Wstępnie scharakteryzowano pozakomórkowe proteazy bakterii *B. cereus* B5e/sz o wysokiej specyficzności względem keratyny piór kurzych, jako mieszaninę względnie termostabilnych obojętnych metaloproteaz.
3. Hydrolizat białka włókienkowego, jakim jest keratyna, może stanowić potencjalne źródło peptydów o aktywności biologicznej.
4. Metodą *in silico* wykazano, że w sekwencji aminokwasowej keratyny piór kurzych zawarte są głównie di- i tripeptydy o aktywności biologicznej. Największą

względną częstością występowania wynoszącą prawie 60 % charakteryzował się inhibitor ACE.

Literatura

- [1] Brandelli A., Daroit D.J., Riffel A.: Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 1735-1750.
- [2] Carlberg I., Mannervik B.: Glutathione reductase. *Methods Enzymol.*, 1985, **113**, 484-495.
- [3] Cheng S.W., Hu H.M., Shen S.W., Takagi H., Asano M., Tsai Y.C.: Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995, **12** (59), 2239-2243.
- [4] Gupta R., Ramnani P.: Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **70**, 21-33.
- [5] Dziuba J., Fornal Ł. (pod red.): Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności. WNT, Warszawa 2009.
- [6] Kim J.M., Lim W.J., Suh H.J.: Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochem.*, 2001, **37**, 287-291.
- [7] Kunert J., Stránský Z.: Thiosulfate production from cystine by the keratinolytic prokaryote *Streptomyces fradiae*. *Arch. Microbiol.*, 1988, **150**, 600-601.
- [8] Lee H.D.B., Suh J.H.H., Suh H.J.: Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, **123** (97).
- [9] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-273.
- [10] Łaba W., Rodziewicz A.: Biodegradacja odpadów keratynowych z przemysłu drobiowego przy udziale bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Sarcina*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 2004, **3** (1-2), 109-120.
- [11] Riemer C.R., Kada G., Gruber H.J.: Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 266-276.
- [12] Rodziewicz A., Łaba W.: Keratyny i ich biodegradacja. *Biotechnologia*, 2006, **2** (73), 130-147.
- [13] Rodziewicz A., Łaba W.: Biodegradation of feather keratin by *Bacillus cereus* in pure culture and compost. *EJPAU.*, 2008, **11**(2), #03.
- [14] Shih J.C.H., Xiang Lin., Miller E.S.: DNA encoding *Bacillus licheniformis* PWD-1 Keratinase. Patent: US 5,712,147, 1998.
- [15] Snyder S.L., Sobociński P.Z.: An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic amid method for the determination of amines. *Anal. Biochem.*, 1975, **64**, 284-288.
- [16] Suntornsuk W., Suntornsuk L.: Feather degrading by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Biores. Technol.*, 2003, **86**, 239-243.
- [17] Suntornsuk W., Tongjun J., Onnim P., Oyama H., Ratanakanokchai K., Kusamran T., Oda K.: Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **21**, 1111-1117.
- [18] Wawrzekiewicz K., Łobarzewski J., Wolski T.: Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1987, **25**, 261-268.

**PROTEOLYSIS OF CHICKEN FEATHER KERATIN USING EXTRA-CELLULAR
PROTEOLYTIC ENZYMES OF *BACILLUS CEREUS* B5E/SZ STRAIN**

S u m m a r y

While growing a *Bacillus cereus* B5e/sz strain on a synthetic, feather-containing medium, keratins classified as fibrous proteins were biodegraded. Their hydrolysis occurred in the presence of keratinolytic proteases released into the environment. Those enzymes liquefied the insoluble native keratin, the chemically modified keratin, and, to a much higher extent, the soluble keratin. The bacterial keratinases constituted a mixture of relatively thermostable, neutral metalloproteases exhibiting a keratinolytic activity of 10.9 KU and a proteolytic activity of 90.5 PU. Using an *in silico* analysis, it was found that, within the amino acid sequence of chicken feather keratin, short bioactive peptides were present and an ACE inhibitor prevailed therein. The keratin hydrolysate could be a source of peptides for potential applications in food products.

Key words: keratin, keratinolysis, *Bacillus cereus*, proteases, bioactive peptides ☒