

Wpłynęło 22.11.2016 r.
Zrecenzowano 21.02.2017 r.
Zaakceptowano 02.03.2017 r.
A – koncepcja
B – zestawienie danych
C – analizy statystyczne
D – interpretacja wyników
E – przygotowanie maszynopisu
F – przegląd literatury

AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA KERATYNOLITYCZNYCH BAKTERII *Stenotrophomonas rhizophila*

Urszula JANKIEWICZ¹⁾ ADEF, Ewa MIROS¹⁾ BF, Ewa GÓRSKA²⁾ DE,
Anna PRĘDECKA³⁾ AD, Stefan RUSSEL⁴⁾ AD

- ¹⁾ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa i Biologii, Katedra Biochemii
²⁾ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa i Biologii, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów
³⁾ Szkoła Główna Służby Pożarniczej w Warszawie, Wydział Inżynierii Bezpieczeństwa Cywilnego
⁴⁾ Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach

Streszczenie

Bakterie keratynolityczne budzą w ostatnich latach zainteresowanie ze względu na ich potencjał aplikacyjny w utylizacji odpadów z przetwórstwa drobiu, a także przemysłu skórzanego i tekstylnego. W procesie keratynolizy biorą udział enzymy proteolityczne, dodatkowo wspomagane aktywnością reduktaz disulfidowych lub obecnością związków redukujących. Dlatego celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było oznaczenie aktywności proteolitycznej u bakterii *Stenotrophomonas rhizophila*, zdolnych do degradacji piór ptasich podczas hodowli na pożywkach płynnych. Po pięciu dniach hodowli bakterie odwirowano, z uzyskanego supernatantu wytrącono białka siarczanem amonu. Na tak uzyskanym preparacie enzymatycznym przeprowadzono badania mające na celu charakterystykę biochemiczną proteazy *S. rhizophila*. Aktywność proteolityczna była najwyższa w temperaturze 50°C i w pH ok. 11. Proteaza bakterii *S. rhizophila* należy do metalozależnych proteaz serynowych, co wynika z reakcji z inhibitorami specyficznymi. Silną inhibicję aktywności obserwowano w obecności detergentów: bromku heksadecylotrimetyloamoniowego i Tweenu 80 oraz jonów Pb²⁺, Zn²⁺ Cd²⁺, oraz Fe³⁺. Jony Ca²⁺, Mg²⁺ oraz Ba²⁺ powodowały wzrost aktywności proteolitycznej badanego szczepu bakterii.

Słowa kluczowe: aktywność keratynolityczna, aktywność proteolityczna, *Stenotrophomonas rhizophila*

Do cytowania For citation: Jankiewicz U., Miros E., Górka E., Prędecka A., Russel S. 2017. Aktywność proteolityczna keratynolitycznych bakterii *Stenotrophomonas rhizophila*. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 17. Z. 2 (58) s. 103–110.

WSTĘP

Enzymy proteolityczne, znane też jako proteazy, peptydazy czy proteinazy, to enzymy z klasy hydrolaz, zdolne do hydrolitycznej degradacji wiązań peptydowych. Enzymy hydrolityczne, należące do najliczniejszej grupy enzymów są powszechnie stosowane jako preparaty komercyjne. Obecna wartość szacunkowa światowej sprzedaży enzymów przemysłowych jest wyceniana na 1 mld euro, a proteazy stanowią jedną z trzech największych grup enzymów przemysłowych i stanowią ok. 60% całkowitej sprzedaży na świecie [PURCHASE 2016]. Proteazy odpowiadają za wiele różnych funkcji związanych z normalnym funkcjonowaniem komórek, jak również w stanach patofizjologicznych [RAO i in. 1998]. Szczególną grupą proteaz są keratynazy. Są to enzymy zazwyczaj zewnątrzkomórkowe, biorące udział w degradacji keratyny przez hydrolizę jej wiązań peptydowych z tworzeniem mniejszych jednostek, które są łatwo przyswajalne przez komórki bakteryjne. Mikroorganizmy, które potrafią rozkładać to włókienkowe białko zapobiegają zaleganiu odpadów keratynowych w glebie, przyczyniając się tym samym do obiegu pierwiastków w przyrodzie. Specyficzny mechanizm degradacji keratyny przez keratynazy nadal nie jest do końca poznany, jednak przypuszcza się, że proces zachodzi w trzech etapach [RODZIEWICZ, ŁABA 2006]. W pierwszym następuje redukcja siarki z mostków disiarczkowych cystyny za pomocą reduktaz. Drugi etap to tak zwana proteoliza właściwa, a w końcowym etapie zachodzi deaminacja peptydów i utlenienie grup S-H. W enzymatyczną degradację piór zaangażowane są dwa, kooperatywne enzymy – reduktaza disulfidowa i keratynaza. Reduktaza disulfidowa odpowiada za rozpad mostków disiarczkowych cystyny, które to nadają sztywność keratynie zawartej w piórach [GUPTA, SINGH 2014]. Wyniki badań z ostatnich lat donoszą, że istnieje w przyrodzie szeroki zakres mikroorganizmów produkujących keratynazy, w tym grzyby, bakterie i promieniowce [PURCHASE 2016]. Produkowane przez nie proteazy zostały skutecznie zastosowane w rolnictwie, farmacji, w branży skór i tekstyliów, a także w obrębie gospodarki odpadami. Potencjalne zastosowania keratynaz obejmują również dziedziny medycyny, kosmetologii oraz biokontroli biologicznej [JANKIEWICZ i in. 2016; PURCHASE 2016].

METODY BADAŃ

Źródłem zewnątrzkomórkowych proteaz były wyizolowane z gleby bakterie keratynolityczne *Stenotrophomonas rhizophila*. Do hodowli bakterii wykorzystano płynne podłoże hodowlane o składzie ($g \cdot l^{-1}$): $KH_2PO_4 - 3$, $K_2HPO_4 - 3$, $MgSO_4 - 2$, $NaCl - 5$, Pepton – 2,5, pocięte i odłuszczone pióra kurze – 10 oraz woda dejonizowana do 1 l. Sterylizacja przebiegała w autoklawie.

Hodowle bakterii prowadzono w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temperaturze 28°C. W 5. dniu hodowli, po zaobserwowaniu całkowitej degradacji piór, hodowle bakteryjne przesączono, a następnie odwirowywano przez 15 min przy 11 200

obr. \cdot min⁻¹. Aktywność proteolityczną w uzyskanym supernatancie oznaczano z wykorzystaniem azokazeiny (Sigma) jako substratu. Mieszanina reakcyjna składała się z 100 μ l supernatantu z hodowli bakterii i 100 μ l 1-procentowego roztworu azokazeiny w 100 mM buforze Tris-HCl. Reakcję prowadzono w temperaturze 40°C przez 30 min, a następnie hamowano aktywność enzymu przez dodanie 200 μ l 10-procentowego kwasu trichlorooctowego. Absorbancję mierzono przy długości fali 420 nm względem próby kontrolnej. Uzyskany wynik przeliczono na jednostki aktywności zdefiniowane jako przyrost absorbancji $E_{420} = 0,01 \cdot \text{godz.}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Uzyskany po odwirowaniu 5-dniowych hodowli bakterii klarowny płyn poho-dowlany wysalano siarczanem amonu do 85-procentowego wysycenia roztworu. Preparat wirowano przy 12 000 obr. \cdot min⁻¹. Supernatant odrzucono, a pozostały osad rozpuszczono w 20 mM buforu Tris-HCl o pH 7,8.

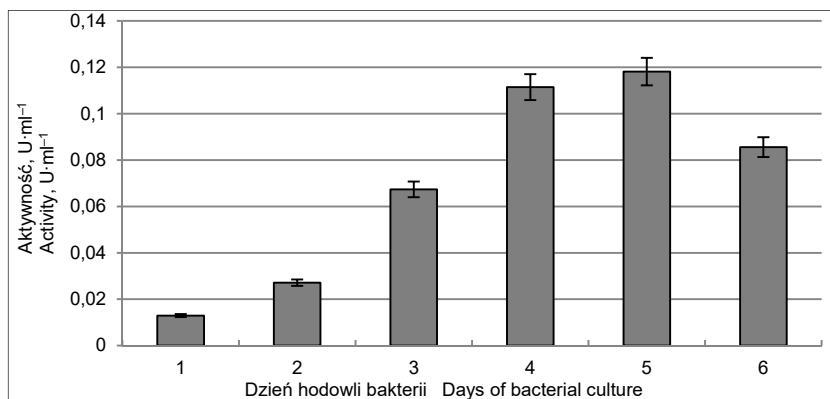
Właściwości biochemiczne enzymu. Do określenia optimum temperaturowego proteazy syntetyzowanej przez szczep *Stenotrophomonas* zastosowano zakres temperatur od +30°C do +70°C. Optimum pH tego enzymu wyznaczono z wykorzystaniem buforu według Brittona i Robinsona o zakresie pH 7,0–11,5. Do określenia wpływu związków chemicznych na aktywność proteazy zastosowano następujące substancje: bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB), jodoacetamid 3 mM, jodoacetamid 1 mM, fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF), kwas wersenowy (EDTA), triton, dimetylosulfotlenek (DMSO), tween, mocznik, laurylosiarczan sodu (SDS). Wpływ metali na aktywność proteazy badano z użyciem następujących jonów: Fe³⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺. Enzym preinkubowano z danym roztworem soli metalu o stężeniu w mieszaninie reakcyjnej 5 mM przez 30 min w temperaturze 4°C, a następnie przeprowadzano właściwy pomiar aktywności proteolitycznej.

Wszystkie wyniki zawarte w pracy o charakterze danych liczbowych są średnią z trzech powtórzeń. Błąd względny, oznaczający maksymalne względne odchylenie wyników od średniej, nie przekraczał 5%.

WYNIKI BADAŃ

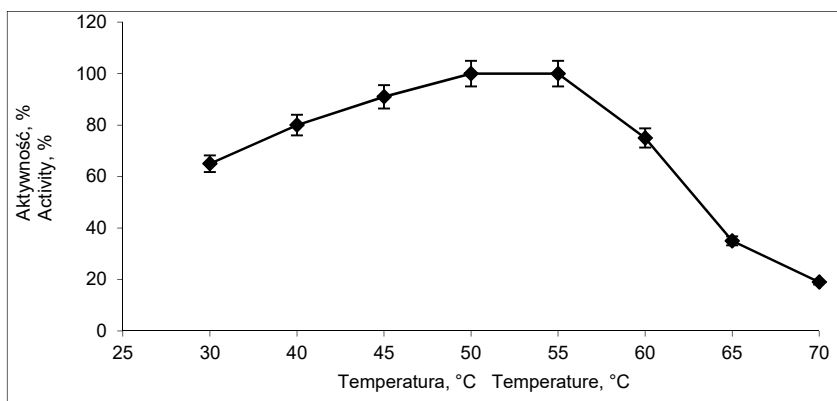
Dynamikę zmian aktywności proteolitycznej w hodowli *Stenotrophomonas rhizophila* wyznaczono na podstawie pomiarów aktywności enzymatycznej w ciągu sześciu kolejnych dni hodowli (rys. 1). Już po pierwszej dobie hodowli aktywność enzymu rosła stopniowo, osiągając największą wartość piątego dnia hodowli (0,11 U \cdot ml⁻¹). Natomiast w szóstym dniu hodowli zaobserwowano niewielki spadek aktywności.

Proteaza syntetyzowana przez *S. rhizophila* wykazywała optimum temperaturowe wynoszące 50°C (rys. 2). Powyżej tej wartości aktywność enzymu gwałtownie spadała. W temperaturze niższej niż 50°C enzym działał z mniejszą wydajnością.



Rys. 1. Dynamika aktywności proteazy syntetyzowanej przez *Stenotrophomonas rhizophila*; źródło: wyniki własne

Fig. 1. The dynamics of the protease activity synthesized by *Stenotrophomonas rhizophila*; source: own study

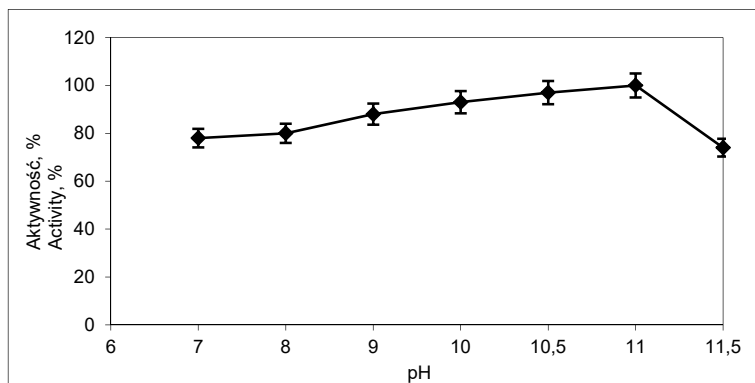


Rys. 2. Wpływ temperatury na aktywność proteazy syntetyzowanej przez *Stenotrophomonas rhizophila*; źródło: wyniki własne

Fig. 2. The effect of temperature on the activity of proteases synthesized by *Stenotrophomonas rhizophila*; source: own study

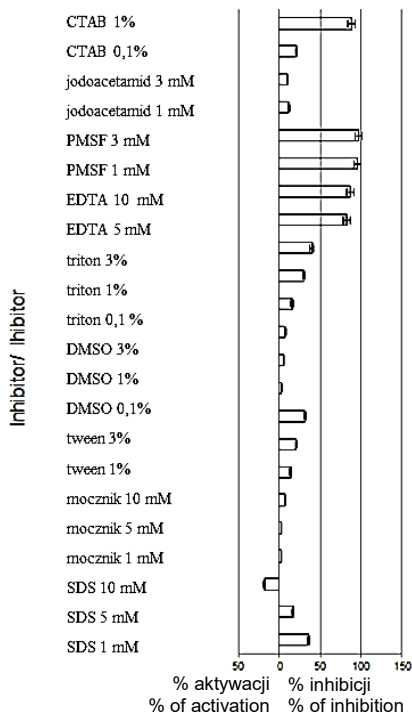
Proteaza syntetyzowana przez *S. rhizophila* najaktywniej hydrolizowała wiązania peptydowe w środowisku zasadowym. Optymalne pH, wyznaczone z użyciem buforu Brittona-Robinsona wynosiło 11,0. Badany enzym wykazywał aktywność w szerokim zakresie pH, jak przedstawiono na rysunku 3.

Zbadano także wpływ inhibitorów na aktywność badanego enzymu (rys. 4). Szczególnie silną inhibicję – powyżej 60% aktywności – zaobserwowano w obecności PMSF, EDTA oraz CTAB. W warunkach doświadczenia stymulację aktywności proteolitycznej uzyskano jedynie w obecności 10 mM SDS.



Rys. 3. Wpływ pH na aktywność proteazy syntetyzowanej przez *Stenotrophomonas rhizophila* z użyciem buforu Britton-Robinson (w zakresie pH 7,0–11,5); źródło: wyniki własne

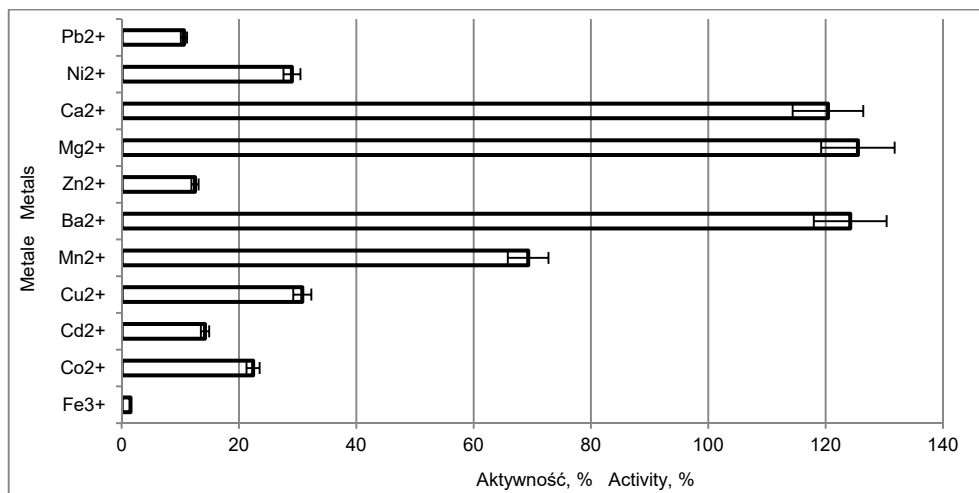
Fig. 3. Effect of pH on the activity of proteases synthesized by *Stenotrophomonas rhizophila* using Britton-Robinson buffer (pH in the range 7.0–11.5); source: own study



Rys. 4. Wpływ inhibitorów na aktywność proteazy syntetyzowanej przez *Stenotrophomonas rhizophila*; CTAB = bromek heksadecylotrimetyloamoniowy, PMSF = fluorek fenylmetylosulfonylu, EDTA = kwas wersenowy, DMSO = dimetylosulfotlenek, SDS = laurylosiarczan sodu; źródło: wyniki własne

Fig. 4. The effect of inhibitors on the protease activity synthesized by *Stenotrophomonas rhizophila*; CTAB = cetyltrimethylammonium bromide, PMSF = phenylmethane sulfonyl fluoride, EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid, DMSO = dimethyl sulfoxide, SDS = sodium dodecyl sulfate; source: own study

W badaniu wpływu jonów metali na aktywność proteazy syntetyzowanej przez *S. rhizophila* znaczącą aktywację, wynoszącą ponad 120% aktywności próby kontrolnej (niezawierającej jonu metalu), obserwowano w obecności jonów wapnia, magnezu oraz baru. Do jonów metali działających hamująco na aktywność enzymu można zaliczyć żelazo, kadm, cynk i ołów (rys. 5).



Rys. 5. Wpływ jonów metali na aktywność proteazy syntetyzowanej przez *Stenotrophomonas rhizophila*; źródło: wyniki własne

Fig. 5. Effect of metal ions on the activity of the protease synthesized by *Stenotrophomonas rhizophila*; source: own study

DYSKUSJA WYNIKÓW

W niniejszej pracy badano zewnątrzkomórkową, keratynolityczną aktywność bakterii glebowych z rodzaju *Stenotrophomonas rhizophila*. Jest to typowa glebowa bakteria, niepatogenna dla ludzi, opisana jako promująca wzrost roślin [ALAVI i in. 2013]. U badanego szczepu bakterii zaobserwowano zdolność do keratynolizy, dlatego podjęto badania nad jego aktywnością proteolityczną. W hodowli tych bakterii po 5 dniach zaobserwowano całkowitą degradację piór obecnych w podłożu hodowlanym. Podobne wyniki badań przedstawiono dla szczepu *Bacillus* sp. [MAZOTTO i in. 2011]. Częściowo oczyszczony enzym poddano badaniom charakteryzującym jego właściwości. Większość keratynaz, jak również enzym opisany w pracy, optymalnie działa w środowisku zasadowym. Szczep *S. rhizophila* wykazywał największą aktywność działania w środowisku o pH równym 11,0. Dla porównania proteaza syntetyzowana przez *Bacillus* sp. miała optimum pH ok. 8 [DEIVASIGAMAN, ALAGAPPAN 2008]. Optymalna temperatura do działania keratynaz waha się w granicach 40–60°C [RODZIEWICZ, ŁABA 2006]. W przypadku aktywności proteolitycznej u badanego szczepu bakterii wyznaczono optimum temperaturowe w 50°C.

Podobne wyniki uzyskano dla enzymów izolowanych od bakterii z rodzaju *Stenotrophomonas maltophilia*, gdzie optimum temperaturowe wynosiło 40–50°C [FANG i in. 2013]. Wyższe optimum temperaturowe, oscylujące w granicach 60–70°C, obserwowano w przypadku keratynazy-1 i keratynazy-2, produkowanych

przez *Bacillus halodurans* PPKS-2 [BANERJEE in. 2014]. Keratynazy należą za zwyczaj do metaloproteaz bądź proteaz serynowych. Charakterystyczną cechą proteaz serynowych jest ich inhibicja przez PMSF. Natomiast inhibitorem diagnostycznym dla metaloproteaz jest EDTA. W przypadku badanej aktywności obserwowano inhibicję zarówno pod wpływem PMSF, jak i EDTA. Można więc przypuszczać, że badany enzym należy do metalozależnych proteaz serynowych. Taki nietypowy mechanizm działania inhibitorów zaobserwowano także w przypadku keratynaz izolowanych z hodowli *Aspergillus flavus* [KIM 2007], *Bacillus thurnigensis israelensis* [POOPATHI i in. 2014] oraz *B. licheniformis* [VIGNESHWARAN i in. 2010].

W naszych badaniach u bakterii *S. rhizophila* dużą aktywność proteazy zaobserwowano w obecności jonów Ba^{2+} , Ca^{2+} oraz Mg^{2+} . Podobnie keratynaza produkowana przez *Bacillus* sp. JB99 jest stymulowana przez jony Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} i Ba^{2+} , a hamowana przez Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} i Fe^{2+} [KAINOOR, NAIK 2009]. Obecność jonów Ca^{2+} oraz Mg^{2+} spowodowała wzmocnienie aktywności keratynaz w większości opisanych badań [PURCHASE 2016].

WNIOSKI

1. Badany szczep bakterii *Stenotrophomonas rhizophila* wykazywał właściwości keratynolityczne.
2. Aktywność proteolityczna była największa w temperaturze 50°C i pH ok. 11.
3. Proteaza bakterii *S. rhizophila* należy do metalozależnych proteaz serynowych.
4. Jony Ca^{2+} , Mg^{2+} oraz Ba^{2+} powodowały wzrost aktywności proteolitycznej badanego szczepu bakterii.
5. Aktywność badanego enzymu była silnie hamowana pod wpływem jonów metali ciężkich, takich jak kadm, cynk, ołów, nikiel i żelazo.

BIBLIOGRAFIA

- ALAVI P., STARCHER M., ZACHOW C., MULLER H., BERG G. 2013. Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM144405. *Frontiers of Plant Science*. Vol. 4 s. 141–151.
- BANERJEE A., DIPAK K., HRUDAYANATH T., BIKASH R., KESHAB C. MONDAL, ARNAB S., PRADEEP K. 2014. Structural characterization and active site prediction of bacterial keratinase through molecular docking structural and catalytic study of bacterial keratinase. *Journal of Bioinformatics*. Vol. 1. Iss. 4 s. 67–82.
- DEIVASIGAMANI B., ALAGAPPAN K., M. 2008. Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. *Journal of Environmental Biology*. Vol. 29. Iss. 6 s. 933–936.
- FANG Z., ZHAN J., LIU B., DU G., CHEN J., 2013. Biodegradation of wool waste and keratinase production in scale-up fermenter with different strategies by *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1. *Bioresource Technology*. Vol. 140 s. 286–291.
- GUPTA S., SINGH R. 2014. Hydrolyzing proficiency of keratinases in feather degradation. *Indian Journal of Microbiology*. Vol. 54. Iss. 4 s. 476–480.

- JANKIEWICZ U., LARKOWSKA E., SWIONTEK BRZEZINSKA M. 2016. Production, characterization, gene cloning, and nematocidal activity of the extracellular protease from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 121. Iss. 6 s. 614–618.
- KAINOOR P. S., NAIK G.R. 2010. Production and characterization of feather degrading keratinase from *Bacillus sp.* JB-99. Indian Journal of Biotechnology. Vol 9. Iss. 4 s. 384–390.
- KIM J.-D. 2007. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading Fungus, *Aspergillus flavus* strain K-03. Mycobiology. Vol. 35. Iss. 4 s. 219–225.
- MAZOTTO A., RODRIGUES COELHO R., CEDROLA S., LIMA M., COURI S., DE SOUZA E., VERMELHO A. 2011. Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. Enzyme Research. Vol. 2011 s. 1–7.
- POOPATHI S., THIRUGNANASAMBANTHAM K., MANI C., LAKSHMI V., RAGUL, K. 2014. Purification and characterization of keratinase from feather degrading bacterium useful for mosquito control – A new report. Tropical Biomedical. Vol. 31. Iss. 1 s. 97–109.
- PURCHASE D. 2016. Microbial Keratinases: characteristics, biotechnological applications and potential, microbial bioresources. W: The Handbook of Microbial Bioresources. Red. V.K. Gupta, G.D. Sharma, M.G. Tuohy, R. Gaur. Wallingford. CAB International Publishing s. 634–674.
- RAO M., TANKSALE A., GHATGE M., DESHPANDE V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 62. Iss. 3 s. 597–635.
- RODZIEWICZ A., ŁABA W. 2006. Keratyny i ich biodegradacja [Keratins and their biodegradation]. Biotechnologia. Vol. 2. Iss. 73 s. 130–147.
- VIGNESHWARAN C., SHANMUGAM S., KUMAR T. 2010. Screening and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* isolated from Namakkal Poultry Farm. Researcher. Vol. 2. Iss. 4 s. 89–96.

Urszula JANKIEWICZ, Ewa MIROS, Ewa GÓRSKA, Anna PRĘDECKA, Stefan RUSSEL

THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF KERATYNOLYTIC BACTERIA *Stenotrophomonas rhizophila*

Key words: keratynolic activity, proteolytic activity, *Stenotrophomonas rhizophila*

S u m m a r y

Keratinolytic bacteria arouse interest in recent years because of their potential application in waste from poultry processing and leather industry and textile. In the keratynolysis proteolytic enzymes are involved, in addition to making the disulfide reductase activity or the presence of reducing compounds. Therefore the aim of the research presented in this paper was to determine proteolytic activity in bacteria *Stenotrophomonas rhizophila*, capable of degrading bird feathers during culture on liquid media. After five days the bacterial cultures were centrifuged, the protein from supernatant was precipitated with ammonium sulfate. On the so obtained enzymatic preparation was carried out research aimed at the biochemical characterization of proteases *S. rhizophila*. The proteolytic activity was highest at 50°C and at a pH of approx. 12. The protease of *S. rhizophila* belongs to the metal-dependent serine protease, which results from the reaction of specific inhibitors. A strong inhibition of the activity observed in the presence of detergents: CTAB and Tween 80, and Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Fe^{3+} . Ions Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} resulted in an increase of proteolytic activity studied strain.

Adres do korespondencji: dr hab. Urszula Jankiewicz, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa i Biologii, Katedra Biochemii, ul Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; tel. +48 22 593-25-58, fax 22 593-25-62, e-mail: urszula_jankiewicz@sggw.pl