B 3732

EGY ÚJ KERATINBONTÓ *BACILLUS LICHENIFORMIS* TÖRZS IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE

PhD értekezés tézisei

Készitette:

Rozs Magdolna

SZTE TTK

Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED 14.

Témavezetők:

Dr. Manczinger László és Dr. Vágvölgyi Csaba

SZEGED, 2001

BEVEZETÉS

A toll-liszt protein tartalma megközelíti a húslisztét (a húslisztét 55%, a toll-liszt pedig 45%). Bár az állatok a tollból nem tudják az összes proteint hasznosítani, mégis jól pótolja a húslisztet, amelynek nagy részét Magyarországon importból kell beszerezni. Ilyen körülmények között a toll-liszt nemcsak takarmányt pótol, hanem importot is.

A mikrobiális enzim-technológia és ezen belül a keratinolítikus proteázok kutatásának eredményei lehetőséget biztosítanak a baromfitoll alacsony energiaigényű biológiai átalakítására, amelynek során egy potenciálisan környezetszennyező anyagból, egy proteinben gazdag és jelentős tápértékű takarmány, vagy magas nitrogéntartalmú értékes komposzt-anyag keletkezik.

A baromfi testsúlyának körülbelül 5 - 7 %-át teszi ki a tollazat. Jelentősége a test szigetelésében, a mozgásban és a madarak környezethez történő alkalmazkodásában meghatározó. A baromfitoll valószínűleg a természetben előforduló keratin tartalmú anyagok közül a legnagyobb mennyiségben fordul elő. A baromfi emberi táplálékként történő feldolgozása során a toll hulladékként halmozódik fel. A termelődő hulladék az iparág jelentős fejlődésének következtében egyre nagyobb környezetvédelemi problémát jelent.

Nyilvánvaló, hogy a baromfitoll nagy mennyiségben rendelkezésre álló, az állati táplálkozás szempontjából potenciálisan hasznos protein és aminosav forrás. A toll takarmányként történő újrahasznosításának kérdésköre azért tarthat számot az állati takarmányozás szakértőinek kiemelt figyelmére, mivel proteinekben igen gazdag. Felhasználását nehezíti, hogy emésztése nagyon nehéz, továbbá igen alacsony a biológiai tápértéke, ugyanis a táplálékként történő felhasználáshoz kevés benne a létfontosságú aminosav (mint például a metionin, a lizin, a hisztidin és a triptofán).

A tollak összetétele eltérő lehet. Az alapvető, esszenciális aminosavak koncentrációja, mint amilyenek a metionin, a lizin és a hisztidin, csökken a broiler csirkék tollában koruk előrehaladtával, míg ezzel egyidejűleg a nem alapvető aminosavak aránya növekszik. A toll proteinjének táplálkozás szempontjából nehézséget okozó tulajdonságai abból erednek, hogy molekuláris szerkezete azt a célt szolgálja, hogy létrejöhessen a toll szerkezeti szilárdsága. Ugyanez a magyarázata annak is, hogy a természetes keratin miért nem oldódik és miért nem tudja a legtöbb

proteolítikus enzim lebontani. A tollazat mechanikus stabilitása és a proteolítikus enzimek lebontó hatásával szembeni ellenállása a protein lánc szoros összerendeződésével magyarázható, amely az alfa-helix (alfa keratin) és a béta – redős szerkezet (béta-keratin) által épül fel egy többszörösen összetett („supercoiled") polipeptid lánccá. A polipeptid láncban nagy számban fordulnak elő keresztkötések: elsősorban a diszulfid kötések magas arányát kell kiemelnünk.

A cisztein jelentős mennyisége elősegíti a cisztein hidak kialakulását. A hidrogénkötések, a szuperkoild szerkezet stabilizáló hatása és a hidrofób kölcsönhatások mechanikai szilárdságot és proteolítikus ellenálló képességet biztosítanak a keratinnak.

A tollból nyert táplálék jobb emészthetősége érdekében alkalmazott hagyományos módszer a hidrotermikus lebontáson alapszik. Azonban Papadopoulus (1989), továbbá Latshaw és munkatársai (1994) szerint, a takarmány előállításában a hidrotermikus kezelés csupán változó és limitált hatásfokú eredményhez vezet, mivel hozzájárul az alapvető aminosavak, mint a lizin, a metionin és a triptofán mennyiségének csökkenéséhez, illetve előidézi a táplálék szempontjából értéktelen nem természetes aminosavak, mint a lizinoalanin és a lantionin kialakulását.

Amennyiben összevetjük a toll hagyományos feldolgozásának költségeit annak korlátozott táplálékjavító hatásával, az új alternatív technológiák kutatása indokoltnak tűnik, ami a táplálkozási érték javításával és a környezet fokozottabb védelmével, továbbá kedvező költség hatékonysággal kecsegtetnek.

KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK

A kutatások szerint a mikroorganizmusok között jelentős számú gomba és baktérium képes a keratin hasznosítására. Számos szaprofita és parazita gomba, aktinomiceta és *Bacillus* faj keratin bontó képessége ismert. Továbbá mindig újabb, újonnan izolált mikroorganizmusról szerzünk tudomást, amelyek keratinolítikus tulajdonságokat mutatnak.

A keratin tartalmú szubsztrátok természetes lebomlásának vizsgálata, valamint ennek laboratóriumi körülmények közötti megismétlése arra enged következtetni, hogy a tollnak állati takarmányként történő hasznosítása biotechnológiai úton megvalósítható.

A mikrobiális technológia alkalmazásának a következő előnyei vannak a toll feldolgozásánál: először is, a mikroorganizmusok tenyésztése és a keratinázok aktivitása azt eredményezheti, hogy a toll keratinjának struktúrája megváltozik. Ez megváltoztathatja a keratin ellenállóképességét a táplálkozó állat lebontó enzimeivel szemben. Továbbá a tollból készült táplálék tápértéke feljavítható a mikroba protein biomassza segítségével (ez pótlólagos és additív is lehet). Barabas (1986) úgy találta, hogy a lizin, metionin és arginin magasabb koncentrációja figyelhető meg az erjesztett tollban összehasonlítva a nem erjesztettel, ami arra enged következtetni, hogy nem csak a keratint lehet protein forrásként felhasználni, hanem a mikroba biomasszát is. Ezt megelőzően Elmayergi és Smith megfigyelte, hogy az *S. fradiae* metionint szekretáló mutáns alkalmazásával a toll-fermentumban a metionin és lizin tartalom lényegesen növekedett. Harmadszor, lehetséges a toll mikrobiális fermentációjával történő aminosav előállítás.

A baromfitoll és más keratinok potenciális proteinforrást jelentenek az állatállomány számára, de amionosav összetételük nem megfelelő, és nehezen emészthetőek, ami a madarak tollazatának strukturális funkciójából fakad. A keratinbontó mikroorganizmusok természetbeni előfordulása azt bizonyítja, hogy létezik, illetve kidolgozható egy hasznosítható mikrobiális-enzim technológia, amely összehasonlítva a hagyományos hidrotermikus előállítás végtermékével, képes egy tápérték szempontjából kiegyensúlyozottabb és emészthetőbb termék előállítására. Végül az is leszögezhető, hogy egy ilyen mikrobiális enzim-technológia alacsony energiaigényű és igen környezetbarát.

Azok a biotechnológiai módszerek, amelyek mikroorganizmusok és enzimeik alkalmazásán alapulnak jó megoldásnak tünnek a jövőben. A továbbiakban a hangsúlyt az előállítási folyamatban a keratinázok indukciójára, a keratinok tulajdonságaira, a keratinolízis mechanizmusaira és korlátaira kell helyezni. Ennek érdekében tekintjük át a mikrobiológiai keratinolízissel kapcsolatos adatokat és próbáltunk meg kutatásainkkal is hozzájárulni e terület megismeréséhez. A toll tápértékének fokozása azt eredményezheti, hogy a szójabab és a hal állati táplálékként történő felhasználása visszaszorulhat. Továbbá a toll biotechnológiai átalakítása valószínűleg jó szolgálatot tehet mind a baromfiiparnak, mind az embernek és a környezetnek. Lényegesek ezek a vizsgálatok azért, mert a BSA fertőzések széleskörű terjedésének hatására az állati hulladékok visszaetetését számos országban hosszabb-rövidebb időre betiltották és a kutatók egyenlőre más alternatív lehetőséget keresnek a hulladéktoll, mint környezeti

hulladék újrahasznosítására. Ilyen biotechnológiai eljárás lehet a komposztálás, amelynek során a hulladéktollból magas nitrogén tartalmú komposzt termék keletkezik.

CÉLKITŰZÉSEK

A szakirodalomban sokféle baktérium és gomba keratináz és proteáz termeléséről találhatunk adatokat.

1. Az általunk izolált keratinbontó baktérium rendszertani azonosítását klasszikus és molekuláris biológiai módszerekkel terveztük megvalósítani.

2. Ahhoz, hogy a törzs intenzív keratinbontó képességét biokémiai szinten értékelni tudjuk, tervbe vettük, hogy a törzs
   a, extracelluláris proteáz szekrécióját,
   b, a szekretált proteáz specifitásátási és aktivitásbeli jellegzetességeit feltárjuk.

3. Arra is választ kellett keresnünk, hogy a környezeti faktorok miként befolyásolják a törzs proteáz termelését és keratinbontó képességét.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Mikrobiológiai eljárások.
- PCR technika.
- Enzimtisztítás gél szűréses oszlop-kromatográfiával.
- Enzimaktivitás (tripszin, kimotripszin és kimo-elasztáz) mérések baktérium kultúrából és baktériumsejt mentes fermentléből, valamint tisztított enzimmel, kromogén és fluorogén szubsztrátokkal.
- Fermentációs eljárások.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Egy új keratinbontó baktériumot sikerült izolálnunk részben bomlott tollról, amelynek a K-508 nevet adtuk. Ez az izolátum nagyfokú tollbontó aktivitást mutatott baromfitollon optimális tenyésztési körülmények között; ekkor a tápközeg tollat tartalmazott, a pH 7.0 volt és a tenyésztési hőmérséklet 47°C. Fenotípusának alapvető jellemzője a gyors mozgású Gram-pozitív pálcaforma, e mellett a metabolikus teszt és a rDNS szekvencia analízis alapján egyértelműen *Bacillus licheniformis*-nak azonosítottuk. Tenyészetének fermentleve aktivitást mutatott N–Bz–Phe–Val–Arg–p–nitroanilid, N–Szukcinil–Ala–Ala–Pro–Phe–p–nitroanilid, N–CBZ–Gly–Gly–Leu–p–nitroanilid és N–CBZ–L–Ala–L–Ala–L–Ala–L–Leu–p–nitroanilid kromogén proteáz szubsztrátokon, semleges pH környékén.

Az irodalomban eddig leírt keratinbontó mikrobáktól a K-508 izolátum abban tér el, hogy szignifikáns keratinolítikus aktivitást mutat a kezeletlen (minden előkezeléstől mentes) toll keratinján SH-redukáló szerek jelenlétében. A mikroba mind a tripszin-, mind pedig a kimotripszin-típusú proteázokat konstitutívan termeli.

A *Bacillus* nemzetségből több magas keratinolítikus aktivitású baktériumot írtak le és ezen belül is elsősorban a *Bacillus licheniformis* ilyen jelentősége kiemelkedő. Kutatásaink során izolált új magas keratinolítikus aktivitású *B. licheniformis* törzs, tripszin- és kimotripszin-típusú proteázokat termel gyakorlatilag a felhasznált szénforrástól függetlenül, protein vagy peptid inducer hiányában is. Ez egy szokatlan sajátosság figyelembe véve a baktériumok proteázainak szabályozásáról ismerteket. A baktériumok extacelluláris proteázai általában indukció és represszió útján szabályozottak. Más *B. licheniformis* fajok esetében, pl. PWD-1, a glükóz gyakorlatilag teljes mértékben szupresszálja a proteáz termelést és a MIR29 esetében a glükóz mellett a glicerol, D-xilóz és szacharóz szintén erős represszornak bizonyult. A K-508 esetében valószínűleg spontán mutáció következhetett be, ami felelős a különböző proteázok konstitutív szekréciójáért. Egy korábban izolált *B. licheniformis* derepresszált proteáztermelő mutáns képes nagy mennyiségben szubtilizint termelni.

A K-508 törzs kiváló keratinbontónak bizonyult, míg a baktériumsejt mentes fermentlé csak lassan tudta a keratint bontani. Eredményeink figyelembevételével a K-508 konstitutívan proteázt szekretáló *B. licheniformis* törzs alkalmas a keratintartalmú hulladék nagy hatásfokú *in situ* bakteriális lebontására (pl. komposztálási technológia).

A fermentléből a tripszin-típusú enzimet is izoláltuk és részben jellemeztük. Az enzim konstitutívan termelődik és nagy aktivitást mutat az N–Bz–Phe–Val–Arg–p–nitroanilid kromogén szubsztráton. Az enzim pH optimuma 8,5 értéknél volt és a legnagyobb aktivitást 52°C-on mértünk. Elválasztását Sephadex G-100-as oszlopon végeztük és megállapítottuk, hogy molekulasúlya 42kD körüli. Az enzimet, ami a *Bacillus* nemzetségnél újonnan leírt, tiol proteáz, a TPCK, TLCK, PMSF és EDTA nem gátolta, míg a $HgCl_2$ és a pCMB csökkentette az aktivitását. Ami a mikroorganizmusokat illeti, azt találtuk, hogy ilyen típusú extracelluláris proteázokról irodalmi adatok, egyedül a rovar patogén fonalas gomba *Beauveria bassiana*, a *Vibrio harvey* egy patogén törzs és egy pszikrotróf *Azospirillum sp.* törzs esetében fellelhetőek.

ÖSSZEFOGLALÁS

Egy új keratinbontó baktériumot sikerült izolálnunk részben bomlott tollról. A későbbiekben jellemzett törzsnek a K-508 jelzést adtuk. Ez az izolátum nagyfokú tollbontó aktivitást mutatott baromfitollon optimális tenyésztési körülmények között; 47°C tenyésztési hőmérsékleten pH 7 értéknél. A K-508 törzs egy Gram-pozitív baktérium. Egyenes pálcika alakú, elektronmikroszkópos felvételek alapján a sejtek 2,5-3,5 mikron hosszúságúak és 0,8-1,0 mikron szélességűek, a végeik lekerekedettek. A sejtek egyesével vagy kettesével fordulnak elő, de láncot is alkothatnak. Sejtenként egy szubterminálisan elhelyezkedő ovális endospóra termelődik. Opálos, szabálytalan alakú telepeket képeznek, ami egyöntetűen csillogó, száraz, sima és rögös is lehet. A sejtek mozgásképesek. A baktérium körülbelül 20°C és 55°C közötti hőmérséklet-tartományban nő, hőmérséklet-optimuma 47°C.

A K-508 baktérium faj részleges 16S rDNS szekvenciáját meghatároztuk és összehasonlító analízist végeztünk egy nyilvános adatbankban tárolt szekvenciákkal. Az izolátum a *Bacillus* nemzetség tagjaival mutat rokonságot. Továbbá nagy szekvencia azonosság (>98%) volt megfigyelhető a K-508 és a *Bacillus licheniformis* izolátumok más ismert 16S rDNS szekvenciái között. Ez a nagy mértékű szekvencia azonosság, egyértelműen mutatja, hogy a K-508 a *B. licheniformis* faj egy új törzse. Ezt az eredményt a metabolikus tesztek során kapott adatok is alátámasztották.

API-ZYM diagnosztikai teszttel végzet kisérletekben a mikroba magas foszfát és észteráz aktivitást mutatott. A diszacharáz aktivitások közül csak β-glükozidáz és β-galaktozidáz aktivitás volt tapasztalható. Aminopeptidáz aktivitás nem volt kimutatható a fermentlében.

Inducer nélküli glükóz tartalmú minimál sóoldatban, a törzs két típusú proteázt termelt, a tripszin-típusú (aktívitás: Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilidon) és a kimotripszin-típusú proteázt (aktivitás: Szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidon). Az örölt tollat tartalmazó fermentlé nagyon hasonló szubsztrát-affinitási képet mutat. Az induktív hatásra reagálva tejpor vagy az oligopeptid tartalmú élesztőkivonat jelenlétében a törzs kimoelasztáz-típusú aktivitást (CBZ-Gly-Gly-Leu-p-nitroanilid hasítása) mutató proteázt is termelt. Lehetséges, hogy ez az aktivitás a kimotripszin-típusú enzimtől származik, mint ahogy ezt már megfigyelték más *B. licheniformis* törzsek esetében. Ennek a proteáznak a K-508 törzs esetében nincs szerepe a keratin lebontásában, mivel az örölt tollport tartalmazó fermentlében nem volt jelen.

Az irodalomban eddig leírt keratinbontó mikrobáktól a K-508 faj abban tér el, hogy szignifikáns keratinolítikus aktivitást mutat a kezeletlen (minden előkezeléstől mentes) toll keratinján SH-redukáló szerek jelenlétében. A mikroba mind a tripszin-, mind pedig a kimotripszin-típusú proteázokat konstitutívan termeli. A rövidebb oligopeptid szubsztátok egyik típusú proteáz esetében sem bizonyultak jó szubsztrátnak. A kimoelasztáz-típusú aktivitás kivételével a kazein (tejpor), mint proteáz inducer nem fokozta szignifikánsan a törzs proteáz termelését. A K-508 törzs proteáz termelése gyakorlatilag nem függ a használt szénforrás típusától, glükóz mellett egyéb mono- és diszacharidok is kielégítő vagy magas szintű proteáz termelést eredményeztek, protein vagy peptid inducerek hiányában is. Ez egy szokatlan viselkedés figyelembe véve a baktériumok proteázainak szabályozásáról leírtakat. A baktériumok extacelluláris proteázai általában indukció és represszió útján szabályozottak. Más *B. licheniformis* fajok esetében, pl. PWD-1, a glükóz gyakorlatilag teljes mértékben szupresszálja a proteáz termelést és a MIR29 esetében a glükóz mellett a glicerol, D-xilóz és szacharóz szintén erős represszornak bizonyult. A K-508 esetében valószinűleg spontán mutáció következhetett be, ami felelős a különböző proteázok konstitutív szekréciójáért. Egy korábban izolált *B. licheniformis* derepresszált proteáz-termelő mutáns képes nagy mennyiségben szubtilizint termelni.

A mikroba két különböző típusú proteázt termel, a tripszin-típusú proteázt (amely Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid-en aktív) és a kimotripszin-típusú proteázt (amely

Szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid-en aktív). A két típusú proteáz közül az egyik, a tripszin-típusú nagyobb stabilitást mutat a fermentlében. A kimotripszin-típusú enzim egy nagyon gyors lebomláson ment keresztül a nyers fermentlében és ez a lebomlás felgyorsult a 10-szeresére töményített mintákban. Ebből adódóan a tripszin-típusú enzimet tisztítottuk, Sephadex G-100-as gél-szűréssel és jellemeztük. A tripszin-típusú enzim egyetlen éles csúcsként jelent meg a 26-31 frakcióknál és továbbra is magas aktivitást mutatott a Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid, specifikus kromogén tripszin szubsztráton. Az enzim molekulasúlyát (Mw) 42 kD-nak határoztuk meg.

Mérések alapján leszögezhető, hogy ez az enzim alacsony lúg és magas hőmérséklet toleranciájú tripszin-típusú proteáz, melynek pH=8.5 és 52°C a hőmérséklet optimuma. Az enzimet, ami a *Bacillus* nemzetségnél újonnan leírt, tiol proteáz, a TPCK, TLCK, PMSF és EDTA nem gátolta. Nagy valószínűség szerint, ez a tripszin-típusú proteáz ciszteint tartalmaz az aktív centrumában, mivel 1 mM $HgCl_2$ nagymértékben gátolja az enzimet. Ebből kifolyólag ez a proteáz a tiol proteázok csoportjába tartozik, ami nem gyakori a mikroorganizmusok extracelluláris proteázai körében. Ilyen típusú extracelluláris proteázokról irodalmi adatok, egyedül a rovar patogén fonalas gomba *Beauveria bassiana*, a *Vibrio harvey* egy patogén törzse és egy pszikrotróf *Azospirillum* törzs esetében ismertek.

A törzs fent tárgyalt tulajdonságai előnyösek lehetnek ipari szintű fermentációs folyamatokban. Szemben azzal a ténnyel, hogy a baktérium a baromfitollat rövid idő alatt képes lebontani, mind rázatott kultúrában, mind pedig fermentorban, az induktív és a nem-induktív fermentlevek csak nagyon alacsony keratin bontó aktivitást mutattak, amit diszulfid-híd redukáló ágensekkel (2-merkaptoetanol és ditriotreitol) lehet fokozni.

A K-508 törzs kiváló keratin bontónak bizonyult, míg a baktériumsejt mentes fermentlé csak lassan tudta a keratint bontani. Eredményeink figyelembevételével a K-508 konstitutív proteáz-szekretáló *B. licheniformis* törzs alkalmas a keratinhulladék nagy hatásfokú *in situ* bakteriális lebontására (pl. komposztálási technológia).

AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ TARTOZÓ KÖZLEMÉNYEK

M. Rozs, L. Manczinger, Cs. Vágvölgyi and F. Kevei
Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. FEMS Microbiology Letters. *(in press)*

M. Rozs, L. Manczinger, Cs. Vágvölgyi, F. Kevei, A. Hochkoeppler & A. Vara y Rodriguez
Fermentation characteristics and secretion of proteases of a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters. *(in press)*

M. Rozs, L. Manczinger, Cs. Vágvölgyi and F. Kevei
Isolation and characterisation of a new *Bacillus licheniformis* strain with high keratinolytic activity J. Basic of Microbiology and Biotechnology. *(submitted)*