

**EGY ÚJ KERATINBONTÓ *BACILLUS LICHENIFORMIS*
TÖRZS
IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE**

**Doktori értekezés
(PhD)**

**Készítette:
Rozs Magdolna
SZTE TTK
Mikrobiológiai Tanszék**

**Témavezetők:
Dr. Manczinger László és Dr. Vágvölgyi Csaba**

SZEGED, 2001

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. A faromfitoll hasznosításának lehetőségei és korlátai.....	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A keratinbontó mikroorganizmusok és enzimeik.....	5
2.1.1. A mikrobák segítségével történő keratinolízis és a keratináz előállítása.....	5
2.1.2. A keratinbontó proteázok (keratinázok) tulajdonságai.....	7
2.1.3. A mikrobiális keratinolízis mechanizmusa.....	8
2.1.4. A tollból készült takarmány mikrobiológiai kezelése: biotechnológiai megvalósíthatóság.....	12
2.2. A mikroba proteázok molekuláris és biotechnológiai sajátosságai.....	15
2.2.1. Mikroba proteázok.....	16
2.2.2. A proteázok csoportosítása.....	17
2.2.3. A proteázok működési mechanizmusa.....	21
2.2.4. A proteázok fiziológiai szerepe.....	23
2.2.5. A proteázok alkalmazása.....	23
2.2.6. A mikrobiális proteázok molekuláris biológiai vizsgálata.....	26
2.2.7. Fehérje tervezés (mérnökség).....	31
2.2.8. Megoldandó problémák és lehetséges megoldásai.....	32
2.2.8. A jövőbeni lehetőségek.....	34
2.3. Következtetések.....	34
3. Anyagok és módszerek	36
3.1. Anyagok.....	36
3.2. Módszerek	47
4. Eredmények	57
4.1. Új keratinbontó <i>Bacillus licheniformis</i> izolálásának körülményei és a mikroba jellemzése, meghatározása.....	57

4.1.1. Keratinbontó baktérium izolálása.....	57
4.1.2. A keratinbontó baktérium meghatározása.....	58
4.1.3. A K-508-as törzs extracelluláris proteázának termelése és tulajdonságai.....	65
5. Eredmények megvitatása.....	74
6. Összefoglalás	76
7. Hivatkozási lista	83

1. Bevezetés

1.1. A baromfitoll hasznosításának lehetőségei és korlátai

A toll-liszt protein tartalma megközelíti a húslisztét (a húsliszté 55%, a toll-liszté 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 keratinolitikus 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 termelői hulladék az iparág jelentős fejlődésének következtében egyre nagyobb környezetvédelmi 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) (Baker és mtsai, 1981; Papadopoulos és mtsai, 1985; Dalev és mtsai, 1997).

A tollak összetétele eltérő lehet (Wang és Parsons, 1997). 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 (Stilborn és mtsai, 1997). 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 proteolitikus enzim lebontani. A tollazat mechanikus stabilitása és a proteolitikus 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 superkoild szerkezet stabilizáló hatása és a hidrofób kölcsönhatások mechanikai szilárdságot és proteolitikus ellenálló képességet biztosítanak a keratinnak.

A tollból nyert táplálék jobb emészthetősége érdekében alkalmazott hagyományos módszer a hidrotermikus lebontáson alapszik. Azonban Papadopoulos (1989), továbbá Latshaw és munkatársai (1994) szerint, a takarmány előállításában a hidrotermikus kezelés csupán változó és limitált határfokú 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.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A keratinbontó mikroorganizmusok és enzimeik

2.1.1. A mikrobák segítségével történő keratinolízis és a keratináz előállítása

A természetben megfigyelhető keratinolízis

A keratin kiemelkedő stabilitása ellenére a toll nem halmozódik fel a természetben, ezzel bizonyítva azt, hogy léteznek természetes lebontó és felhasználó szervezetek. További bizonyítékok, és talán a természetes keratin lebontás alaposabb kutatása azt eredményezhetik, hogy több ismeretre tehetünk szert ezen a területen. A dermatofiták olyan mikroorganizmusok, amelyek a keratin tartalmú állati részekben élőködnek. Amennyiben ezeket a mikroorganizmusokat keratin tartalmú tápközegben neveljük, azok képesek lesznek a keratint szén és nitrogén forrásként felhasználni. A dermatofiták növekedése a keratin tartalmú szubsztrátokon azt bizonyítja, hogy azok képesek olyan proteolitikus enzimek szintézisére, amelyek az egész keratin-komplexet le tudják bontani.

A keratinlebontó mikroorganizmusok és biotechnológiai alkalmazásuk

A kutatások szerint a mikroorganizmusok között jelentős számú gomba és baktérium bizonyítottan képes a keratin hasznosítására (Yu és mtsai, 1969; Elmayergi és Smith, 1971; Takiuchi és mtsai, 1984; Asahi és mtsai, 1985; Wawrzkievicz és mtsai, 1987; Abdel-Hafez és El-Sharoumy, 1990; Malviya és mtsai, 1992; Santos és mtsai, 1996; Simpanya és Baxter, 1996; Singh, 1997). Számos szaprofita és parazita gomba (Safranek és Goos, 1982; Bahuguna és Kushwaha, 1989; Rajak és mtsai, 1991; Hirchmn és mtsai, 1994), aktinomicéta (Noval és Nickerson, 1959; Sohair és Assen, 1974; Naguib és mtsai, 1984; Benedek és mtsai, 1985; Mukhopadhyay és Chandra, 1990; Fasasi, 1997) és *Bacillus* faj (Williams és mtsai, 1990; Takami és mtsai, 1992; El-Shora és mtsai, 1992, 1993; Lin és mtsai, 1992), keratin bontó képessége ismert.

Továbbá mindig újabb, újonnan izolált mikroorganizmusról szerzünk tudomást, amelyek keratinolitikus tulajdonságokat mutatnak.

A keratin tartalmú szubsztrátok természetes lebomlásának vizsgálata, valamint ennek laboratóriumi körülmények közötti megisméltése arra enged következtetni, hogy a tollnak állati takarmányként történő hasznosítása biotechnológiai úton megvalósítható (Linn és mtsai., 1992; Dozie és mtsai., 1994 és Santos és mtsai., 1996).

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 (Elmayergi és Smith, 1971; Barabas, 1986; Benedek és mtsai., 1985; Williams és Shih, 1989). Továbbá a tollból készült táplálék tápértéke feljavítható a mikroba protein biomassza segítségével (ez pótlólagos és additív is lehet). Barabas 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 (1971) 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 (Mohammed El-Akied, 1987; Williams és Shih, 1989).

A keratinbontó mikroorganizmusok ökológiája

A keratinbontó mikroorganizmusok a természetben csaknem mindenütt jelen vannak, habár elsősorban (obligált vagy fakultatív módon) a keratin tartalmú szubsztrátokon növekednek. Talán a dermatofiták csoportja a legjobban kutatott, aminek az oka, hogy a kutatók nagy részét patológiai irányú érdeklődés vezette (Grappel és Blank, 1972; Higuchi és mtsai., 1981; Wawrzkievicz és mtsai., 1987, 1991; Apodaca és McKerrow, 1989; Hanel és mtsai., 1991; Porro és mtsai., 1997). Szennyvízből is izoláltak keratinbontó mikroorganizmusokat (Ulfig és Korcz, 1983, 1994; Ulfig és Ulfig, 1990; Ulfig, 1991; Ulfig és mtsai., 1996). Az állati dermatofita, a *Trychophyton gallinae*, nagyon specifikus a baromfitollra (Wawrzkievicz és mtsai., 1987). A tollbontó baktériumokat gyakran komposzt anyagokból izolálták (Lin és mtsai., 1999), általában azokazein szubsztráton megfigyelhető keratinolitikus aktivitásuk alapján. Ezen kísérletben a nyolc izolált baktériumból az a hét, amelyik bontani tudta a tej

proteint *Bacillus* faj volt. Hasonlóképpen az izolátumok közül azaz öt, amelyik a tollat hidrolizálta *Bacillus licheniformis*. A proteáz gátlási kísérletek azt mutatták, hogy a tollbontó izolátumok proteolitikus enzimeik közül a szerin proteázok a dominánsak.

A keratinbontó képességgel rendelkező, nem-dermatofita gombákat azért izolálták, hogy megfigyelhessék keratinolitikus aktivitásukat, és hogy tisztítsák enzimeiket (Malviya és mtsai., 1992,1993; Dozie és mtsai., 1994). Williams és Smith 1989-ben egy baromfi tollat tartalmazó bomló szemétdombról izolált egy *B. licheniformis* törzset. A *Streptomyces* A11 törzs, amely proteolitikus és keratinolitikus aktivitást mutat, a termőföldből lett izolálva, (Mukhopadhyay és Chandra, 1990). Santos és munkatársai (1996) közölték, hogy az *Aspergillus fumigatus* ami a természetben bőségesen fordul elő, humán és állat patogén, képes a baromfitollat szén és nitrogén forrásként hasznosítani. A keratinbontó mikroorganizmusok szaporodásához különböző ökológiai és környezeti feltételek szükségesek, és széleskörű aktivitást mutatnak. Legtöbb esetben, a mikroorganizmusok szintetizálják és magukból kiválasztják a szubsztrátjaikhoz a proteázokat, hogy a szubsztrátot asszimilálható egyszerű tápanyaggá alakítsák. Dokumentáltak azonban keratinolitikus aktivitású endoproteázokat vagy sejthez kötött enzimeket is (Yu és mtsai., 1971; Wawrzkievicz és mtsai., 1987; Lakmin és mtsai., 1996).

2.1.2. A keratinbontó proteázok (keratinázok) tulajdonságai

Azokat a specifikus proteázokat, amelyeket keratinbontó mikroorganizmusok intracellulárisan vagy extracellulárisan állítanak elő keratinázoknak vagy keratinolitikus enzimeknek nevezzük. Ezeknek az enzimeknek megvan az a tulajdonságuk, hogy kompakt szubsztrátokban is hatnak, ellentétben más proteolitikus enzimekkel, és ez a tulajdonságuk különbözteti meg a keratinázokat más proteázoktól és peptidázoktól.

A legtöbb keratináz erőteljesen indukálható, amelyhez keratinra, mint exogén indukátorra van szükség. A keratináz derepressziója néhány mikroorganizmusban, mint például a *Candida albicans* és a *Chrysosporium keratinophilum* (Kapica és Blank, 1957, 1958) eltérést mutat a *T. gallinae*-nél megfigyelhető konstitutívan expresszáldó keratináztól.

Sok keratináz extracelluláris enzim; a szintézis sejten belül történik és innen exportálódik. Azonban több esetben beszámoltak már sejthez kötött keratin aktivitásról

is mint például a *Trichophyton mentagrophytes* (Yu és mtsai., 1971) és a keratint hatékonyan bontó mikroorganizmus, a *Trichophyton rubrum* (Lamkin és mtsai., 1996) proteinázai esetében.

A mikrobiális keratinolitikus aktivitások és az enzimátikus szubsztrátspecifitások nagy fokú változatossága jól ismert. Például Linn és munkatársai (1992) azt tapasztalták, hogy a *B. licheniformis* keratinja képes volt az összes tesztelt protein szubsztrát hidrolízisére, beleértve a borjúsérum albumint, a kollagént és az elasztint, illetve a toll keratinját is. A fentiekkel megegyezően, Bockle és munkatársai (1995) megfigyelték különböző oldható szubsztrátokból (kazein és zselatin) és a nem-oldható szubsztrátokból (natív és autoklávozott csirketoll) a peptidek felszabadulását. Ezzel szemben Dozie és munkatársai (1994) arról számoltak be, hogy a *C. keratinophyllum* termofil keratinolitikus proteináz csupán a keratint hidrolizálta, de nem mutatott aktivitást a kazein és a BSA esetében. Ez azt mutatja, hogy az izolált enzimek specifitást csak a keratin szubsztrátokon mutattak. Egy másik kísérletben Bockle és munkatársai (1995) azt találták, hogy a keratinbontó *S. pactum* tenyészet szürlete 40°C – 70°C-on fellazítja a teljes csirketollat és ezt sokkal hatékonyabban teszi, mint ahogy a fiziológiai elvárásokból következne. Ugyanakkor a tisztított enzim a szubsztrátnak csak kevesebb, mint a 10 %-át oldotta fel.

A *T. gallinae* esetében egy nagy specifitású, intracellurális keratinolitikus enzimet írtak le (Wawrzkievicz és mtsai., 1987).

2.1.3. A mikrobiális keratinolízis mechanizmusa

A mikrobiális keratinolízis alapvetően egy proteolitikus (protein-lebontó folyamat), mivel a szubsztrát (a keratin) valójában egy protein; pontosabban a súlyának 95%-a protein. Mindamellett, nem hagyható figyelmen kívül a keratinok változatos fizikokémiai tulajdonsága és hatásuk a keratinázokra. A leírt keratinolitikus enzimek (Yu és mtsai., 1969; Ebeling és mtsai., 1974; Nakanishi és Yamamoto, 1974; Takiuchi és mtsai., 1984; Asahi és mtsai., 1985; Wawrzkievicz és mtsai., 1987; Sinha és mtsai., 1991; Malviya és mtsai., 1992; Lin és mtsai., 1992; Morihara és Oda, 1992; Bockle és mtsai., 1995; Santos és mtsai., 1996; Fasasi, 1997) mind proteinázként viselkednek. Azonban, meg kell jegyezni azt is, hogy a keratinolízis és a keratinbontó mikroorganizmusok hatásmechanizmusa még minden részletében nincs pontosan

feltérképezve. A keratinázok hatásmechanizmusának teljes megismerése hiányában is, rengeteg adat szól a következő folyamatok valószínűsége mellett.

A mechanikai keratinolízis

Ez a jelenség csupán a gombáknál és a micéliumot képző keratinbontó mikroorganizmusoknál figyelhető meg. A mechanikai keratinolízis úgy értelmezhető, mint a keratin tartalmú anyagban egyfajta keratinbontás, amely a micéliális nyomás és/vagy behatolás következménye. Malviya (1992) azt figyelte meg, hogy már a szignifikáns extracellurális keratináz aktivitás pontos érzékelése előtt elkezdődött a keratin lebontása és ezt a lebontási folyamatot micéliális növekedés kísérte. Ez vetette fel a mechanikai lebontás lehetőségét. A gomba micéliumok növekedése és megnyúlása az anyagban nyomást generál és a kompakt anyag lebomlását eredményezi, ami egy összetett keratinolitikus mechanizmus meglétére utal (Raubitshek, 1961; Mercer és Verma, 1963; Yu és mtsai., 1968, 1969, 1971; Baxter és Mann, 1969; Kunert és Krajci, 1981; Desmukh és Agrawat, 1982, 1985; Wawrzkievicz és mtsai., 1987).

A gombák növekedése mechanikus nyomást és enzimátikus hidrolízist is produkál. Figueras és munkatársai (1997) legutóbbi tanulmányukban fotomikrográfiával bizonyították a szőr gombák általi invázióját, függetlenül az alapstruktúra dekeratinizációjától. A micélium mechanikai behatolása talán szükséges ahhoz, hogy még több reaktív terület álljon rendelkezésre a peptid kötések enzimátikus hasadásához. Feltételezhető, hogy a mechanikai keratinolízis megelőzi az enzimátikus hidrolízist, annál is inkább, mivel a micélium tulajdonképpen az exoproteázokat állítja elő. Továbbá, a mechanikai és enzimátikus hidrolízis közötti szimultán kölcsönhatás vagy szinergia meglétére lehet következtetni.

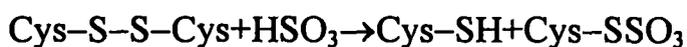
A szulfitolízis

A szulfitolízis jelenségére a tollból készült takarmány jellemzően magas cisztein tartalmából következtethetünk. A toll aminosav összetételében cisztein túlsúly fordul elő, ami hozzájárul ahhoz, hogy stabil biomolekuláris szerkezet jöjjön létre a cisztein diszulfid hídjainak segítségével. Sok érv szól amellett, hogy a diszulfid kötések felbomlásán keresztül valósul meg a keratinbomlás.

A szulfitolízis bizonyítékai

A következő kutatók érdeme a keratinbomlás során lejátszódó szulfitolízis alapos felderítése: Kunert (1972, 1973, 1975, 1976, 1985 a, b, 1989, 1992), Ruffin és munkatársai (1976) és Malviya és munkatársai (1993 a, b). Egy bizonyos konszenzus alakult ki azzal kapcsolatban, hogy a keratin teljes hidrolízise csak a diszulfid hidak hasadásának következtében létrejövő denaturáción keresztül valósulhat meg, és ezek a hidak a proteolitikus lebontással szembeni különleges ellenállóképesség és stabilitás elsődleges okai.

Feltételezik, hogy a dermatofiták és a nem-dermatifiták azért metabolizálják a szabad és kombinált ciszteint, hogy kénhez és nitrogénhez jussanak (Ziegler és mtsai., 1969; Kunert, 1972, 1975, 1988; Malviya és mtsai., 1993a,b; Kunert, 1992). A gombák által a cisztein metabolizmusa során anorganikus ként és más köztitermékeket észleltek. Kunert (1992) arról számolt be, hogy a fölösleges kén oxidált szulfát és szulfid formájában kerül kiválasztásra a tápközegbe. A lúgos pH tartományban semlegesén viselkedik a szulfid a ciszteinnel, hasítva a ciszteint és az S-szulfociszteint az alábbi képlet szerint:



Kunert szerint (1992) ez a reakció a cisztein tartalmú proteinekben játszódik le - beleértve a keratint is - ezért a keratin denaturáció elsődleges lépése a szulfid kiválasztása és a proteázok (keratinázok) ezen a helyen történő támadása - amely a diszulfidkötések szulfitolízisét okozza. Tulajdonképpen Malviya és munkatársai (1992) úgy találták, hogy a keratináz enzim addig nem volt kimutatható a tenyésztési tápközegében, amíg a rendelkezésre álló keratin minimum 50%-a le nem bomlott. Ez közvetve a nem enzimátikus, vagy nem-hidrolitikus keratin lebontását jelezte. A szulfitolízis termékei, mint például a szulfocisztein, tioszulfát, szulfát és a cisztein peptidei jelen voltak a keratinon nevelt tenyészetekben (Kunert, 1972, 1973, 1976; Ruffin és mtsai., 1976; Safranek és Goos, 1982; Malviya és mtsai., 1993 a, b), ezek a diszulfid szétesés további bizonyítékai voltak. A legtöbb kutató azonban (Desmunk és Agrawal, 1982, 1985; Lin és mtsai. 1992) a köztitermékek minimális, vagy semmilyen jelenlétét nem tudták kimutatni a tenyésztési tápközegéből. A köztitermékek alacsony,

vagy ki sem mutatható jelenlétének magyarázata a megfelelő cisztein hasznosítás lehet, amit a gombák kénforrásaként hasznosítanak (Kunert, 1987). Malviya és munkatársai (1993a,b) és Mohammed El-Akied (1987) tanulmányai azt mutatják, hogy a tenyészet folyadékában a maradék cisztein mennyisége folyamatosan csökkent, nyilvánvalóan annak bizonyítékaként, hogy felhasználásra került a gomba metabolizmusában.

További bizonyítékul szolgál az a tény, hogy a szulfitolízist kiváltó, illetve különböző redukáló szereknek, mint például a DTT, DMSO, tioglikolát stb. keratinolízis növelő hatásuk van (Sinha és mtsai., 1991; Takami és mtsai., 1992; Bockle és mtsai., 1995). Kunert (1992) öt redukáló ágens: nátriumszulfit, cisztein, glutation, merkaptóetanol és ditiotreitol *Microsporium gypseum* proteázra (keratináz) gyakorolt hatását hasonlította össze, hogy megerősítse azt az elképzelést, miszerint a keratinolízis során a gomba proteázok elsődleges támadási pontja a szulfit csoport. Az eredmények alapján, a nátriumszulfát kb. 29-szeresére növelte a proteáz aktivitását. A cisztein, merkaptóetanol és a glutation (ebben a sorrendben) fejtett ki egyre kisebb mértékű stimuláló hatást, a legnagyobb hatás 0.3-10 mmol-os koncentráció között volt mérhető. A ditiotreitol volt a legkevésbé hatékony. Kunert megfigyelése szerint a 3.7, 29 és 43-szoros proteolízisbeni növekedés, a cisztein hidak 32%, 66% és 97%-a felhasadása és S-szulfociszteinné alakulása után 24 órán belül lejátszódik. Bockle és munkatársai (1995) kimutatták, hogy a bakteriális proteináz keverék és a tisztított keratináz keratinolitikus aktivitását a DTT hozzáadása fokozza. A szerzők azt is felfedezték, hogy kb. 10%-os lebontás volt elérhető 1% DTT hozzáadása nélkül, míg a hozzáadás után, a keratin 70%-a lebomlott. A korábbiakban Takami és munkatársai (1992) azt tapasztalták, hogy 1 óra alatt pH 12- es értéknél és 70°C-on a tioglikolát katalizálta a szőr teljes oldódását, ellenben a redukáló ágens jelenléte nélkül, a proteináz nem mutatott keratinolitikus aktivitást. DTT hatására megnövekedett keratináz aktivitást írtak le *S. fradiae*-ből származó két szerin proteináz esetében is (Sinha és mtsai., 1991). A *S. pactum* proteináza nem volt aktív a tioglikolát jelenlétében, ellenben aktív volt DTT jelenlétében. Ez arra utal, hogy a diszulfidkötéseket redukáló vegyszerekre különböző a mikrobák enzimeinek válaszreakciója. További indirekt, de ezt megerősítő adat volt, a tripszin és pronáz (mindkettő ún. nem-specifikus proteáz) által, a szulfitolizált természetes gyapjún megfigyelhető bontás (Kunert, 1992). Everett és munkatársai (1962) hasonló eredményekről számoltak be korábban.

A keratinolízis reakcióinak sorozata

A keratin lebontásában a reakciók sorrendjét nehéz pontosan meghatározni. Azonban a gombák és a fonalas antinomicéták esetében a micéliális növekedéssel kezdődik a folyamat, amit azért követ szulfit kiválasztás, hogy feltörje a diszulfidhidakat és végül a folyamat proteolízissel fejeződik be. A kezdeti szakaszon túl azt várhatjuk, hogy a folyamat mindaddig szimultán módon folytatódjék, amíg az organizmus növekszik. Ettől eltérő mechanizmust tételezhetünk fel akkor, amikor baktériumok, vagy tisztított, illetve nyers enzimek vannak jelen. Kunert (1972, 1973, 1975, 1989, 1992) alapos munkájának eredményei azt a hipotetikus utat igazolják, mely a mikroorganizmus jelenlétének fontosságát támasztja alá, míg a keratináz izolációjában és tisztításában mások által elért eredmények látszólag a tisztított enzimek használatakor tapasztalt mechanizmust valószínűsítik. Az is feltehető, hogy az egyszerű hatásmechanizmus nem érvényes az összes keratinbontó mikroorganizmus fajra.

2.1.4. A tollból készült takarmány mikrobiológiai kezelése: biotechnológiai megvalósíthatóság

A legtöbb kutató egyetért abban, hogy a toll mikrobiológiai konverziója azt a célt szolgálja, hogy a tollat állati takarmányként lehessen hasznosítani. A toll biológiai lebontása elérhető 1. a tollon élő keratinbontó mikroorganizmus elszaporításával, 2. megfelelően előállított extracelluláris keratinázok, 3. továbbá keratináz-tartalmú tenyészetek szűrletének felhasználásával.

Elmayergi és Smith (1971) kutatásai úttörő jelentőségűek voltak a táplálkozás-kiegészítés összegzésében, amelyet a toll-takarmány aminosav tartalma és a biomassza között figyeltek meg az *S. fradiae*vel történő fermentáció során. A termék metionin tartalma magasabb volt, mint a nem fermentált toll esetében, habár a fermentált termékben a metionin, a lizin és a triptopán tartalom még mindig alacsony maradt. Elmayergi és Smith (1971) megfigyelte azt is, hogy a fermentáció után, az összes aminosav koncentrációja jelentősen megnőtt. Azonban a baromfikon végzett visszaetelési kísérletek nem mutattak jelentős eltérést a fermentált és nem-fermentált tolltakarmány tápértékei között. Ezt azzal magyarázták, hogy a csirkék nem fogadták el a táplálékot. A kísérlet folytatásában, a metionin megfelelő szintű kiegészítése után, a

broiler csirkék növekedése volt megfigyelhető, aminek mértéke már összemérhető volt az izolált szójababbal etetett egyedeknél tapasztalt eredményekkel.

Barabas és munkatársai (1986 nem publikált anyag) hasonló eredményeket értek el és azt tapasztalták, hogy a mikrobiálisan fermentált tollnak nagyobb volt a lizin, metionin és arginin tartalma, mint a kezeletlen tollnak. A szerzők patkányokon két táplálási kísérletet végeztek és azt figyelték meg, hogy azok a példányok, amelyek toll-hidrolizátumot kaptak, nem veszítettek súlyukból, míg azok igen, amelyeket proteinhiányos táplálékkal etettek. Kutatásaik alátámasztották a toll-hidrolizátumok emészthetőségét és hasznosíthatóságát, habár a tolltakarmánnyal etetett patkányok esetében a metionin részleges hiánya előrevetítette az alacsonyabb, vagy egyáltalán nem tapasztalható súlygyarapodást. Kutatásaik során arra a következtetésre jutottak, hogy proteinforrásként az állati takarmányokban nemcsak a toll-takarmányt (keratin) lehet felhasználni, hanem magát az enzimtermelő törzs(ek) biomasszáját is.

A nyers és a tisztított keratináz enzim hasznosítása

Először Lee (1991) számolt be a nyers keratináz enzimnek (KE) táplálék kiegészítő anyagként történő felhasználásáról. A keratinázt a *B. licheniformis*ből állították elő. Azt tapasztalták, hogy 30-tól 66%-os mértékig a KE hozzáadása megnövelte a nyers toll aminosavainak emészthetőségét, illetve a kereskedelemben lévő tollét 77-99%-os mértékben. A 3 hetes broilerek súlygyarapodása, amelyeket egyenként szójababbal, kereskedelmi tolltakarmánnyal és keratinázzal pótolta táplálékkal etettek: 66g, 50g, illetve 56g volt naponta.

Lin és munkatársai (1996) a *B. licheniformis*ből izolált tisztított keratináz enzim immobilizációját valósították meg, annak érdekében, hogy minimálisra csökkentsék az enzim autolízisét. Az immobilizált keratináz mind a feloldatlan tollkeratinnal, mind pedig az oldódó kazeinnel szemben proteolitikus aktivitást mutatott. Az immobilizált enzimet továbbá magasabb szintű hőstabilitás jellemezte és megnövekedett toleranciát mutatott a savas pH érték felé is, összehasonlítva ezt a szabad keratinázzal, így növelve meg felhasználhatóságának lehetőségeit.

Javasolt lehetőségek a toll biotechnológiai úton történő tápértéknövelésére

Számításba véve azt, hogy a biotechnológia a toll tápértékének jelentős növekedését biztosítja, a tollfeldolgozás mikrobiális-technológiai felhasználásainak lehetőségei a következők:

1. A toll teljes strukturális lebomlásának elérése érdekében: kémiai vagy mikrobiális folyamatok, illetve ezek kombinálásával megvalósított szulfitolízis.
2. Növelni kell a tolltakarmány tápértékét, különösen annak metionin és lizin tartalmát. Talán már egyetlen biotechnológiai módszer, vagy az alábbiak kombinációja is alkalmas lehet:
 - 2.1. Transzpeptidáció vagy aminosavegyesítés, illetve a fő limitáló aminosav, mint például a lizin, kovalens kötése (Dalev és mtsai., 1997),
 - 2.2. Genetikai manipuláció, amelyet a mutagenézissel, protein engineeringel lehet megvalósítani,
 - 2.3. Mivel a legtöbb aktív keratinolitikus mikroorganizmus patogén, így a keratin gént át kell vinni nem patogén mikroorganizmusokba.
3. A mikroba enzim-komplexet olyan konzorcium használatára kidolgozni, amelynek jelentősen magas lesz a keratinolitikus (szulfitolitikus) és peptidolitikus aktivitása. Szintén meg kell fontolni annak lehetőségét, hogy olyan mikrobákat lehet kombinálni, amelyek képesek kiválasztani az esszenciális aminosavakat (metionin és lizin). A mikroba-kooperáció ilyen példáit olyan vegyes kultúrákban lehet megtalálni, amelyeket az állati táplálékban probiotikumokként használnak, továbbá a mikroba-cellulolitikus enzim komplexumban is, ami általános táplálék kiegészítő.
4. A biotechnológiai alkalmazás egyik alapfeltétele a magas hőmérsékleten elért keratináz enzim-stabilitás, valamint a semleges kémhatás közelében mutatott aktivitás szintén előnyös lehet. A keratinolízis jelentősen nagyobb szintje talán a megemelt inkubációs hőmérsékleten keresztül érhető el, továbbá olyan adalékok használatán keresztül, melyeknek redukációs tulajdonságaik vannak. Esetenként beszámoltak néhány divalens fém enzim-stabilizáló hatásáról, amik fokozott enzim aktivitásához vezettek (Dozie és mtsai., 1994; Bockle és mtsai., 1995)
5. További mikroorganizmusok izolálása és jellemzése nagy keratináz termelő képességgel rendelkező, nem-patogén törzsek feltárása céljából és ezek felhasználása az izoláció és enzimmtisztítás igénye nélkül.

6. A dermatofiták patogenezisééről szóló ismeretek integrációja az ipari keratinlebontás ismeretanyagával.

2.2. A mikroba proteázok molekuláris és biotechnológiai sajátosságai

A proteázok az enzimek egy külön csoportját képezik, a fiziológiában betöltött szerepük kiemelkedő jelentőségű. Kereskedelmi szempontból igen fontosak. A proteolitikus enzimek katalizálják más enzimekben a peptid kötések felhasítását, illetve katalizálják a proteinek teljes hidrolízisét. Az analitikai technikák lehetővé tették annak bizonyítását, hogy a proteázok a proteinek nagy specifitású, és szelektív módosításait is elvégzik, pl. enzimek zimogén formáját aktiválják a meghatározott proteolízis során, a véralvadás, és a vérrögök lízisét, valamint a kiválasztott proteinek membránon keresztüli transzportját segítik. Ma a kereskedelmi úton értékesített ipari enzimek becsült értéke évi 1 milliárd \$. Az ipari enzimek 75%-a hidrolitikus jellegű. A proteázok az ipari enzimek legnagyobb csoportját alkotják és körülbelül a 60%-át teszik ki a világ enzimértékesítésének. Jelentős szerepet töltenek be a sejt normális fiziológiájában és az abnormális pathofiziológiai folyamatokban is. A betegséget okozó organizmusok életciklusában betöltött szerepük, továbbá az olyan halálos betegségek, mint az AIDS vagy a rák terápiás ágensének kifejlesztése miatt sokan kutatják ezeket az enzimeket. Az élelmiszer és tisztítószer iparágakban a proteázokat már régóta alkalmazzák. A proteázokat viszonylag a közelmúltban kezdték felhasználni a bőriparban az irha szőrtelenítésére és mosására úgy, hogy most már ezekkel helyettesítik a toxikus vegyi anyagokat, ami nagy biotechnológiai jelentőségű (Rao és Deshpande). A proteázok jelentős változatossága - ellentétben hatásuk speifikus jellegével - világméretű figyelmet irányított rájuk (Fox és mtsai. 1991; Poldermans 1990).

2.2.1. Mikroba proteázok

A mikroba proteázok iránti érdeklődés egyre növekedett a közelmúltban. A széles biokémiai változatosságuk és a genetikai manipulációs lehetőségek miatt remek enzimforrásoknak tekinthetjük a mikroorganizmusokat. A világ teljes enzimfelhasználásának 40%-át adják a mikroba proteázok. (Goldfrey és West 1996). A mikrobiális forrásból nyert proteázokat előnyben részesítik a növényi vagy állati eredetűekkel szemben, mivel biotechnológiai alkalmazásuk szempontjából csaknem valamennyi lényeges adottsággal rendelkeznek.

Baktériumok. A legtöbb, kereskedelemben értékesített proteáz lúgos vagy semleges kémhatásnál aktív, és a *Bacillus* nemzetsébe tartozó fajokból nyerik őket. A baktériumok semleges proteázai egy szűk pH-érték tartományban (pH 5-8) mutatnak aktivitást, illetve viszonylag alacsony a hőtűrésük. Semleges proteázok alkalmazásakor az élelmiszer-fehérjékben a köztitermékek szintje alacsonyabb, ezért kevésbé okoznak keserű ízt, mint az állati proteázok, tehát az élelmiszeripar számára sokkal értékesebbek. A neutráz, egy semleges proteáz, ami nem érzékeny a természetes, növényi eredetű proteináz gátlókkal szemben, ezért nagy jelentőséggel bír a söriparban. A baktériumok semleges proteázait a hidrofób aminosavpárok felé mutatott magas affinitás jellemzi. A semleges proteázok némelyike a metalloproteázokhoz tartozik és aktivitásukhoz divalens fém ionok szükségesek, míg mások olyan szerin proteinázok, amelyeket nem befolyásolnak a kelátképző ágensek.

A bakteriális lúgos proteázokat az jellemzi, hogy nagy aktivitást mutatnak a lúgos pH-értékű környezetben (pl. pH 10) és széles a szubsztrát specifikusságuk. Számukra a 60°C körüli hőmérséklet az optimális. Ezen tulajdonságok alapján használják a bakteriális lúgos proteázokat a mosópor-előállításban.

Gombák. A gombák a baktériumoknál több, különböző típusú enzimet termelnek, például: az *Aspergillus oryzae* elő tud állítani savas, semleges, és lúgos kémhatású enzimeket is. A gomba proteázok szélesebb pH tartományban fejtik ki aktivitásukat (pH 4-11) és széles szubsztrát specifikusságot mutatnak. Ugyanakkor reakciószintjük alacsonyabb és hőtűrésük rosszabb, mint a bakteriális enzimeké. A gomba enzimeket szilárd fázisú fermentálás során lehet előállítani. A gombák savas proteázai pH 4-4,5 tartományban működnek optimálisan és stabilak maradnak pH 2,5-6-

os sávban is. Szűk pH és hőmérsékleti specifikusságuk miatt nagyon hasznosak a sajt készítés során. A gombák lúgos proteázait az élelmiszer proteinek átalakításában is felhasználják.

2.2.2. A proteázok csoportosítása

Az Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology besorolása alapján, a proteázok a hidrolázok 3. csoportjának 4. alcsoportjába tartoznak (International Union of Biochemistry 1992). A proteázok azonban nem illeszkednek könnyen bele az enzim nomenklatúra általános rendszerébe. Napjainkban a következő három fontosabb kritérium alapján definiálják őket: (i) a katalizált reakció típusától függően (ii) a katalitikus terület kémiai természetének függvényében (iii) a struktúráján kimutatható evolúciós rokonság alapján (Baret, 1994).

A proteázokat a hasítási helyüktől függően, általában két nagy csoportra szokták felosztani: az exopeptidázokra és az endopeptidázokra. Az exopeptidázok a peptid kötést közvetlenül a szubsztrát amino vagy karboxi terminális csoportjának közelében hasítják fel, míg az endopeptidázok ettől távol fejtik ki hatásukat. A proteázokat a működésükben résztvevő funkciós csoportjuktól függően négy további csoportra osztják: szerin proteázok, aszpartikus proteázok, cisztein proteázok és metalloproteázok (Hartley, 1960). Csak néhány olyan proteáz létezik, amely nem illeszkedik jól a standard osztályozásba (pl. az ATP-függő proteázok, amelyek működése ATP-t igényel (Menon és Goldberg, 1987). Aminosav sorrendjüktől függően sorolják a proteázokat különböző családokba (Agros és mtsai., 1984). A peptidázok minden egyes csoportját egy-egy nagy betűvel jelölik, amelyek a katalízis típusára utalnak, mint például S, C, A, M, vagy U aszerint, hogy szerin, cisztein, aszpartikus, metallo vagy ismeretlen típusokat jelölnek-e.

Exopeptidázok

Az exopeptidázok csak a polipeptidlánc végéhez közel fejtik ki hatásukat. Attól függően, hogy működési területük az N- vagy a C-terminusnál van-e, amino- vagy karboxipeptidázoknak nevezzük őket.

Amino-peptidázok. Az amino-peptidázok a polipeptidlánc szabad N-terminálisainál hasítanak és egy aminosav maradékot, dipeptidet vagy tripeptidet

szabadítanak fel. Az aminopeptidázok széles körben előfordulnak a gombákban és a baktériumokban egyaránt (Watson 1976). Általánosságban elmondhatjuk azt, hogy az aminopeptidázok intracelluláris enzimek. A baktériumok és a gombák enzimeinek szubsztrát specifitásai nagy különbséget mutatnak, ebből kifolyólag az organizmusok között különbséget lehet tenni a hidrolízis végtermék alaptípusa szerint is (Cerny 1978). Az *Escherichia coliból* származó I aminopeptidáz egy nagy proteáz (400 000 Da). A pH-optimuma széles skálán mozog (7.5-10.5) és Mg^{2+} vagy Mn^{2+} -ra van szüksége az optimális működéshez (De Marco és Dick, 1978). A *Bacillus licheniformis* aminopeptidáz molekula súlya 34 000.

Karboxipeptidázok. A karboxipeptidázok a polipeptid lánc C-terminális részén működnek és egyetlen aminosavat vagy dipeptidet szabadítanak fel. A karboxipeptidázokat az enzim aktív részén lévő aminosav oldalláncok természetétől függően három fő csoportra oszthatjuk, a szerin karboxipeptidázokra, a metallokarboxipeptidázokra és a cisztein karboxipeptidázokra.

Endopeptidázok

Az endopeptidázokat a peptid kötéseken megfigyelhető hatásuk alapján különböztethetjük meg. Ezek a kötések az N- és C-terminálistól viszonyítva a polipeptid lánc belső részein találhatóak. A szabad amino vagy karboxi csoportok jelenléte negatívan hat az enzim működésére. Az endopeptidázokat katalitikus mechanizmusuk alapján négy különböző alcsoportra oszthatjuk: (i) szerin proteázok, (ii) aszpartikus proteázok, (iii) cisztein proteázok és (iv) metalloproteázok. Annak érdekében, hogy gyors és egyértelmű hivatkozást lehessen tenni az egyes peptidáz csoportokra, Rawlings és Barrett egy kódrendszert vezetett be, ami olyan betűkből áll, amelyek a katalitikus típusra utalnak pl. S, C, A, M vagy U és ezeket egy tetszőleges szám követ (Rawlings és Barrett, 1993).

Szerin proteázok: A szerin proteázokat az aktív centrumukban lévő szerin csoport jellemzi. Nagy számban vannak jelen és igen elterjedtek a vírusok, a baktériumok és az eukarióták között, ami arra utal, hogy valószínűleg nélkülözhetetlenek az organizmusok számára. A szerin proteázok megtalálhatók az exo-, az endo-, az oligo- és az omega-peptidáz csoportokban. Strukturális hasonlóságai alapján, a szerin proteázokat 20 csoportba osztották, amelyek a közös származás alapján, további 6 alcsoportra lettek felosztva (Barrett, 1994). A fenti négy csoport tagjainak elsődleges szerkezete, (a kimotripszin (SA), a szubtilizin (SB), a

karboxipeptidáz C (SC), és az *Escherichia* D-Ala-D-Ala peptidáz A (SE) egyáltalán nem hasonlít egymásra, ami arra utal, hogy szerin proteázok legalább négy különböző evolúciós eredettel rendelkeznek. Az SA, SB, és SC csoportok azonos működési mechanizmussal bírnak, amely a három aminosav, a szerin (nukleofil), az aszpartát (elektrofil), és hisztidin (bázis) katalitikus hármásának elemeiből épül fel. Az SE és az SF (repressor LexA) csoportok katalitikus mechanizmusa élesen különbözik attól, amit az SA, SB és az SE csoportokénál tapasztalhatunk, mivel hiányzik belőlük a klasszikus Ser-His-Asp hármás. A szerin proteázok további jellegzetes sajátossága, hogy konzerválják a glicin maradékokat a katalitikus szerin csoportok közelében, így hozva létre a Gli-Xaa-Ser-Yaa-Gli alakzatot (Brenner, 1988).

A szerin proteázokat arról lehet felismerni, hogy 3,4-diklór-izokumarin (3,4-DCI), L-3-karboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidin) bután (E.64), diizopropilfluorofoszfát (DFP), fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF) és a tozil-L-lizin klorometil keton (TLCK) irreverzibilisen gátolják őket.

Néhány szerin proteázt gátolnak a tiol reagensek, mint amilyen a *p*-kloromerkuribenzoát (PCMB) mivel az aktív területhez közel vannak a cisztein oldalláncok. A szerin proteázok rendszerint a semleges és a lúgos kémhatás esetén aktívak és a pH optimumuk 7-11 értékek között van. Szubsztrát specifitásuk széles, melybe beletartozik az eszterolítikus és az amidáz aktivitás is. Molekulasúlyuk 18 és 35 kDa között váltakozik (Govind és mtsai., 1981). Izoelektromos pontjuk általában pH 4 és 6 között van. Azok az alkalikus szerin proteázok, amelyek erősen lúgos pH érték közelében aktívak, a legnagyobb szerin-proteáz alcsoportot alkotják.

(i) Az alkalikus szerin proteázok. Az alkalikus szerin proteázokat számos baktérium és gombafaj képes termelni. Gátolja őket a DFP és a burgonya proteáz inhibitor, míg a tozil-L-fenilalanin klorometil keton (TPCK) vagy a TLCK nem. Szubsztrát specifitásuk hasonló, de kevésbé specifikus, mint ami a kimotripszineknel megfigyelhető. A hasítás helyén tirozint, fenilalanit vagy leucint tartalmazó peptid kötést hidrolizálják. Az alkalikus proteázok optimális pH értéke pH 10-nél található, és az ioelektromos pontjuk pH 9. Molekulasúlyuk 15 és 30 kDa között van.

(ii) Szubtilizinek. A *Bacillus* eredetű szubtilizinek a szerin proteázok második legnagyobb csoportját alkotják. Két különböző típusú lúgos proteázt különböztettek meg; az egyik a Carlsberg szubtilizin a másik a Novo vagy másképpen Nagase bakteriális proteáz (BPN'). A *Bacillus licheniformis* termeli a Carlsberg szubtilizint, amit 1947-ben fedezett fel Linderstrom és munkatársai a Carlsberg laboratóriumban. A

szubtilizin Novot vagy másképpen a BNP-t a *Bacillus amiloliquefciens* termeli. A Carlsberg szubtilizint széles körében alkalmazzák a mosóporgyártásban. Ebből az enzimből évente körülbelül 500 tonna tiszta enzim proteint állítanak elő a világon. A BNP szubtilizin kereskedelmi jelentősége sokkal kisebb. Mindkét szubtilizin molekulásúlya 27,5 kDa, de 58 aminosavban eltérnek egymástól. A gombából származó (*Conidiobolus coronatus*) alkalikus szerin proteáz funkcionális hasonlósága ellenére a *Carlsberg* szubtilizínétől eltérő szerkezettel rendelkezik.

Az aszpartikus proteázok Az aszpartikus proteázok, amelyeket egyszerűbben csak savas proteázoknak neveznek, olyan endopeptidázok, amelyeknek aszparaginsav maradványokra van szükségük ahhoz, hogy katalitikus aktivitásukat kifejtsék. A savas peptidázokat három nagyobb csoportba sorolják, amelyek a következők: pepszin (A1), retropepszin (A2) és a pararetrovírusokból származó enzimek (A3) (Barett, 1995). A legtöbb aszpartikus proteáz maximális aktivitását alacsony pH értéknél fejt ki (pH 3-4-ig) és izoelektromos pontjuk pH 3-4,5 között van. Molekulásúlyuk 30-45 kDa között változik. Az aktívcentrum aszparaginsav csoportja az Ap-Xaa-Gly motívumokban található, ahol az Xaa lehet Ser vagy Thr is. Az aszpartikus proteázokat gátolják a pepszinek (Fitzgerald, 1990). Szintén érzékenyek a diazoketon vegyületre is, mint pl. a diazoketil-DL-norleucin metilészter (DAN) és az 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi) propánra (EPNP) réz ionok jelenlétében. A mikrobiális savas proteázok specifitást mutatnak az aromás vagy nagy aminosav csoportra a peptid kötés mindkét oldalán. A mikrobiális aszpartikus proteázok nagyjából két csoportba sorolhatók: (i) az *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* és *Nerospora* által termelt pepszinhez hasonló enzimek és (ii) az *Endothia* és *Mucor* spp. által termelt rennin-típusú enzimek.

Cisztein/tiol proteázok. A cisztein proteázok mind a prokariótáknál, mind az eukariótáknál előfordulnak. A cisztein proteázoknak eddig körülbelül 20 családját azonosították. Minden cisztein proteáz működése a katalitikus diádtól függ, amit cisztein és a hisztidin alkot. A család tagjai az oldallánc Cys és His sorrendjében (Cys-His vagy His-Cys) különböznek egymástól (Barett, 1994). Általánosságban elmondhatjuk, hogy a cisztein proteázok csak a redukáló ágensek, mint a HCN vagy a cisztein jelenlétében aktívak. Az oldallánc specifitásának alapján négy csoportra osztják őket: (i) papain-típusú, (ii) tripszinhez hasonlóak, arginin csoportot hasítanak le (iii) glutaminsav specifikusak és (iv) egyébek. A papain a legismertebb cisztein proteáz. A cisztein proteázok pH optimuma semleges, habár közülük néhány, mint pl. a lizozómális proteázok maximális aktivitásukat savas pH értéknél fejtik ki. Érzékenyek

a szulfhidril ágensekre, mint amilyen a PCMB, de a DFP és a fém-kelátképzők nincsenek hatással rájuk.

Metalloproteázok. A metalloproteázok a legösszetettebb katalitikus proteázok (Barett, 1995). A divalens fémion jelenlétének szükségessége jellemzi működésüket. Nagyon különböző eredetű enzimeket tartalmaznak, mint amilyenek a magasabb rendű organizmusokból származó kollagenázok, kígyóméregből nyert hemorrhagikus toxinok és a baktériumoknál található termolizinek (Hibbs és mtsai., 1985; Okada és mtsai., 1986; Shannon és mtsai., 1989; Weaver és mtsai., 1977; Wilhelm és mtsai., 1987). A metalloproteázok közel 30 családját írták le, amelyekből 17 csak endopeptidázokat tartalmaz, 12 csupán exopeptidázokat és 1 (M3) tartalmaz mind endo-, mind exopeptidázokat.

A működési sajátosságaik alapján, a metalloproteázokat négy különböző csoportba lehet sorolni: (i) semleges (ii) lúgos (iii) *Myxobacter* I, és (iv) *Myxobacter* II csoportokba. A semleges proteázok a hidrofób aminosavakra reagálnak, míg a lúgos proteázok nagyon széles körű specifitással rendelkeznek. A *Myxobacter* proteáz I. a hasítandó kötés mindkét oldalán a kicsi aminosav csoportokra specifikus, míg a proteáz II. a peptid kötés amino oldalán a lizin csoportokra érzékeny. Gátolják őket a kelátképző ágensek, mint amilyen az EDTA, de nem gátolja a DFP vagy szulfidril ágens.

2.2.3. A proteázok működési mechanizmusa

A proteázok működési mechanizmusa számos kutató érdeklődésének középpontjában áll. A proteázok teljes kitisztítása alapfeltétele annak, hogy tanulmányozni lehessen működési mechanizmusukat. A szakirodalomból számos jól kidolgozott proteáz tisztítási eljárás ismert: affinitás kromatográfia, ioncserés kromatográfia illetve gélszűrési eljárások.

A proteázok katalitikus részét, egy vagy mindkét oldalról specifikus alegységek határolják, amelyek közül bármelyik képes arra, hogy magához vonzza a szubsztrátból az egyes aminosav csoportok láncait. Ezeket az S1 katalitikus területtől kezdődően számozzák, ami folytatódik az Sn-en át a struktúra N terminálisig és S1-től Sn-en át a C terminálisig.

A **szerin proteázok** rendszerint, két lépcsőből álló hidrolízist katalizálnak, amelyben peptid rész vagy aminosav vesztéssel, egy kovalens kötésű enzim-peptid

intermedier jön létre (Fastrez és Fershz, 1973). Ezt az acilációs lépcsőt egy deacilációs folyamat követ, amit a víz által az intermedieren kiváltott nukleofil támadás folytat. A reakció végére megvalósul a peptid hidrolízise. A szerin endopeptidázok három fő csoportját különíthetjük el az elsődleges szubsztrát alapján: (i) tripszin típusú, amely felhasad a pozitív töltésű csoport után, (ii) kimotripszin-típusú, amely a nagy hidrofób csoport hatására hasad fel, (iii) elasztáz típusú, amely a kisméretű hidrofób csoport hatására hasad.

Az aszpartikus endopeptidázok katalitikus működésükhöz nem nélkülözhetik az aszparagin sav maradványokat. A kutatók az általános katalitikus mechanizmusokat javasolták az olyan aszpartikus proteinek hidrolíziséhez, mint amilyen a penicillopepszin (James, 1977) és az endothiapepszin (Gearl, 1987). A krisztallografiás kutatások bebizonyították azt, hogy a pepszin család enzimei két alegységből álló molekulák (Blundell és mtsai., 1991; Sielecki és mtsai., 1991). Az alegységek homológok egymással, mivel gén-duplikációval keletkeztek. A retropepszin molekula csupán egy alegységgel rendelkezik, amiben csak egy aszpartikus csoport található, illetve a működés alapfeltételei a nem-kovalens „homodimer”-ek.

A **metalloproteázok** működési mechanizmusa némileg eltér a fent leírt proteázok működésétől. Ezek az enzimek a kötött divalens kationok jelenlététől függenek, és dialízis vagy kelátképző ágens hatására inaktiválódnak. A legtöbb metalloproteáz olyan enzim, amely His-Glu-Xaa-His (HEXXH) motívumot tartalmaz, amely a röntgensugaras krisztallográfia szerint a fémion (rendszerint cink) számára alakítja ki a megfelelő helyet.

A **cisztein proteázok** a karboxilsav származékok hidrolízisét katalizálják. A cisztein proteázok működési mechanizmusa ezért nagyon hasonlít a szerin proteázokéhoz.

A különböző evolúciós eredetű peptidázok működési mechanizmusában is jelentős hasonlóság fedezhető fel. A papain nevű növényi peptidáz a cisztein peptidázok ősi típusának tekinthető és ezért az enzimek ezen családját reprezentatíven modellezi. Katalizálják a peptid, amidészter, tiol észter és thion kötéseket (Polgar, 1990).

A papain kristálystuktúrája megerősíti a Cys25-His 159 párosítást (Baker és Drenth, 1987). A szerin proteázokban megtalálható Ser-His-Asp elrendeződés analógiát mutat a cisztein peptidázokban található Cys-His-Asn triáddal, amelyet a katalitikus hisztidin (His 159) közelében a konzervált aszparagin csoportok jelenléte okoz (Asn 175). A cisztein proteázok egy olyan hidrolitikus mechanizmust adoptálnak, amely

olyan általános savalap létrejöttét jelenti, amit az acil-tiol köztitermék hidrolízise követ.

2.2.4 A proteázok fiziológiai szerepe

A protein forgalom (turnover)

Minden élő sejt fentart egy bizonyos protein forgalmat, amit egy folyamatos, de kiegyensúlyozott proteinszintézissel, illetve lebontással valósít meg. A proteinek katabolizmusa biztosítja a proteinszintézishez a szükséges aminosav készletet. Az intracelluláris proteázok fontos szerepet játszanak a sejtek fehérje háztartásában. Az *E. coliban*, az abnormális proteinek hidrolíziséért az ATP-függő La proteáz (a *lon* gén terméke) a felelős (Chung és Goldberg, 1981). Az eukariótákban az intracelluláris proteinek forgalma az ATP -függő proteázokat tartalmazó útvonal által is szabályozva van (Hershko és mtsai., 1984).

Az enzimek proteolitikus modifikációja, ismereteink szerint, egy megváltozott fiziológiai funkciójú protein létrejöttét eredményezi: pl. a leucil-L-RNS szintetáza az *E. coliban*, egy olyan enzimé konvertálódik, amely a leucin-függő pirofoszfát cseréjét katalizálja azzal, hogy az eredeti enzimből elmozdít egy kicsiny peptidet.

A polipeptidek kisebb peptidekké és aminosavakká történő hidrolízisével a proteázok lehetővé teszik azok sejtek általi felvételét. Ezek az extracelluláris enzimek depolimerizáló működésüknek köszönhetően, meghatározó szerepet játszanak a táplálkozásban. A mikrobiális és az emlős-extracelluláris enzimek (mint amilyeneket a pankréász választ ki), elsődleges szerepet játszanak tehát a sejt életbenmaradásában azzal, hogy a polipeptidekből felszabadítják a szükséges aminosavakat.

2.2.5. A proteázok alkalmazása

A proteázokat nagyon sok területen alkalmazzák, mégis az élelmiszer- és a tisztítószeripar a legjelentősebb felhasználó. A környezetbarát technológiák elterjedésével a proteázokat jelentősebb mértékben használják a bőr kikészítésben illetve különböző bioremediációs folyamatokban. Az egyes alkalmazási területek igényeihez igazított enzimek iránt világméretű igény mutatkozik. A proteázokat a gyógyszergyártásban széleskörűen használják gyógyszerek előállítására. Az élelmiszer

és mosópor előállításra készített proteázokat nagy mennyiségben állítják elő és további feldolgozás nélkül használják, míg a gyógyszeripar számára csak kisebb tömegű anyagot készítenek, ezek viszont felhasználásuk előtt költséges tisztítást igényelnek.

Mosóporok

A proteázok különböző tisztítószer alapanyagai. A világon az összes iparban felhasznált enzim 25%-át a mosóporiparban felhasznált enzimek teszik ki. 1913-ban készítették el „BURNUS” nevű, első enzimátikus mosóport, ami nátrium-karbonátot és nyers pankreatikus kivonatot tartalmazott. 1956-ban került a piacra az a mosópor, amely bakteriális enzimet tartalmazott, neve BIO-40 volt. Az ideális mosószer-proteáznak a legkülönbözőbb foltok eltávolítását kell elérnie, amihez széleskörű szubsztrát-specifikussággal kell rendelkeznie. A mosószer proteázainál fontos, hogy magas hőmérsékleti és pH tartományban működőképesek maradjanak és hogy kompatibilisek legyenek más, a mosószerhez adott kelátképző és oxidáló ágensekkel. A mosószerknél a proteázok optimális teljesítményének kulcsparamétere a pI. Az a proteáz a legalkalmasabb erre a felhasználási területre, amely pI-értéke megegyezik a mosószer oldat pH-értékével.

A piacon jelenleg használt mosószer-proteázokat, *Bacillus* fajokkal állítják elő.

A bőripar

A bőr előkészítése néhány olyan lépést jelent, mint amilyenek az áztatás, a cserzés a mosás és a szőrtelenítés. A bőr és szőrme proteinből épül fel. A bőrkikészítés hagyományosan olyan veszélyes kemikáliák használatával történik, mint amilyenek a nátrium-szulfid, ami környezetszennyező, ezért gondot jelent a szennyvizének az elvezetése is. Az enzimek alternatív használata a szennyezés csökkentésében, és a bőr minőségének javításában nagyon sikeresnek bizonyult. A proteázokat a bőr nem-kollagén tartalmú alkotóelemeinek szelektív hidrolízisére és nem fibrilláris proteinek, mint az albumin és a globulin eltávolítására használják.

Az élelmiszeripar

Az élelmiszerek előállításában már az ókorban is használtak proteázokat. Különböző területeken rutinszerűen alkalmazták őket (pl. sajt készítés, sütés, szója-hidrolizátum előkészítés, húspuhítás).

Tejipar: A proteázokat elsődlegesen a sajtiparban használják fel. A tejelvádat előidéző enzimeket három csoportba sorolhatjuk: (i) állati tejoltó anyagok, (ii) mikrobiális tejoltók, (iii) genetikusan előállított kimozin. Mind az állati, mind a mikrobiális tejoltó proteázok az aszpartát proteázok osztályába tartoznak és 30 000 - 40 000 közé esik molekulásúlyuk. A mikrobiális enzimek két jelentős területen mutatnak hiányosságokat: (i) a nagy számban vannak jelen a nem pecifikus és hőstabil proteázok, ami a tárolás után a sajtban keserű ízt eredményez és (ii) az alacsony terméshozam területén. Ezen a területen végzett költséges kutatásoknak köszönhetően, olyan enzimeket állítottak elő, amelyek inaktíválódnak a normál pasztörözési hőmérsékleten, és nagyon alacsony mennyiségű nem-specifikus proteázt tartalmaznak.

A protein hidrolizátumok keserű ízének megszüntetése: A protein-hidrolizátumokat számos területen alkalmazzák, mint például a dieteikus és egészséges táplálkozást segítő termékek alkotóelemeiként, csecsemő és klinikai táplálást szolgáló kiegészítők, illetve ízfokozó anyagokként. Egyes proteinek bomlástermékének keserű íze jelenti az élelmiszeriparban történő felhasználás legnagyobb akadályát. A hidrolizátumban található hidrofób aminosavak száma arányos a keserű íz intenzitásával. A peptid centrumában található prolin csoport jelenléte szintén befolyásolja a keserű ízt. A hidrofób aminosavakat és a prolint összekapcsoló peptidázok nagyon értékesek a keserűség csökkentése szempontjából a hidrolizátumokban. A karboxipeptidáz nagy specifikusságot mutat a hidrofób aminosavak iránt, ezért igen fontos a keserű íz megszüntetése szempontjából,

A szintetikus aszpartám. Az Food and Drug Administration (USA) hozzájárult az aszpartám, - mint kalóriamentes édesítőszernek a - használatához. Az aszpartám egy olyan dipeptid, amelyet az L-aszparaginsav és az L-fenilalanin metilésztere alkot. Az aszpartám édes ízéért a két aminosav L-konfigurációja felelős. A sztereospecifitás fenntartása döntő jelentőségű, de hozzájárul a kémiai előállítás költségeihez is. Ezért fontos az aszpartám enzimatisztikus szintézise.

Gyógyszeripar: Baktériumok vonatkozásában a gyógyszeriparban az *E. coliból* izolált aszparaginázt használják fel arra, hogy a különböző típusú limfocitikus leukémia esetében eltávolítsa a véráramból az aszparaginázt.

2.2.6. A mikrobiális proteázok molekuláris biológiai vizsgálata

A génklónozási technika jelentős mértékben hozzájárult a genetikai rendszerek struktúra-funkció kapcsolatairól rendelkezésre álló ismereteink elmélyítéséhez. Manapság az iparban használt enzimek 50%-a már genetikailag módosított mikroorganizmusok segítségével kerül előállításra (Hodson, 1994).

A mikrobiális proteázokat és a kódoló géneket számos szempontból tanulmányozták így például (i) a génadagolási effektus (gene dosage effect) által előidézett enzim túltermelést, (ii) tanulmányozták a proteinek elsődleges struktúráját, illetve (iii) olyan proteázok előállítását, amelyek a kereskedelmi felhasználás érdekében megváltoztatott tulajdonságúak. Baktériumokból, gombákból és vírusokból egyaránt klónoztak és szekvenáltak már proteáz géneket.

Baktériumok

A baktériális proteáz gének klónozásának gyakorlati célja elsősorban az, hogy az élelmiszer, mosószer és gyógyszeripar számára fontos enzimek nagy mennyiségű előállítását biztosítsa. Néhány baktérium virulens jellege bizonyos extracelluláris proteázok kiválasztásával áll összefüggésben. Ezekben azért volt lényeges a proteáz gén klónozása, hogy megérthessék patogénitásuk alapjait és ezáltal elősegítsék az ellenük való védekezést. A sejt fiziológiában a proteázok szerepe igen jelentős; a gének klónozása itt azért történt meg, hogy ezzel jobban megérthessék a proteázok regulációban betöltött szerepét.

Bacillus fajok proteázai: A legtöbb *Bacillus* faj legalább két fontosabb proteázt kiválaszt: a szubtilizint (egy lúgos proteázt) és a metalloproteázt (egy semleges proteázt). Mindkettő fontos az ipar számára. A *B. subtilis* 168 törzs az exponenciális fázis végső szakaszában legalább hat különféle extracelluláris proteázt választ ki a tápközegbe. Ezek strukturális génjeit, beleértve a lúgos proteázt (*apr*) vagy szubtilizint (Stahl és Ferrari, 1984), a semleges proteáz A és B-t (*npr A* és *nprB*) (Henne és mtsai., 1985; Tran és Wong, 1991; Yang és mtsai, 1991), a minor extracelluláris proteázt (*ep*) (Brueckner és mtsai., 1990; Sloma és mtsai., 1988), az F bacillopeptidázt (*bpr*) (Sloma és mtsai., 1990) és a metalloproteázt (*mpr*) már kódolták és jellemezték. Ezek a proteázok ún. „prepro” enzim formájában szintetizálódnak. A Ser, His, és Asp, aminosavakkal jellemzett, nagymértékben konzervált közös szekvenciák ismerete azt

jelzi, hogy mind az intra-, mind az extracelluláris szerin proteáz géneknek közös az ősiük.

Yamagata és munkatársai 1995-ben a *B. subtilis* (Natto) 16 (319)-ből egy 90-kDa-os szerin proteázt kódoló gént (*hspK*) klónoztak és szekvenáltak. Az enzim hatalmas mérete a bakteriális szerin proteáz ősi formáját mutathatja.

A nagyon lúgos pH optimummal rendelkező proteázokat általánosan felhasználják a mosóporokban és előnyben részesítik őket a szubtilizinekkal szemben (optimális a pH 8,5-10,0 között az aktív enzim számára). Ezekről az enzimekről rendelkezésünkre álló ismeretek nagyon hasznosak az új szubtilizinek előállításában is. Kaneko és munkatársai klónozták és szekvenálták az *ale* gént. A klónozott gént felhasználták a proteáz termelés növelésére.

Az ISP-1-et kódoló gént a lúgos proteázt termelő *Bacillus* NKS-21 törzséből klónozták meg (Yamagata és Ichishima, 1995). A nukleotid szekvencia 50%-os homológiát mutat a *B. subtilis*, *B. polymyxa* és a lúgos *Bacillus* 221 törzséből ISP-1-et kódoló génekkel.

Egyéb baktérium proteázok: A *Lactococcus* baktériumoknak (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* és *cremoris*, előzőleg *Streptococcus lactis*, illetve *Streptococcus cremoris*) összetett proteolitikus rendszerük van, amely lehetővé teszi a bakteriális növekedést a tejben. Ezek a kazeint kis peptidekre és szabad aminosavakra bontják. A folyamat eredményeként különböző szerkezetű és ízű tejtermékek jönnek létre. A sejtfalban lévő proteolitikus rendszer fontos szerepet játszik a tejtermék minőségében, ezért egyre több kutatás irányul ezen enzimek és gének megismerésére. A kazeinolízis módszer alapján két *Lactococcus* proteáz csoport létezik: a PI-típusú proteáz, ami főleg β -kazeint bont, és a PIII-típusú proteáz, ami α S1-, β -, és κ -kazeint bont (Visser és mtsai., 1986). A legtöbb genetikai kutatás eddig a PI-típusú proteáz génjeivel foglalkozott. Ezen proteáz gének többnyire plazmidokon találhatóak, de jelentős a különbség a bakteriális törzsekben a méret és a szerveződés tekintetében (De Vos, 1987).

A PIII-típusú proteázt csak *L. lactis* spp. *cremoris* AM1 és SK11 törzsekben írták le és egy 78-kbp psk111 plazmid kódolja. A proteáznak az N-terminál régiója jelentős szekvencia homológiát mutat a szubtilizin családból származó szerin proteázokkal (szubtilázokkal).

A *Lactococcus prtP* proteáz gén, amely egy sejtfal-kötött szerin proteázt kódol, és a *prtM*, amit a *prtP* gén terméke aktivál, nélkülözhetetlen a tejipar számára.

A *L. lactis* spp. *cremoris* BC101 (egy plazmid nélküli törzs), sejtfalhoz kötött proteázt termel, amely nagyon hasonlít, a plazmid-kódolt *prtP* génhez a Wg2 és SK11 törzsekben. Pulzálatott gélelektroforézissel kimutatták, hogy a plazmid nélküli törzsben a *prtP* és *prtM* gén a kromoszomális DNS-ben található. Gilbert és munkatársai klónozták és szekvenálták a *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*ból származó kromoszomális *prtB* gént, amely egy 212 kDa proteázt kódol (Gilbert és mtsai., 1996). Az aminosav szekvencia jelentős homológiát mutat a lactococcalis *prtP* sejtfal-kötött proteázokkal.

A kereskedelmi méretékű pronáz előállításban használt *Streptomyces griseus* két extracelluláris szerin proteázt választ ki: a proteáz A-t és B-t. Az aminosav szekvencia alapján az enzimek 61%-ban homológok. A proteáz A-t (*sprA*) és proteáz B-t (*sprB*) kódoló géneket a *S. griseus* genomiális könyvtárából izolálták és *S. lividans*ban expresszáltatták. (Henderson és mtsai., 1987). A DNS szekvencia arra enged következtetni, hogy mindegyik proteáz először prekurzorként választódik ki.

A *S. fradiae* ATCC 14544 törzs egy újfajta savas aminosav specifikus szerin proteázt (SFase) választ ki a tápközegbe. Az aminosav szekvencia 187 aminosavat tartalmaz (Kitadokora és mtsai., 1993) és 82%-ban homológ a *S. griseus* savas aminosav specifikus proteázával (Svendsen és mtsai., 1991).

Az *Enterobacteriaceae* családhoz tartozó Gram-negatív baktériumokról tudjuk, hogy nagy mennyiségben választanak ki extracelluláris proteázt a tápközegbe. *Serratia* E-15 törzs egy hatásos extracelluláris fémtartalmú proteázt termel, melyet gyulladásgátló termékként használnak. A proteázt kódoló gén *E. coliban* és *S. marcescens*ben expresszálódott (Nakahama és mtsai., 1986).

A *Pseudomonas aeruginosa* egy opportunistá patogén. Ez a sajátossága számos extracelluláris fehérje kiválasztásával áll összefüggésben (Liu, 1974). A *P. aeruginosa* két proteázt választ ki: egy lúgos proteázt és egy elasztázt. A lúgos proteáz génjeit (*apr*) *P. aeruginosa* törzsekből *E. coliba* expresszáltatták (Atsumi és mtsai., 1989; Guzzo és mtsai., 1990; Shibano és mtsai., 1991), ahol aktív enzim szintetizálódott és választódott ki a tápközegbe.

Az *Aeromonas hydrophila* és rokon *Aeromonas* fajok opportunistá patogének emberekben és halakban. Lehetséges, hogy több extracelluláris enzim is szerepet játszik a mikroba patogenitásában. Két különböző extracelluláris proteáz, egy hőstabil fémtartalmú proteáz és egy hő-instabil szerin proteáz található az *A. hydrophilaban* és más *Aeromonas*okban (Leng és mtsai., 1988). Az *A. hydrophila* extracelluláris proteáz

szerkezeti génjeit expresszáltatták *E. coliban* (Rivero és mtsai., 1990). A hőstabil proteázt az *E. coli* a periplazmájába választja ki, ahol azonos tulajdonságokat mutatott az *A. hydrophila* SO2/2 proteázával, amit a fermentléből tisztítottak.

Egy Zn^{2+} tartalmú proteáz gént klónoztak és szekvenáltak *V. anguillarumból* (Milton és mtsai., 1992), *V. parahaemolyticusból* (Lee és mtsai., 1995) és *V. vulnificusból* (Cheng és mtsai., 1996), hogy megismerjék a proteáz szerepét a *Vibrio* patogenezisben. Azonosították a konzervált Zn^{2+} -kötő régiókat. *V. cholerae* extracelluláris hemagglutinin proteáz szerkezeti génjének (*hap*) szekvencia analízise rávilágított arra, hogy az enzim nagy prekuzorként termelődik. Az aktív enzim aminosav szekvenciája 61.5%-os hasonlóságot mutat a *P. aeruginosa* elasztázával.

E. coli esetében megkülönböztetünk membrán és ATP-függő proteázokat:

(i) Membrán proteázok. A baktériumokban bármilyen fehérje, amit a sejt a citoplazmikus membránon át kiválaszt, prekursor formájában termelődik, melyen egy szignál peptid található N-terminálisan (Blobel és Dobberstein, 1975). A prekursor feldolgozása két lépésből áll: (i) a szignál peptid eltávolítása a prekuzorból és (ii) a levágott szignál peptid emésztése.

(ii) ATP-függő proteázok. Az ATP-függő proteolízis fontos szerepet játszik mind a rendellenes fehérjék, mind a szabályozó fehérjék lebontásában a prokarióta és az eukarióta sejtekben egyaránt. Három ATP-függő proteáz család létezik az *E. coliban*: La (vagy Lon), Clp (vagy Ti), és FtsH (vagy HflB) proteázok. Lon és Clp oldható fehérje, míg FtsH membrán-kötött fehérje.

Az ATP-függő proteolízis *in vitro* kísérletei kimutatták, hogy a fő ATP-függő aktivitást az *E. coli* sejt kivonatokban a Lon proteáz okozza (Goldberg és mtsai., 1983). Az *E. coli* K-12 *lon* génjét klónozták (Zchnbauer és Markovitz, 1980) és szekvenálták (Americ és mtsai., 1988; Chin és mtsai., 1988).

A Gram-negatív talajbaktérium, a *Lysobacter enzymogenes* extracelluláris enzime, egy α -lítikus proteáz különösen figyelemre méltó. Az α -lítikus proteáz génjének nukleotid szekvencia analízise és az S1 térképezése kimutatta, hogy itt is egy prepro-fehérjéből (41 kDa) alakul ki az érett extracelluláris enzim (20 kDa) (Silen és mtsai., 1988).

Az *Achromobacter* I proteáza (API) specifikusan hidrolizálja a lizil peptid kötést. Az *Achromobacter lyticus* API nukleotid szekvencia analízise kimutatta, hogy a gén egy 653 aminosavból álló polipeptidet kódol (Ohara és mtsai., 1989). Az API gént tartalmazó rekombináns plazmiddal *E. coli* túltermelte és kiválasztotta a fehérjét a

periplazmába. Az *A. lyticus* β -lítikus proteázának szerkezeti génjét is klónozták, és a gén szekvencia analízise kimutatta, hogy egy 179 aminosból álló enzimet kódol.

Kísérletek igazolták, hogy a *Staphylococcus aureus* V8 szerin proteáz génje egy olyan proteázt kódol, amely specifikusan vágja a savas oldalláncokat a karbonil oldalról.

A *Thermus aquaticus* egy lúgos szerin proteázt (aquilizin I) választ ki a tápoldatba. DNS szekvenciája nagy homológiát mutatott a szubtilizin-típusú szerin proteázokkal, főleg a szubtilizin BPN' aktív centrum régiójával (Asp32, His64, és Ser 221) (Kwon és mtsai., 1988). A nukleotid szekvencia megmutatta, hogy ez az enzim is egy nagy prekuzorként termelődik.

Thermomonospora fusca fő extracelluláris proteázának génjét (*tfgA*) izolálták, szekvenálták és expreszáltatták *Streptomyces lividans*ban (Lao és Wilson, 1996). A nyitott leolvasási keret egy 375 aminosavas részt kódolt.

Az *Alteromonas* tengeri baktérium, lúgos szerin proteázokat, vagy szubtilázokat (AprI és AprII) választ ki a tápoldatba. Mindkét enzim aminosav szekvenciája igazolta, hogy nagy, négy doménes prekuzorként termelődnek. Az érett AprI aminosav szekvenciája nagy homológiát mutat a szubtilázok első csoportjával, míg az AprII aminosav szekvenciája nagy homológiát mutat a szubtilázok második csoportjával. A C-terminális pro-régió nagy homológiát mutat más ismert Gram-negatív baktériumok proteázának C-terminális pro-régiójával (*V. anguolyticum*, *Xanthomonas campestris*, és *V. proteolyticus*).

IgA proteáz család. Az A1 Immunoglobulin (IgA1) proteázai egy nagyon heterogén extracelluláris endopeptidáz csoportba tartoznak. Ezeket a peptidázokat az emberi nyálkahártya felületén élő bakteriális patogének termelik. A fenti enzimek specifikusan az emberi IgA1-et hasítják, ami fontos szerepet játszik a immunrendszerben, különösen az emberi nyálkahártya tekintetében. Több tudományos publikáció számol be (Fishman és mtsai., 1985; Pohlner és mtsai., 1986; Rahr és mtsai., 1985) a *Neisseria gonorrhoeae* IgA1 proteáz génjének (*iga*) klónozásáról.

A *Haemophilus influenzae* b-szerotípusának *iga* génjét összehasonlították egy hasonló proteázzal az *N. gonorrhoeae*-ből, ami igazolta, hogy számos domén között nagy a homológia (Poulsen és mtsai., 1989). Feltételezhető, hogy a *N. gonorrhoeae* proteázának és a *H. influenzae* IgA1 proteázának hasonló a kiválasztási rendszere.

A *S. sanguis* IgA1 proteáz gén próbájával készült hibridizációs kísérletek nem mutattak homológiát az IgA1 proteáz-kiválasztó Gram-negatív baktérium

kromoszomális DNS-ével. *S. pneumoniae* IgA1 proteáz génjét *S. sanguis* proteáz génjének próbájával azonosították.

2.2.7. Fehérje tervezés (mérnökség)

A proteázok számos ipari alkalmazásánál szükség van olyan enzimekre, melyek megváltozott fiziológiás tulajdonságokkal bírnak. A rekombináns DNS technológiában elért új eredményeknek és az irányított mutagenézises eljárásoknak (SDM) köszönhető a fehérje tervezés gyors fejlődése. A módosított fehérjék tervezésben a gén molekuláris jellemzése és a fehérje háromdimenziós szerkezetének meghatározása fontos előfeltételnek számít. Számos proteáz röntgen kristálygrafikus szerkezetét már megismerték (Cooper és mtsai., 1990; Koszelak és mtsai., 1997; Pickersgill és mtsai., 1990; Sobek és mtsai., 1990). Baktériumokból, gombákból és vírusokból származó proteázokat eredményesen módosítanak bizonyos ipari alkalmazásokban szükséges hatások elérése érdekében.

Baktériumok

Mivel a szubtilizin egy jól ismert enzim, ez a fehérje modellként szolgál a fehérje tervezésben. A pH-függését (Thomas és mtsai., 1985), katalitikus aktivitását (Takagi és mtsai., 1989; Takagi és mtsai., 1988), hőstabilitását, denaturáló-stabilitását (Imanaka és mtsai., 1986; Narhi és mtsai., 1991), és specifitását (Ballinger és mtsai., 1990; Berglunk és mtsai., 1996; Carter és Wells, 1987; Estell és mtsai., 1986; Russel és Ferhst, 1987) irányított mutagenézissel változtatták meg. Szubtilizinbe épített diszulfid kötések a katalitikus centrumtól távol megnövelték a szubtilizin autolítikus stabilitását (Wells és Powers 1986). A szubtilizin E-nek megnőtt a hőstabilitása, amikor beépítettek, hőtüro szerin proteázok alapján, egy diszulfid-kötést (Takagi és mtsai., 1990). Strausberg és munkatársai kivágtak egy kalciumkötő hurkot a fehérjéből, ami megnövelte a szubtilizin stabilitását (Strausberg és mtsai., 1995). Irányított mutagenézissel egy olyan mutánst hoztak létre, amelynek natív proteolitikus aktivitása nem változott, viszont 1000-szer nagyobb lett a stabilitása erős kelátképző feltételek között. *B. stearothermophilus* semleges proteázában az irányított mutagenézissel kicserélt Asn241 megnövelte a hőstabilitását. *B. subtilis* semleges proteázában a

hőstabilitás 0,3°C-kal megnövekedett, amikor a 249-es pozícióban a Lys Ser-nel cserélték ki.

2.2.8 Megoldandó problémák és lehetséges megoldásai

A proteázok eltérő szubsztrát specifitású, aktív-centrumú és katalitikus mechanizmusú enzimek. A különleges specifitás miatt fontos szerepet játszanak a fiziológiában és a biotechnológiában. A jövő fejlődési irányai közé tartoznak: (i) enzim hipertermelés mikroba törzsekben, genetikai módosításokkal, (ii) proteázok létrehozása egyedülálló specifitásokkal, és növelt hő- és alkáli-stabilitással, irányított mutagenézis segítségével, (iii) proteáz-utánzó peptid (szinzim) szintézis, (iv) specifikus proteáz aktivitású abzyme létrehozása (katalitikus antitestek), (v) az enzimek szerkezeti mechanizmusának megértése.

A hőstabilitás fokozása

A proteázok fontos szerepet játszanak a tisztítószer és a bőrfeldolgozó iparágakban, ahol az enzimeknek magas hőmérsékleten kell stabilan működniük. Az egyik legáltalánosabb módszer, hogy a diszulfid-kötéseket irányított mutagenézissel beépítik az enzimbe. Amikor egy diszulfid-kötést a *Bacillus subtilis* szubtilizin E-jébe beépítettek, 4,5°C-kal nőtt a hőstabilitás, de nem változott a katalitikus aktivitás (Takagi és mtsai., 1990). Egy másik módszer a hőstabilitás fokozásában, a hidrofób aminosav csoportok áthelyezése a poláros csoportok helyére. Az N-terminális α -hélixben pozitív aminosavak fokozódása nem kívánatos a lehetséges hélix dipólussal történő interakció miatt. Lizin kicserélése szerinnel vagy aspartáttal a *B. subtilis* semleges proteázának hőstabilitását 0,3-1,2°C-kal növelte meg (Eijsink és mtsai., 1991). Bár ezek a módszerek fokozzák a proteázok hőstabilitását, a szülő és mutáns enzimek hőstabilitási különbsége elenyésző.

Az autoproteolitikus inaktiválás megakadályozása

A tisztítószerekben gyakran használják a szubtilizint lúgos pH-n mutatott stabilitása miatt. Azonban autoproteolitikus inaktiválása nagy problémát okoz az ipari felhasználás során. Az autolitikus és konformációs szerkezeti stabilitások összefüggnek

egymással (Wells és Powers, 1986). Logikusnak tűnik, hogy az aminosav mutációk az autoproteolízis centrumban csökkenthetik az önlebontás által történő inaktiválást.

A pH optimum megváltozása

A proteázok különböző alkalmazása más-más optimális pH-t kíván, pl. a bőr és tisztítószer iparban lúgos pH-jú aktív proteázok az optimálisak, de a sajtgyártás során savas proteázokra van szükség. Fehérje-tervezéssel az enzim pH-függése az ipari követelményeknek megfelelően alakítható. A fehérje felület töltésétől függően megváltozik a pH optimum. Az Asp99 szerinre cserélése a *Bacillus amyloliquefaciens* szubtilizinjében az enzim pH optimum változását eredményezte (Thomas és mtsai., 1985).

A szubsztrát specifitás megváltoztatása

Azok az enzim tulajdonságok, amelyek az ipari alkalmazásban szükségesek eltérnek a fiziologiai enzim tulajdonságaitól. Általában, a természetes enzim-szubsztrátok nem azonosok az ipari szubsztrátokkal. A kiterjedt kutatások ellenére, nem sokat tudunk azokról a tényezőkről, amelyek a proteáz specifitását a nem fiziologiai szubsztrát felé meghatározzák. Irányított mutagenézis és random mutagenézis módszerekkel próbáltak extracelluláris proteáz mutánsokat előállítani, amelyek a szülő enzimtől eltérő tulajdonságot mutattak (Graham és mtsai., 1993). A pont mutációk beépítése az α -lítikus proteáz szubsztrát-kötő helyére megváltoztatta a proteáz specifitását. A proteáz előszeretettel hasít egy kis telítetlen aminosavat (pl. az alanint) a C-terminális oldalon, főleg mert a zseb, melyben a szubsztrát P-1 oldallánca helyezkedik el sekély, a két terjedelmes metionin aminosav jelenléte miatt (Met190 és Met213). Met213 hisztidinnel történő cseréje jótékony hatással van a szubsztrát specifitására.

A termelés fokozása

Az enzimek előállítási költsége nagyon megnehezíti a proteázok ipari alkalmazását. A proteáz termelés hipertermelő törzsökkel és/vagy a fermentáció során használt tápoldat optimalizálásával növelhető. Szintén lehetséges a törzs tökéletesítése mutagenézissel vagy rekombináns DNS technológiával, amely a termelés növelését eredményezheti.

2.2.8. A jövőbeni lehetőségek

A proteázok egy különleges enzimcsoportoz tartoznak, mert fiziológiai és kereskedelmi szempontból is nagyon fontosak. Degradációs és szintézis tulajdonságokkal is rendelkeznek. Fiziológiai fontosságúak, mivel állatokban, növényekben és mikrobákban egyaránt megtalálhatóak. A mikrobiális proteázok a legkedveltebbek, mivel gyors növekedés, minimális térfogat szükséglet és könnyű genetikai manipulálhatóság jellemzi őket. Genetikai módszerekkel, mint például az irányított mutagenézis, új és hasznos tulajdonságokkal rendelkező proteázokat lehet előállítani. A klónozott DNS szekvenálási technikák nagyban kibővítették a proteáz szekvenciáról szerzett információinkat.

A rekombináns DNS technológia és fehérje-tervezés alkalmazásával sem sikerült még minden tekintetben biotechnológiai célokra alkalmas ideális mikrobiális proteázokat előállítani. A proteáz ipari felhasználásainál még léteznek problémák és szükség van a proteázok további fejlesztésére. A biodiverzitás felbecsülhetetlen forrást nyújt a biotechnológiai innovációhoz és fontos szerepet játszik az ipari kutatásban. Újabb kutatások meleg vízből, fagyos arktikus vízből, sós vízből, savas vagy lúgos környezetekből egzotikus baktériumok keresésére irányulnak. Lehetséges, hogy ezek az extrémofil proteázok rendelkeznek majd azokkal a tulajdonságokkal, amelyeket ipari felhasználás céljából keresünk. Ez mutatkozik az egyik legígéretesebb útnak. Eddig az extrémofilokat nehezen lehetett laboratóriumi körülmények között fenntartani és módosítani, ami gátolja az iparban történő alkalmazásukat is.

2.3. Következtetések

A baromfitoll és más keratinok potenciális proteinforrást jelentenek az állatállomány számára, de amionosav összetételük nem megfelelő, és nehezen emészthetőek, ami a madarak tollzatának 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 tűnnek 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 egyelőre 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.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

Táptalajok és oldatok

Tápközeg baktériumok izolálásához:

1000 ml LB tápközeg,
4 mg/ml nisztatin törzsoldat (szűrve sterilizendő).

Húsleves:

3 g húskivonat,
10 g pepton,
3 g NaCl,
4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$,
1000 ml desztillált víz,
20 g agar.

Basal Medium1 (BM1; tápközeg *Bacillus* tenyésztéshez; Claus és Berkeley, 1986):

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,12%,
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1%,
KCl	0,1%,
Nyomelemek	4%,
KH_2PO_4	0,3%,
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	0,3%,
agar	1,5%,
desztillált víz	950 ml,
pH	6,8.

Nyomelem oldat:

500 mg EDTA,
200 mg $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,

10 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,
3 mg $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$,
30 mg H_3BO_3 ,
20 mg $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$,
1 mg $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$,
2 mg $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$,
3 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ vagy 2,2 mg ammónium-molibdenát,
1000 ml desztillált víz.

Glükóz, élesztőkivonat, tejpor vagy tollpor tartalmú tápközegek:

0,2 g glükóz vagy,
0,2 % élesztőkivonat vagy,
0,2 g tejpor vagy,
0,2 g tollpor
100 ml BM1 tápközeg.

Basal Medium 2 (BM2; enzim tesztekhez; Ferrero és mtsai., 1996):

1 g $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$,
6 g K_2HPO_4 ,
3 g KH_2PO_4 ,
0,01 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,
0,05 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$,
0,01 g $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$,
0,001 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,
0,001 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,
1 g trinátrium-citrát,
1000 ml desztillált víz,
1% szénforrás.

LB tápközeg (Luria-Bertani Medium):

10 g pepton,
2 g élesztőkivonat,
10 g NaCl,
20 g agar,

1000 ml desztillált víz,
pH 7,0-7,2.

Táptalaj *Bacillus* törzsek számára (Claus és Berkeley, 1986):

3 g húskivonat,
5 g pepton,
15 g agar,
1000 ml desztillált víz.

Tejtáptalaj (kazein hidrolízis kimutatásához):

2 g pepton,
1 g glükóz,
2 g Na₂HPO₄,
10 g NaCl,
1000 ml desztillált víz,
30 g agar.

Autoklávozás után 90 ml alaptáptalajhoz 10 ml, 15 percig 5000 g-n centrifugált, majd nyomás alatt hősterilizett tejet adunk.

Tápszselatin (Zselatin elfolyósítási teszthez):

4 g húskivonat,
4 g pepton,
1 g élesztőkivonat,
200 g zselatin,
1000 ml desztillált víz.

Keményítő táptalaj (amiláz kimutatására):

10 g vízdékony keményítő,
5 g élesztőkivonat,
20 g agar,
1000 ml desztillált víz.

Nitrátleves (Nitrát-redukció kimutatására):

4 g húskivonat,

10 g pepton,
1 g KNO₃,
1000 ml desztillált víz.

Voges-Proskauer tápoldat:

7 g proteáz pepton,
5 g glükóz,
5 g NaCl,
1000 ml desztillált víz,
pH 6,5.
121°C-on 20 percig sterilizálni.

Tojássárgája reakció tápközeg (Claus és Berkeley, 1986):

10 g tripton,
5 g Na₂HPO₄,
1 g KH₂PO₄,
2 g NaCl,
0,1 g MgSO₄ x 7H₂O,
2 g glükóz,
1000 ml desztillált víz,
pH 7,6

121°C-on 20 percig sterilizálni.

15 ml tojássárgája-lecitint sterilre szűrni és hozzáadni 100 ml alap médiumhoz.

Egy éjszakán keresztül +4°C-on tárolni és a felülúszót 2,5 ml-enként steril kémcsövekbe szétmérni.

Tápközeg lizozimmal szembeni ellenálló-képesség vizsgálatra:

Az enzimet desztillált vízzel 10 000 enzimegység/ml koncentrációra hígítani és szűrővel sterilizálni. 1 ml lizozim oldatot összekeverni 99 ml steril tápoldattal (*Bacillus*ok számára; Claus és Berkeley, 1986) és 2,5 ml-ként szétmérni steril dugózott kémcsövekbe.

Tápközeg szénhidrátokból történő savtermelés vizsgálatához:

Alap tápközeg: 1 g N_2HPO_4 ,
0,2 g KCl_2 ,
0,2 g MgSO_4 ,
0,2 g élesztőkivonat,
15 g agar,
1000 ml desztillált víz.

A pH-t 7,0-re állítani, majd 15 ml 0,04 %-os brómkrezol-bíbor oldatot hozzáadni. 121°C-on 20 percig sterilizálni.

Szénhidrát oldatok: 10 %-os oldatok. A végső koncentráció arány 0,5 % (w/v) szénhidrát/tápközeg, amit a 10 %-os szénhidrátok steril szűrésével kell a tápközeghez adni. Lemezt kell önteni.

Szénhidrátok: D-(+)-glükóz, L-(+)-arabinóz, D-(+)-xilóz, D-(-)-mannitol.

Tápközeg citrát vagy propionát hasznosításának vizsgálatához:

1 g trinátrium-citrát, vagy 2 g Na-propionát,
1,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,
0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,
1 g KCl ,
40 ml nyomelem oldat,
15 g agar,
920 ml desztillált víz,
20 ml 0,04 %-os (w/v) fenolvörös.
pH 6,8. 121°C-on 20 percig sterilizálni.

Nyomelem oldat: 500 mg EDTA,
200 mg $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,
10 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,
3 mg $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$,
30 mg H_3BO_3 ,
20 mg $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$,
1 mg $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$,
2 mg $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$,
3 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, vagy 2,2 mg ammónium-molibdenát,
1000 ml desztillált víz.

Peptonvíz tápoldat indol kimutatására:

A. 10 g pepton,
5 g NaCl,
0,5 g L-triptofán
1000 ml desztillált víz.

B. 10 g pepton,
5 g NaCl,
1000 ml desztillált víz.

Fenilalanin agar:

3 g élesztő kivonat,
2 g DL-fenilalanin,
1 g Na₂HPO₄,
5 g NaCl,
12 g agar,
1000 ml desztillált víz.
pH 7,3.

Tirozin agar:

0,5 g L-tirozin,
10 ml desztillált víz.

121°C-on 20 percig sterilizálni, steril körülmények között 100 ml steril tápagarhoz (*Bacillusok* számára; Claus és Berkeley, 1986) keverni.

Reagensek

Oxalátos kristályibolya:

A oldat: 1 g kristályibolya,
10 g etanol (96%).

B oldat: 1 g ammóniumoxalát,
100 ml desztillált víz.

Az A oldatot a B oldatba öntjük keverés közben.

Lugol oldat 1: 1 g jód,
 2 g KI,
 300 ml desztillált víz.

Szafranin oldat: 250 mg szafranin,
 10 ml etanol (96%),
 100 ml desztillált víz.

Lugol oldat 2: (*keményítő hidrolízis kimutatásához*)

Törzsoldat:

 5 g jód,
 10 g KI,
 100 ml desztillált víz.

Hidegen tartjuk, használat előtt desztillált vízben 50-szeresére hígítjuk.

Malachitzöld festékoldat:

 1 g malachitzöld,
 1 g fenol,
 100 ml desztillált víz.

Metilénkék festékoldat:

 50 mg metilénkék,
 5 ml etanol (96%),
 95 ml desztillált víz.

Nitrát reagens:

 70 mg difenilamin,
 60 ml cc. H₂SO₄,
 29 ml desztillált víz,
 11 ml cc. HCl.

Az oldás sorrendje: a vízhez kénsavat adunk, ebben oldjuk a difenilamint, majd keverés közben hozzáadjuk a sósavat. A reagens 24 óra múlva használható.

Nitrit reagens:

A oldat:

800 mg szulfanilsav,
100 ml 5 M ecetsav

B oldat:

500 mg α -naftilamin,
100 ml 5 M ecetsav,

5 M ecetsav készítése: 125 ml desztillált vízhez 50 ml jégacetet adunk.

Kovács reagens (indolkimutatáshoz):

5 g para-dimetilamino-benzaldehid,
75 ml amilalkohol,
25 ml cc. HCl.

HgCl₂ reagens:

15 g HgCl₂,
20 ml cc.HCl,
100 ml desztillált víz.

Enzim szubsztrátok:

1., L-Leu-p-nitroanilid, 2. N-Acetil-L-Leu-p-nitroanilid, 3. N-Szukcinil-L-Phe-p-nitroanilid, 4. N-Benzoil-L-Tyr-p-nitroanilid, 5. N-Benzoil-L-Phe-L-Val-L-Arg-p-nitroanilid, 6. N-Benzoil-L-Arg-p-nitroanilid, 7. N-Szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid, 8. N-Szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Ala-p-nitroanilid, 9. N-CBZ-L-Gly-L-Gly-L-Leu-p-nitroanilid és 10. N-CBZ-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Leu-p-nitroanilid kromogén peptidáz szubsztrátok a Sigma-tól.

A szubsztrátokat 4 mM koncentrációban dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk és -18°C -on tároltuk.

Pufferek:

1 x PBS foszfát puffer: 8 g NaCl,
0,2 g KCl,
1,45 g Na₂HPO₄,
0,2 g NaH₂PO₄,
1000 ml desztillált víz.
pH 7,1-7,2
sterilizés után hozzáadni:
0,1 g CaCl₂,
0,1 g MgCl₂ x 6H₂O

Enzim-szubsztrát puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 8,
0,1 % NaCl,
1 mM MgCl₂.

Tris/HCl puffer, pH 8:

5,62 ml Tris-(Hidroximetil)-aminometán hidroklorid,
4,38 ml Tris-(Hidroximetil)-amino-metán.

Tris/HCl pufferek:

pH	Tris/HCl	Tris/OH
7,2	0,889	0,111
7,3	0,867	0,133
7,4	0,837	0,163
7,5	0,804	0,196
7,6	0,767	0,233
7,7	0,724	0,276
7,8	0,673	0,327
7,9	0,618	0,382
8,0	0,562	0,436

8,1	0,509	0,491
8,2	0,448	0,552
8,3	0,389	0,611
8,4	0,334	0,666
8,5	0,280	0,720
8,6	0,232	0,768
8,7	0,190	0,810
8,8	0,156	0,844
8,9	0,122	0,878
9,0	0,096	0,904

Foszfát-puffer (Sorensen szerint):

A oldat: 9,08 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$,

B oldat: 11,88 g $\text{Na}_2\text{HPO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$.

pH	A oldat	B oldat
5,0	98,8	1,2
5,2	98,0	2,0
5,4	96,7	3,3
5,6	94,8	5,2
5,8	91,9	8,1
6,0	87,7	12,3
6,2	81,5	18,5
6,4	73,2	26,8
6,6	62,7	37,3
6,8	50,8	49,2
7,0	39,2	60,8
7,2	28,5	71,5
7,4	19,6	80,4
7,6	13,2	86,8
7,8	8,6	91,4
8,0	5,5	94,5
8,2	3,3	96,7

Anyagok DNS preparáláshoz:

TE: 50 mM Tris/HCl, pH8,
50 mM EDTA.

Lizozim törzsoldat: 10 mg lizozim,
1 ml 0,25 M Tris-HCl pH 8.

STE: 50 mM Tris/HCl, pH8,
50 mM EDTA
0,5% SDS.

TES puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5,
1 mM EDTA,
1 mM NaCl.

Anyagok gél elektroforézishez:

10 x TAE:
48,4 g Tris-(Hidroximetil)-Aminometán,
11,4 ml ecetsav (96%-os),
20 ml 0,5 M Na₂EDTA.

Gél (DNS elektroforézishez):

200 ml 1xTAE,
0,8 % agaróz,
sterilezés után: 5 µl Et-Br (10 µg ml⁻¹).

Anyagok 16S rDNS PCR-rel történő amplifikálásához:

1 µl Taq polimeráz puffer,
5 µl MgCl₂,

400 µl mindegyik dNTP-ből,
1 µM primer(ek),
2,5 U Taq polimeráz (Zenon Biotechnológia)
50 µg genomi DNS.

Primerek: 27F; 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
1492R; 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'.

Eszközök:

API-ZYM diagnosztikai teszt kit (Bio-Merieux).

3.2. Módszerek

Keratinbontó baktérium izolálása:

Szemétdombról származó rothadó tyúktollat fiziológiás sóoldatba tettünk és 30 percig szobahőmérsékleten ráztattuk (180 rpm). A felülúszót egy-egy térfogat arányban (10-10 ml) húsleves tápfolyadékkal kiegészítve épp tollakat tartalmazó lombikokba mértük és több héten keresztül 50°C-on inkubáltuk. 10 ml tápfolyadékot hetente lecseréltünk ½ térfogat húslevesre és ½ térfogat fiziológiás sóoldatra.

Keratin hidrolízishez történő adaptáltatás:

Az izolált homogén baktérium tenyészetekből steril tollat és 20 ml 0,9 % NaCl-ot tartalmazó lombikokat inokuláltunk. Több héten keresztül 50°C-on rázatott tenyészetben (180 rpm) inkubáltunk.

Az izolált baktérium törzs fenntartása:

Tartós tárolás céljára a húsleves tápfolyadékban növesztett kultúra 700 µl-ét Eppendorf-csövekbe vittük és 300 µl glicerolt adtunk hozzá, alapos összerázás után rövid időn belül -80°C -ra hűtöttük.

Rövid idejű tárolás céljából a mikrobát húsleves agaron növesztettük és a tenyészetet $+4^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Inokulúmként 20 ml húslevesbe oltott 1 kacsnyi -80°C -on tárolt mikroba 45°C -on rázatott (180 rpm) tenyészetét használtuk.

Baktérium meghatározás:

Az aktív keratin bontó mikrobát a Bergey Manual of Systematic Bacteriology (1986) alapján, és 16S rDNSszekvencia analízissel azonosítottuk.

Sejtmorfológia-meghatározása mikroszkóppal:

A sejtmorfológiai vizsgálatokhoz általában fiatal (18-24 órás) tápfolyadékban (*Bacillusok* számára; Claus és Berkeley, 1986), rázatott körülmények között növesztett kultúrákat használtunk. A táplemezen növesztett kultúrák morfológiája heterogén lehet a tápanyagok és az oxigén ellátottság egyenetlenségéből kifolyólag. Hosszabb idejű inkubáció (3-7 nap) lehetőséget nyújt a spórák megfigyelésére.

Gram-festés (Hucker szerint):

A baktériumból kenetet készítettünk, majd 1 percig festettük kristályibolyával, ezt pár másodperces csapvizetes öblítés követte. 1 percig Lugol-oldattal fedtük, majd csapvízzel mostuk és szárítottuk. A tárgylemezt 30 másodpercig etanollal mostuk. Száradás után 10-20 másodpercig szafraninnal kontrasztfestést alkalmaztunk, majd csapvízzel öblítettük és szárítottuk a lemezt.

Spórafestés (Wirtz-féle módszer):

A baktérium tenyészetből szuszpenziót készítettünk, amit rögzítés nélkül szárítottunk. Szűrőpapírt helyeztünk a kenetre, a malachit-zöld oldatot 10 percig csepegtettük rá és úgy melegítettük láng felett, hogy ne forrjon. Az elpárolgó folyadékot a festékoldat állandó adagolásával pótoltuk. Ezután 30 másodpercig csapvízzel mostuk a preparátumot, majd szafraninnal 30 másodpercig kontrasztfestést alkalmaztunk. Végül vízzel öblítettük és szárítottuk a preparátumot. A spórák zöldek, a vegetatív sejtek pirosak.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok:

A baktérium tenyészetet lecentrifugáltuk és Tris/HCl, pH 8 pufferrel mostuk. 100 ml sejthez 1 ml fixálót (Karnovsky, 1965) adtunk, 2 és fél órán keresztül szobahőmérsékleten tartottuk, majd 6 ml Tris/HCl, pH 8 puffert adtunk hozzá és újból lecentrifugáltuk. A Tris-pufferrel történő mosást 2x megismételtük. A sejtekre 1% ozmiumot tartalmazó 2 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5 puffert vittünk, 1 óra elteltével Tris pufferrel, majd 50%-os alkohollal mostuk. Ezt követően tömény, túltelített uranil acetát 50%-os alkoholos oldatát mértük a sejtekre és 20-30 perc elteltével 70%-os alkoholban 12 órát állni hagytuk. A minta dehidratálását felszálló alkohol sorozatban (80, 90, 96, 100%) 10-10 percig mostuk, ezt követte kétszeres propilén-oxidos mosás. Centrifugálás után Durkopán ACM műgyantát vittünk a sejtekre, 2 napig 56°C-on polimerizáltattuk a gyantát. 2 nap elteltével megfaragtuk és gyémánt késsel félvékony metszeteket készítettünk. A metszeteket metilénkék festék oldatban rövid ideig festettük, fénymikroszkópban tájékozódunk, ezt követően ultravékony metszetet készítettünk, amit ólomcitrát oldattal kontrasztoltuk, majd a metszeteket vákuum gőzölővel szeneztük. Tesla BS 500-as elektronmikroszkóppal felvételeket készítettünk.

Kataláz teszt:

Húsleves táptalajból lemezt öntöttünk és a mikrobát csészénként egy-egy foltba oltottuk. 12 órás 45°C-os inkubálás után 3 %-os H₂O₂-t rétegeztünk a tenyészetre.

Anaerob növekedés:

3 kémcsőbe 10-10 ml húisleves agart öntöttünk. Szűrt tenyészetet készítettünk. 45°C-on inkubáltuk, majd az 1., 3. és 7. napon megvizsgáltuk a növekedést.

A legmagasabb és a legalacsonyabb növekedési hőmérséklet meghatározása:

20 ml húisleves tápfolyadékot tartalmazó lombikokat 0,1 ml logaritmikus szaporodási fázisban lévő baktérium kultúrával oltottunk be és a hőmérséklet kivételével azonos körülmények között, azonos ideig inkubáltuk. Az inkubálási hőmérséklet 5°C-onként változott.

Tojássárgája reakció:

3 párhuzamosban, két-két tápközeget tartalmazó kémcső közül az egyiket leoltjuk, míg a másik kontroll marad. 1, 3, 5 és 7 napos inkubációt követően figyeltük a fehér csapadék megjelenését a tápközegben.

Lizozim rezisztencia teszt:

Egy lizozim tápoldatot és egy tápoldatot (*Bacillusok* számára; Claus és Berkeley 1986) tartalmazó kémcsövet folyadék-tenyészetből vett oltókacsnyi mikrobával oltottunk le. A lizozim rezisztenciát 3 és 7 napos inkubálás után vizsgáltuk.

Növekedés NaCl jelenlétében:

Kémcsövenként 3-3 ml tápfolyadékot (*Bacillusok* számára; Claus és Berkeley 1986) és 0, 5, 7, és 10 % (w/v) NaCl-t tartalmazó csöveket egy-egy oltókacsnyi folyadék-tenyészetrel oltottunk le. Aerob körülmények biztosítása céljából a csöveket döntött helyzetben inkubáltuk. A különböző NaCl koncentráción történő növekedést 5 és 7 nap után ellenőriztük.

A mikroba cukorasszimilációjának vizsgálata:

Főzőpohárba 120 ml asszimilációs táptalajt öntöttünk és 40°C-os vízfürdőbe helyeztük. A baktériumból steril vízben szuszpenziót készítettünk és 1 ml-t oltottunk a 40°C-os táptalajba, jól elkevertük és táplemezt öntöttünk. A táptalaj megdermedése után a lemezre 1-2 mg-nyi cukrot szórtunk több pontban a csésze széléhez közel. A 3., 5. és 7. napon vizsgáltuk a mikroba növekedését.

Keményítő hidrolízis (amiláz kimutatása):

Keményítős táptalajból és 2 % glükózt tartalmazó keményítős táptalajból lemezt öntöttünk. A mikroorganizmusból steril fiziológiás sóoldatban tömény szuszpenziót készítettünk, majd csészénként 1-1 foltba 20 µl-nyi mikroba szuszpenziót pipettáztunk. A Petri-csészéket 12 és 24 órán keresztül inkubáltuk, majd Lugol-oldattal leöntöttük.

Citrát és propionát hasznosítás:

A citrátos és propionátos táptalajokból steril Petri-csészébe lemezt öntöttünk. A mikroorganizmusból steril fiziológiás sóoldatban tömény szuszpenziót készítettünk, majd a megdermedt lemezre csészénként 1-1 foltba 20 µl-nyi mikroba szuszpenziót pipettáztunk. Mindkét táptalajt tartalmazó lemezből egyet-egyet inokulátlanul hagytunk, kontrollként. A Petri-csészéket 45°C-on inkubáltuk, 3, 5 és 7 nap múlva vizsgáltuk a lemezek színét.

Nitrát-redukció:

Kémcsövekbe 10-10 ml nitrát táplevest öntöttünk, majd sterilizáltuk. Két csövet beoltottunk a mikrobával, kettő kontrollként sterilen maradt. 48 órás inkubálás után, a tenyészetből és a kontrollból 1-1 ml tápfolyadékot kémcsövekbe pipettáztunk és óvatosan nitrit, illetve nitrát reagenseket rétegeztünk rá. A pozitív reakció nitritnél a folyadék megpirosodása, nitrátnál a kék színgyűrűk megjelenése a fázishatáron.

Indol kimutatása:

Négy kémcsőbe 10-10 ml peptonvizet töltöttünk, majd sterilizáltuk. Két csövet leoltottunk a baktériummal, 2 cső steril kontroll maradt. Kettő és öt napos inkubálás után az egyik leoltott és az egyik steril cső 10 ml tápleveséhez 1-1 ml Kovács reagenst adtunk, jól összeráztuk. A piros szín megjelenése a felső fázisban indolt mutat.

Fenilalanin deaminálása:

Fenilalanin táptalajt a mikrobával leoltottunk és 5, illetve 10 napig inkubáltuk. Az inkubálást követően a lemezre 4-5 csepp 10%-os vas-klorid oldatot csepegtettünk a mikrobatelep köré. A zöld szín megjelenése jelzi a fenilalanin fenilpiruváttá történő alakulását.

Kazein hidrolízis:

A tejtáptalajt Petri-csészékbe öntöttük. Dermelés után csíkhúzással inokuláltuk a lemezeket. 12 órás inkubálás után figyeltük az oldódási zónákat közvetlenül, illetve $HgCl_2$ oldattal történő leöntést követően vizsgáltuk.

Tirozin hidrolízis:

A tirozin táptalajt tartalmazó Petri-csészéket egy-egy csepp inokulással oltottuk le. Négy, nyolc és tíz napos inkubálás után figyeltük a tirozin kristályok esetleges feloldódását a táptalajban.

Zselatin elfolyósítás vizsgálata:

Kémcsövekbe sterilen 15-15 ml táptalajt öntöttük. A táptalaj dermedése után szűrt tenyészetet készítettünk, egy cső kontrollként beoltás nélkül maradt. Szobahőmérsékleten egy hétig inkubáltunk.

DNS kivonás:

12 órás húsleves-tápotdatban nevelt baktérium tenyészetből 1,5 ml-t Eppendorf-csőben 12 000 rpm-en 3 percig centrifugáltunk. A felülúszót leöntöttük és az üledékhez 200 μ l 50 mM-os TE-t mértünk, majd hozzáadtunk frissen készített 10 μ l lizozim törzsoldatot. 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintát. Ezután 10 μ l Proteinkináz K enzimet (10 mg/ml) és 50 μ l STE-t adtunk hozzá, majd gondosan összekevertük. A csövet 50°C-os vízfürdőbe tettük, ahol 1 óra alatt feltisztult. A mintához fél térfogatnyi fenolt adtunk, óvatosan összekevertük, majd ugyanennyi kloroformot mértünk hozzá és újból összekevertük. 12 000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk. A felülúszóval új Eppendorf csőbe pipettáztuk. A fenolos kezeléstől kezdve a műveletet megismételtük, amit kétszer egymás után azonos térfogatnyi kloroformmal történő extrahálás követett. Ezután a DNS kicsapása következett, 1/20 térfogat kálium-acetát (5M) és 2,5 térfogat etanol (96%) hozzáadásával 12 órán át +4°C-on. Ezt követően 12 000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk a mintát, majd az üledéket 1 ml 70%-os alkohollal mostuk (2 órán keresztül szobahőmérsékleten). 10 perces centrifugálást követően a DNS-t vákuum alatt beszárítottuk, majd 150 μ l TES pufferbe oldottuk és -20°C-on tároltuk.

DNS gél-elektroforézis:

A DNS gélelektroforézishez 0,8-1,0%-os agaróz gélt használtunk 1 x TAE pufferben. Molekulasúly márkercént (5 μ l) Hind III emésztett λ DNS-t használtunk. A mintákat általában 90 V feszültségen, 60 percig futtattuk. A futás befejeztével UV fényben vizsgáltuk.

16S rDNS szekvencia analízise:

PCR reakció: A PCR-hez szükséges anyagokat a közeg összemérése közben jégen tartottuk. Ezt követően 20 µl steril olajat rétegeztünk rá. Az MJ Research (USA) PCR készülékét (PTC-100-60 DNA thermocycler) használtuk. Az általunk alkalmazott primer alkalmas a taxonómiaileg eltérő baktérium izolátumok 16S rDNS-ének felamplifikálására (Weisburg és mtsai., 1991; Suzuki és Giovannoni, 1996).

A PCR program 35 ciklusból állt, amelyben a kezdő denaturáló lépés 96°C-on történt 1 percig, ezt követte 55°C-on, 2 percig a második lépés (annealing) és a 3. lépés 72°C-on, 3 percig (extension). A 35 ciklus után egyszer 72°C-on 10 percig tartó utópolimerizáció következett.

A kapott PCR terméket agaróz gélen futtattuk, esetenként a visszaizolált DNS-t még egyszer felamplifikáltuk a tisztább végtermék elérése érdekében. A kapott mintát AB 373 DNS szekvenátorral (Applied Biosystems, CA, USA) megszekvenáltattuk és a szekvenciát nemzetközi génbanki adatállománnyal hasonlítottunk össze.

Fermentlé készítése:

A K-508 baktérium 10^5 ml^{-1} koncentrációjú inokulumával lett leoltva 20 ml BM 2 oldat, ami 0,2 % glükózt (GT tápoldat), 0,2 % tejport (TT tápoldat), 1 % őrölt tojport (ÖT), vagy esetenként egyéb szénforrásokat (D-galaktóz, raffinóz, D-xilóz, keményítő, melibióz, laktóz, glicerol, D-glükóz, inulin, maltóz és kazein) tartalmazott 1 % koncentrációban. Leoltás után a tenyészetet 45°C-on, 180 rpm-en rázatva neveltük. A tenyészet optikai denzitását 520 nm-nél határoztuk meg, a sejteket centrifugálással üleptítettük. A tiszta felülúszó proteáz aktivitását kromogén és fluorogén módszerekkel határoztuk meg.

Proteáz aktivitás vizsgálata:

Az azokazeináz aktivitást a következőképpen mértük: 0,2 ml fermentléhez 0,2 ml azokazein oldatot (40 mg ml^{-1} azokazein, 100 mM Tris/HCl, pH 8 pufferben) mértünk. 3 órás 35°C-on történő inkubálás után 0,4 ml 20%-os triklór-ecetsavat

pipettáztunk a mintához, majd összerázás után 3 percig centrifugáltuk (10 000 g). 0,2 ml tiszta felülúszót mikrotiter lap mintahelyére vittünk és az extinkciót 405 nm-nél Labsystem Uniscan II mikrotiter lap leolvasóval mértük.

A Fluram (fluorescamine, Roche Diagnostica) alkalmas a primer aminoszoportok detektálására. Ilyenek származhatnak a megfelelő proteinek enzimatis leontásából is. 10 mg protein szubsztráthoz (örölt toll, kazein vagy albumin) 0,3 ml enzim-szubsztrát puffer oldatot adtunk. Ehhez hozzámértünk 0,5 ml fermentlevet és 4, illetve tollpor esetén 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Inkubálás után a mintákat centrifugáltuk (10 000 g 5 perc). Ezt követően 0,2 ml felülúszót tiszta csövekbe vittünk és hozzáadtunk 0,2 ml Fluram-ot (10 mg ml⁻¹ acetonban oldva) és a mintákat azonnal összekevertük. Két perc után a mintákhoz 2ml desztillált vizet pipettáztunk és a fluoreszcencia mértékét Spekol 80 fluoriméteren 365 nm-es extinkciós hullámhosszon mértük.

A kromogén oligopeptid szubsztrátokkal (nitroanilid szubsztrátok) történő analízishez a szubsztrátokból DMSO-ban 4 mM-os töménységű törzsoldatot készítettünk. Ezt enzim szubsztrát pufferben 10-szeresére hígítottuk. A hígított szubsztrátokat és a fermentlevet azonos térfogatban (0,1-0,1 ml) mikrotiter-lapra vittük és 37°C-on 30 percig inkubáltuk. Az extinkciót 405 nm-nél mértük mikrotiterlap leolvasóval.

Enzimaktivitás gátlásának vizsgálata:

A gátló hatás vizsgálatának céljából a különböző proteáz inhibitoroknak a K-508 baktérium tripszin-típusú proteáz enzimére gyakorolt hatását mértük. A gátlószerekből 0,05 ml-t mértünk a gél-szűrt fermentlé 0,1 ml megfelelő frakciójához, 10 perc elteltével 0,4 mM N-Benzoil-L-Phe-L-Val-L-Arg-p-nitroanilid tripszin-típusú szubsztrát-oldatot (ebben a kísérletben az entim-szubsztrát puffer nem tartalmazott MgCl₂-t, az esetleges interakció elkerülése végett) adtunk a mintákhoz, 30 percig 37°C-on inkubáltunk. A felszabaduló nitroanilid mennyiségét 405 nm-nél Labsystem Uniscan II mikrotiterlap leolvasóval mértük.

Az extracelluláris proteázok frakcionálása:

Tollporon növesztett, 4 napos baktériumtenyészet fermentlevének 100 ml-ét centrifugáltuk. A felülúszót liofilizáltuk, majd a liofilizált anyagot 10 ml eluálóoldatban ($1 \text{ mg ml}^{-1} \text{ NaCl}$) feloldottuk és az oldatot 5 percig $12\,000 \text{ g}$ centrifugáltuk. A gélszűréshez 4 ml tiszta felülúszót használtunk. Ezt $0,9 \times 60 \text{ cm}$, és Sephadex G-100 gél töltetet tartalmazó Pharmacia analitikai oszlopon végeztük. Fractomax frakciógyűjtővel $0,16 \text{ ml perc}^{-1}$ átfolyási sebesség mellett 70 frakciót ($0,4 \text{ ml/minta}$) gyűjtöttünk. Egyes frakciók specifikus tripszin-típusú és kimotripszin-típusú proteáz aktivitást mutattak N-Benzoil-L-Phe-L-Val-L-Arg-p-nitroanilid és N-Szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid kromogén szubsztátok jelenlétében.

4. Eredmények

4.1. Új keratinbontó *Bacillus licheniformis* izolálásának körülményei és a mikroba jellemzése, meghatározása

4.1.1. Keratinbontó baktérium izolálása:

Rothadó baromfitollat gyűjtöttünk össze. A mintát 30 percen keresztül 0,9% NaCl oldatban rázattuk, a felülúszóval 0,9% NaCl oldatban lévő steril tollat (0,15%) inokuláltunk. A leoltott 20 lombikot 50°C-on 10 napon keresztül rázatott tenyészetben (180 rpm) inkubáltuk. Az egyik lombikban a toll bomlása szemmel megfigyelhető volt négy nap után. Ebből a tenyészetből hígítási sort készítettünk és húsleves tápagarra szélesztési módszerrel oltottunk, majd a Petri-csészéket 50°C-on inkubáltuk. A kinőtt telepekből külön-külön 100 ml-es Erlenmeyer lombikokat oltottunk le, amelyek 20 ml 0,9% NaCl oldatban lévő steril tollat (15%) tartalmaztak és a fent leírt körülmények között inkubáltuk. A tiszta tenyészetben is intenzív keratinolitikus aktivitást mutató baktériumnak a K-508 nevet adtuk. Az 1-es kép szemlélteti a K-508 törzs tollbontó képességét.

1. kép. A K-508 törzs tollbontásának szemléltetése.



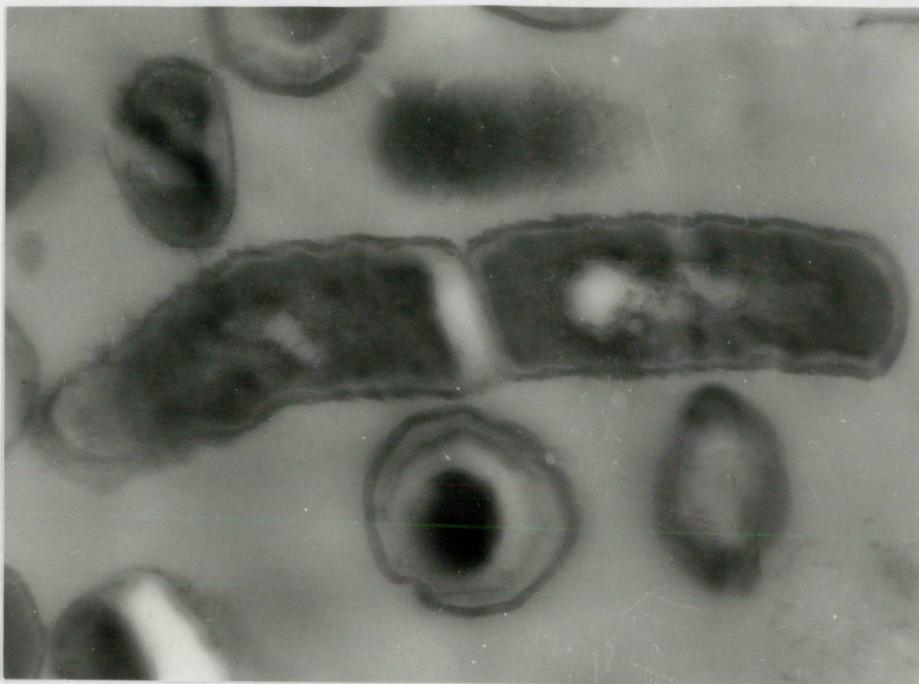
12 órás inkubálás, 50°C-on, 20 ml 0,9% NaCl-t tartalmazó tápfolyadékban.

4.1.2. A keratinbontó baktérium meghatározása:

Morfológiai és biokémiai tesztek:

A K-508 törzs festés alapján Gram-pozitív baktériumnak bizonyult. Egyenes pálcika alakú, elektronmikroszkópos felvételek alapján 2,5-3,5 mikron hosszú és 0,8-1,0 mikron széles, a végei lekerekedettek (2. kép). A sejtek egyesével vagy kettesével fordulnak elő, de láncot is alkothatnak (3. kép). 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 faj körülbelül 20°C és 55°C közötti hőmérsékleten nő, hőmérséklet-optimuma 47°C. A baktérium további jellemzőit, összehasonlítva a *B. licheniformis* faj általános tulajdonságaival, az 1. táblázat mutatja be.

2. kép. A K-508 törzs elektronmikroszkópos képe.



Egyenes pálcika alakú, elektronmikroszkópos felvételek alapján 2,5-3,5 mikron hosszú és 0,8-1,0 mikron széles, a végei lekerekedettek. 32 000-szeres nagyítás.

3. kép. A K-508 baktérium törzs sejtmorfológiája fénymikroszkópos felvételen.



A sejtek egyesével vagy kettesével fordulnak elő, de láncot is alkothatnak 1100-szoros nagyítás

1. táblázat. *B. licheniformis* K-508 és a *B. licheniformis* (Bergey kézikönyvben szereplő) fontosabb tulajdonságainak összehasonlítása.

Jellemző tulajdonságok	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i> K-508
Sejtátmérő >1.0 µm	-	-
Kör alakú spóra	-	-
Duzzadt sporangium	-	-
Parasporális zárvány	-	-
Kataláz	+	+
Anaerob növekedés	+	+
Voges-Proskauer teszt	+	NM
pH in V-P tápfolyadék		
<6	+	-
>7	-	+
Savtermelés		
D-Glükóz	+	+
L-Arabinóz	+	+
D-Xilóz	+	+
D-Mannitol	+	+
Gáztermelés glükózból	(-)b	-
Hidrolízis		
Kazein	+	+
Zselatin	+	+
Keményítő	+	+
Hasznosítás		
Citrát	+	+
Propionát	+	+
Tirozinbontás	-	-
Fenilalanin deaminálása	-	-
Tojássárgája lecitináz	-	-
Nitrát redukciója nitritté	+	+
Termelés		
Indol	-	-
Dihidroxiaceton	NM	NM
NaCl és KCl szükséglet	-	-
Allantoin vagy urát igény	-	-
Növekedés pH		
6.8, tápfolyadék	+	+
5.7	+	+
Növekedés NaCl		

2%	+	+
5%	+	+
7%	+	+
10%	NM	+
Növekedés		
5 °C	-	-
10 °C	-	-
30 °C	+	+
40 °C	+	+
55 °C	+	+
50 °C	+	+
55 °C	+	+
65 °C	+	-
Növekedés	a	+
lizozim jelenlétében		
Autotróf H ₂ + CO ₂ vagy	-	NM
CO		

Jelmagyarázat: NA: nincs adat; ^a az adat Boyer és mtsai.-tól származik (1973); ^b néhány gázbuborék termelődött.

16S rDNS szekvencia meghatározása és elemzése:

A K-508 baktérium faj részleges 16S rDNS szekvenciájának meghatározásához a 27F és 1492R primereket használtuk. Az összehasonlító analízis, amit ezekkel a szekvenciákkal és egy nyilvános adatbank (EMBL) szekvenciáival végeztünk, azt mutatta, hogy ez a faj közeli rokonságban áll a *Bacillus* nemzetség tagjaival. Nagy szekvencia azonosság (98%) volt megfigyelhető a K-508 és a *Bacillus licheniformis* faj képviselői között. A nagy mértékű szekvencia azonosság (98%), egyértelműen mutatja (a fiziológiai tesztekkel együtt), hogy a K-508 a *B. licheniformis* faj egy új törzse. A 687 nukleotid hosszú 16S rDNS szekvenciát, amit ebben a tanulmányban meghatároztunk, az EMBL adatbankba bejelentettük, hozzáférési száma: EMBL 410719.

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
<u>gi 15216993 gb AF399743.1 AF399743</u>	Bacillus licheniformis K...	1296	0.0
<u>gi 14009320 gb AY030326.1</u>	Bacillus licheniformis strain KL...	1197	0.0
<u>gi 14572041 gb AF387515.1 AF387515</u>	Bacillus licheniformis s...	1189	0.0
<u>gi 14572040 gb AF387514.1 AF387514</u>	Bacillus licheniformis s...	1189	0.0
<u>gi 14009331 gb AY030337.1</u>	Bacillus licheniformis strain KL...	1189	0.0
<u>gi 14009329 gb AY030335.1</u>	Bacillus licheniformis strain KL...	1189	0.0
<u>gi 12331011 gb AY017347.1</u>	Bacillus licheniformis 16S ribos...	1189	0.0
<u>gi 2661091 gb AF035430.1</u>	Bacillus licheniformis Carlsberg ...	1189	0.0
<u>gi 6644146 gb AF204165.1 AF204165</u>	Bacillus licheniformis st...	1189	0.0
<u>gi 6644145 gb AF204164.1 AF204164</u>	Bacillus licheniformis st...	1189	0.0

Alignments

>gi|15216993|gb|AF399743.1|AF399743 Bacillus licheniformis K-508 16S ribosomal RNA
sequence
Length = 687

Score = 1296 bits (654), Expect = 0.0
Identities = 676/687 (98%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gaggttacctcaccgacttcgggtgttacaactctcgtggtgtgacgggcggtgtgtac 60
|||||
Sbjct: 1 gaggttacctcaccgacttcgggtgttacaactctcgtggtgtgacgggcggtgtgtac 60

Query: 61 aaggcccggaacgtattcaccgcgcatgctgatccgcgattactagcgattccagctt 120
|||||
Sbjct: 61 aaggcccggaacgtattcaccgcgcatgctgatccgcgattactagcgattccagctt 120

Query: 121 cacgcagtcnagttgcanactgcatccgaactgagaacagatttgtgggattggcttag 180
|||||
Sbjct: 121 cacgcagtcgagttgcagactgcatccgaactgagaacagatttgtgggattggcttag 180

Query: 181 cctcgggcttcgctgcccttggcttgcaccattgtancacgtgtgtagcccagggtcata 240
|||||
Sbjct: 181 cctcgggcttcgctgcccttggcttgcaccattgtagcacgtgtgtagcccagggtcata 240

Query: 241 aggggcatgatgatttgacgtcatccccaccttctcgggttgtcaccggcagtcacct 300
|||||
Sbjct: 241 aggggcatgatgatttgacgtcatccccaccttctcgggttgtcaccggcagtcacct 300

Query: 301 tanagtgcccaactgaatgctggcaactaanatcaagggttgcgctcgttgccgggactta 360
||
Sbjct: 301 tagagtgcccaactgaatgctggcaactaagatcaagggttgcgctcgttgccgggactta 360

Query: 361 acccaacatctcagcacagagctgacgacaaccatgcaccacctgtcactctgcccccg 420
|||||
Sbjct: 361 acccaacatctcagcacagagctgacgacaaccatgcaccacctgtcactctgcccccg 420

Query: 421 aaggggaagccctatctctaggggtgtcaaaggatgtcaanacctggttaaggttcttcgc 480
|||||
Sbjct: 421 aaggggaagccctatctctaggggtgtcaaaggatgtcaagacctggttaaggttcttcgc 480

Query: 481 gttgcttcgaattaaaccacatgctccaccgcttgtgcgggcccccgctcaatcctttgan 540
|||||
Sbjct: 481 gttgcttcgaattaaaccacatgctccaccgcttgtgcgggcccccgctcaatcctttgag 540

Query: 541 tttcagtcttgcgaacgtactccccaggcggaatgcttaatgcgtttgetgcancactaa 600
|||||
Sbjct: 541 tttcagtcttgcgaacgtactccccaggcggaatgcttaatgcgtttgetgcagcactaa 600

Query: 601 agggcggaaacctctaacttancactcatcgtttacggggtgnacaaccagggtatc 660
|||||
Sbjct: 601 agggcggaaacctctaacttagcactcatcgtttacggggtggacaaccagggtatc 660

Query: 661 taatcctgttccnccccaccttccc 687
|||||
Sbjct: 661 taatcctgttccctccccaccttccc 687

>gi|14009320|gb|AY030326.1| *Bacillus licheniformis* strain KL-047 16S ribosomal RNA g
partial sequence
Length = 1502

Score = 1197 bits (604), Expect = 0.0
Identities = 662/681 (97%), Gaps = 3/681 (0%)
Strand = Plus / Plus

A K-508 törzs részleges rDNS szekvenciájának összehasonlítása génbanki szekvenciákkal, a BLAST program (Altschul és mtsai., 1997) segítségével.

A 10 legnagyobb hasonlóságot mutató szekvencia felsorolása, illetve a legnagyobb hasonlóságot mutató *B. licheniformis* törzs szekvenciájával történő összevetése.

A K-508 API-ZYM teszttel meghatározott tulajdonságai:

Az API-ZYM diagnosztikai teszt eredményeit a 2. táblázat szemlélteti. A mikroba magas foszfát és észteráz aktivitást mutat. A diszacharáz aktivitások közül csak β -glükózidáz és β -galaktozidáz aktivitás volt tapasztalható. Aminopeptidáz aktivitás nem volt kimutatható a fermentlében.

2. táblázat. *Bacillus licheniformis* K-508 törzs extracelluláris enzim profiljának meghatározása API-ZYM teszttel.

Szubsztrátok	Enzim aktivitás
2-naftil-foszfát	++
2-naftil-butirát	+
2-naftil-citrát	+
2-naftil-mirisztát	-
L-leucil-2-naftilamid	-
L-valil-2-naftilamid	-
L-cisztil-2-naftilamid	+
N-benzoil-DL-arginin-2-naftilamid	-
N-glutaril-fenilalanin-2-naftilamid	-
2-naftil-foszfát	+
Naftol-AS-BI-foszfát	++
6-Br-2-naftil- α -D-galaktopiranozid	-
2-naftil- β -D-galaktopiranozid	+
Naftol-AS-BI- β -D-glükuronid	-
2-naftil- α -D-glükopiranozid	+
6-Br-2-naftil- β -D-glükopiranozid	-
1-naftil-N-acetil- β -D-glükózaminid	-

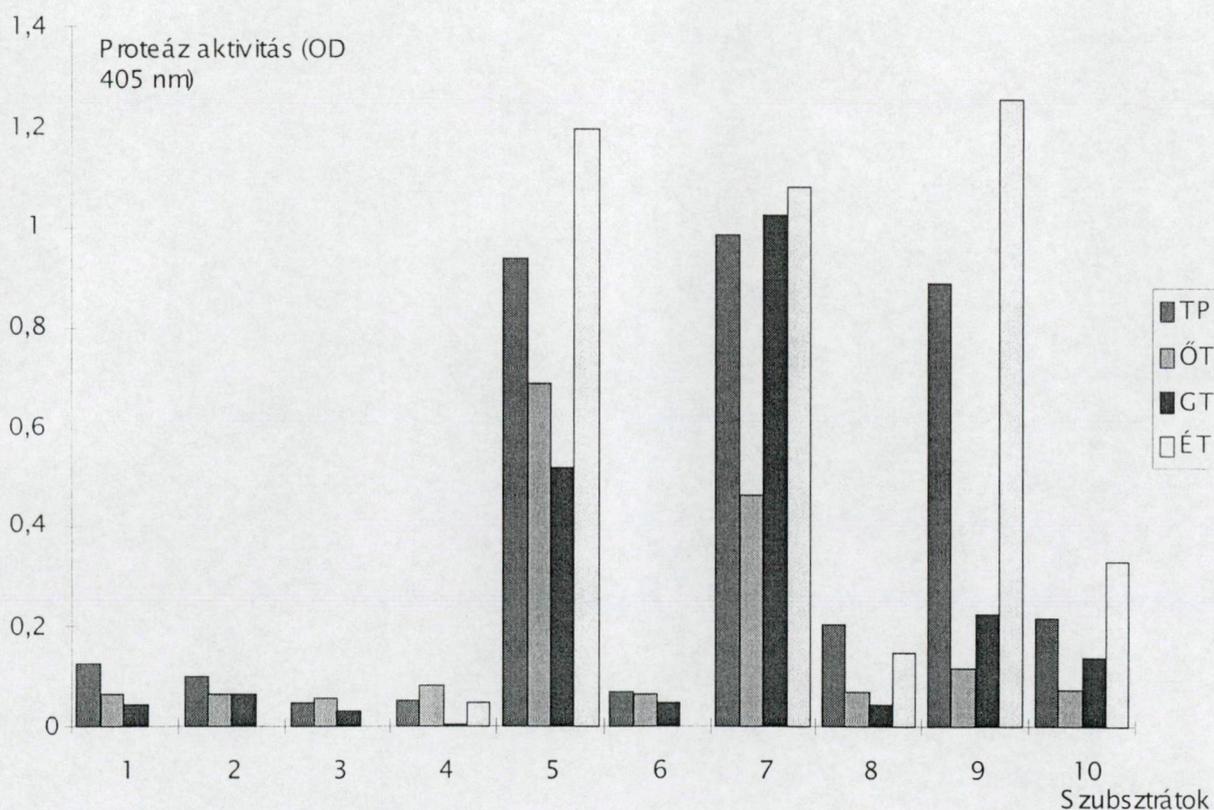
6-Br-2-naftil- α -D-mannopiranozid -

2-naftil- α -L-fukopiranozid -

4.1.3. A K-508-as törzs extracelluláris proteázának termelése és tulajdonságai

A *B. licheniformis* K-508 az általunk használt mind a négy tápfolyadékban gyors növekedésű volt. A maximális növekedést pH 7 értéken és 47°C-on mutatta.

1. ábra. Különböző tápfolyadékokban nevelt *B. licheniformis* hidrolizáló aktivitása kromogén proteáz szubsztrátokon.

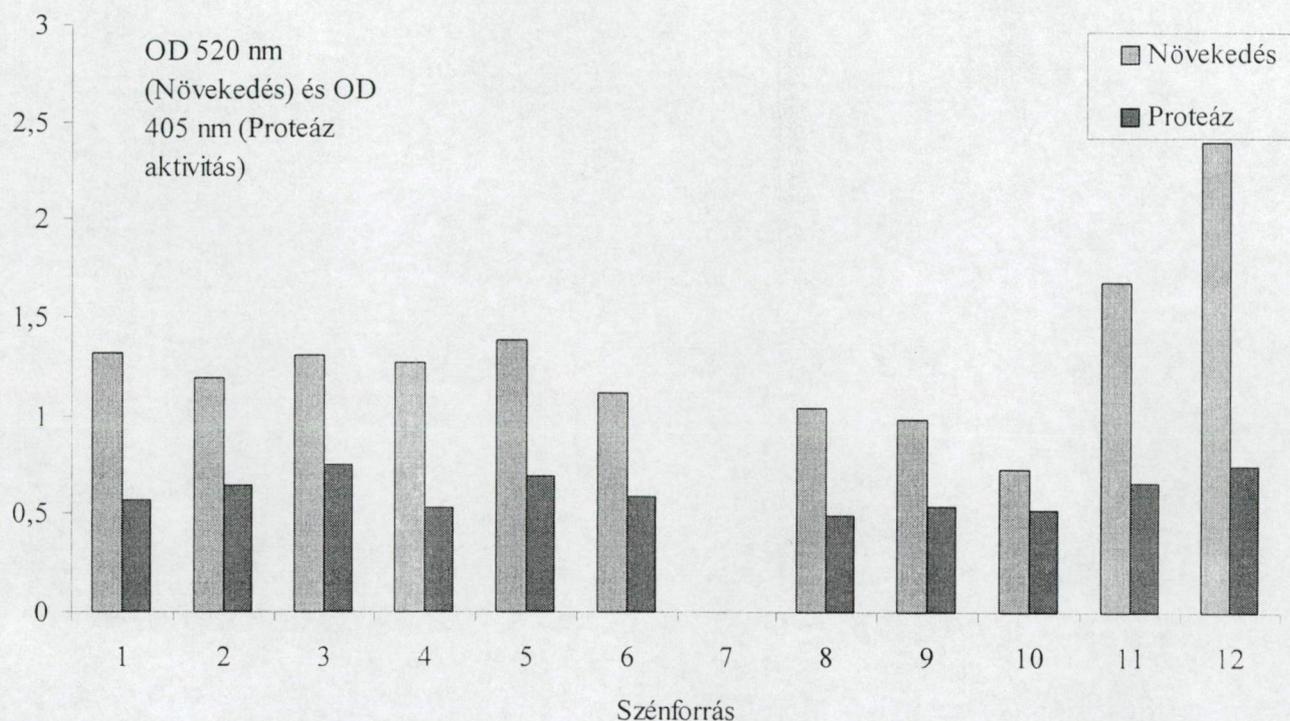


A fermentálás során használt alap tápfolyadék BM volt, amely 0,2% tejjel (TP), 1% örölt tollporral (ÖT) vagy 0,2% glükózzal (GT) és élesztő kivonattal (ÉT) lett kiegészítve. A szubsztrátok: 1. L-Leu-p-nitroanilid, 2. N-Acetil-L-Leu-p-nitroanilid, 3. N-Szukcinil-L-Phe-p-nitroanilid, 4. N-Benzoil-L-Tyr-p-nitroanilid, 5. N-Benzoil-L-Phe-L-Val-L-Arg-p-nitroanilid, 6. N-Benzoil-L-Arg-p-nitroanilid, 7. N-Szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid, 8. N-Szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Ala-p-nitroanilid, 9. N-CBZ-L-Gly-L-Gly-L-Leu-p-nitroanilid és 10. N-CBZ-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Leu-p-nitroanilid.

Inducer nélküli glükóz tartalmú minimál sóoldatban (GT) a törzs két típusú proteázt termelt, a tripszin-típusú (aktivitás: Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilidon) és a kimotripszin-típusú proteázt (aktivitás: Szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidon) (1. ábra). Az örölt tollat (ÖT) tartalmazó fermentlé nagyon hasonló szubsztrát-affinitási képet mutat. Az induktív hatásra reagálva tejjel (TP) vagy az oligopeptid tartalmú élesztőkivonat (ÉT) 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 (Cheng 1995). Ennek a proteáznak azonban a K-508 törzs esetében nincs szerepe a keratin lebontásában, mivel az örölt tollport tartalmazó fermentlében nem volt jelen.

A rövidebb oligopeptid szubsztrátok egyik típusú proteáz esetében sem bizonyultak jó szubsztrátnak. 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 (2. ábra).

2. ábra. *B. licheniformis* K-508 törzs konstitutív proteáz (azokazeináz) termelése.

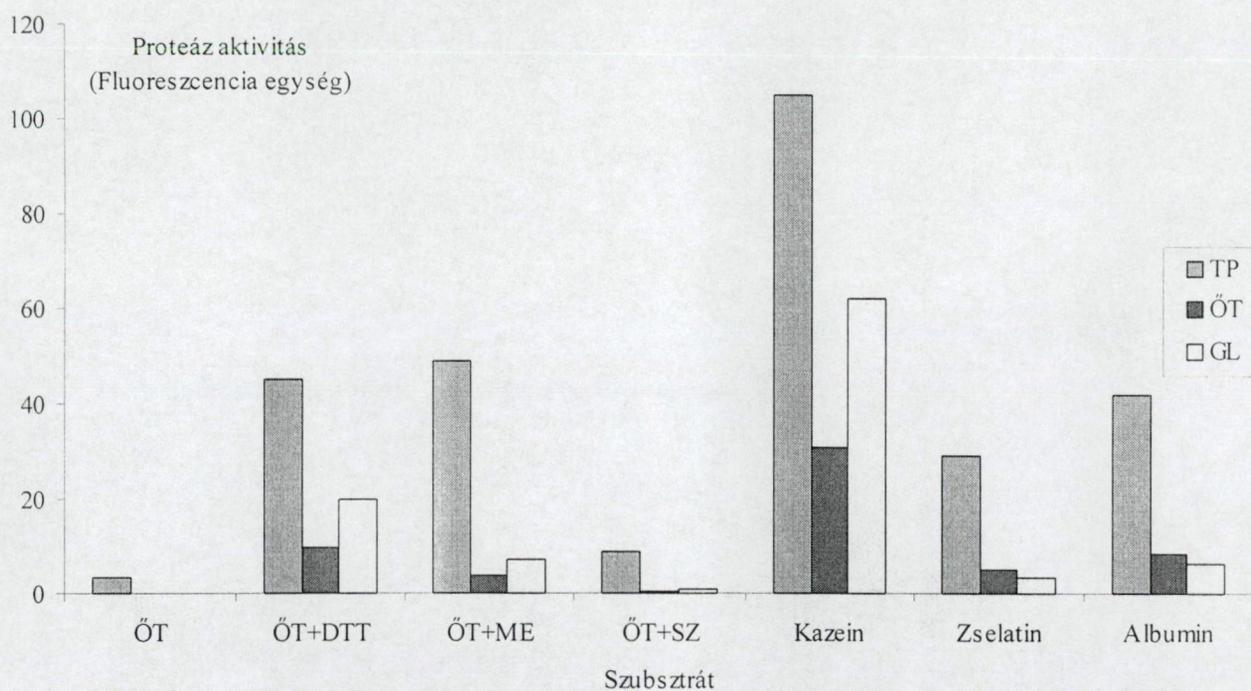


A fermentálás során használt tápfolyadék a BM2 volt, különböző szénforrásokkal kiegészítve: 1. szacharóz; 2. D-galaktóz; 3. raffinóz; 4. D-xilóz; 5. keményítő; 6. melibióz; 7. laktóz; 8. glicerol; 9. D-glükóz; 10. inulin; 11. maltóz; 12. kazein 1% koncentrációban.

A kimoelasztáz-típusú aktivitás kivételével a kazein (tejpor), mint proteáz inducer nem fokozta szignifikánsan a törzs proteáz termelését. Így törzsünk esetében egy olyan új jelenség figyelhető meg, ami nem jellemző más vad típusú *B. licheniformis* törzsere. Ennek hátterében valószínűleg egy általános enzim-szabályzóköör, spontán mutációval történt megváltozása áll. Egy derepresszált, mutagenézissel előállított proteáz termelő mutánst már korábban leírtak (Bierbaum és mtsai. 1994). A törzs fent tárgyalt tulajdonságai nagyon hasznosak lehetnek a proteázok termelésének technológiai szintű fermentációs folyamataiban. Szemben azzal a ténnyel, hogy a

baktérium a baromfitollat mind rázatott kultúrában, mind pedig fermentorban rövid idő alatt képes lebontani, 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 (3. ábra).

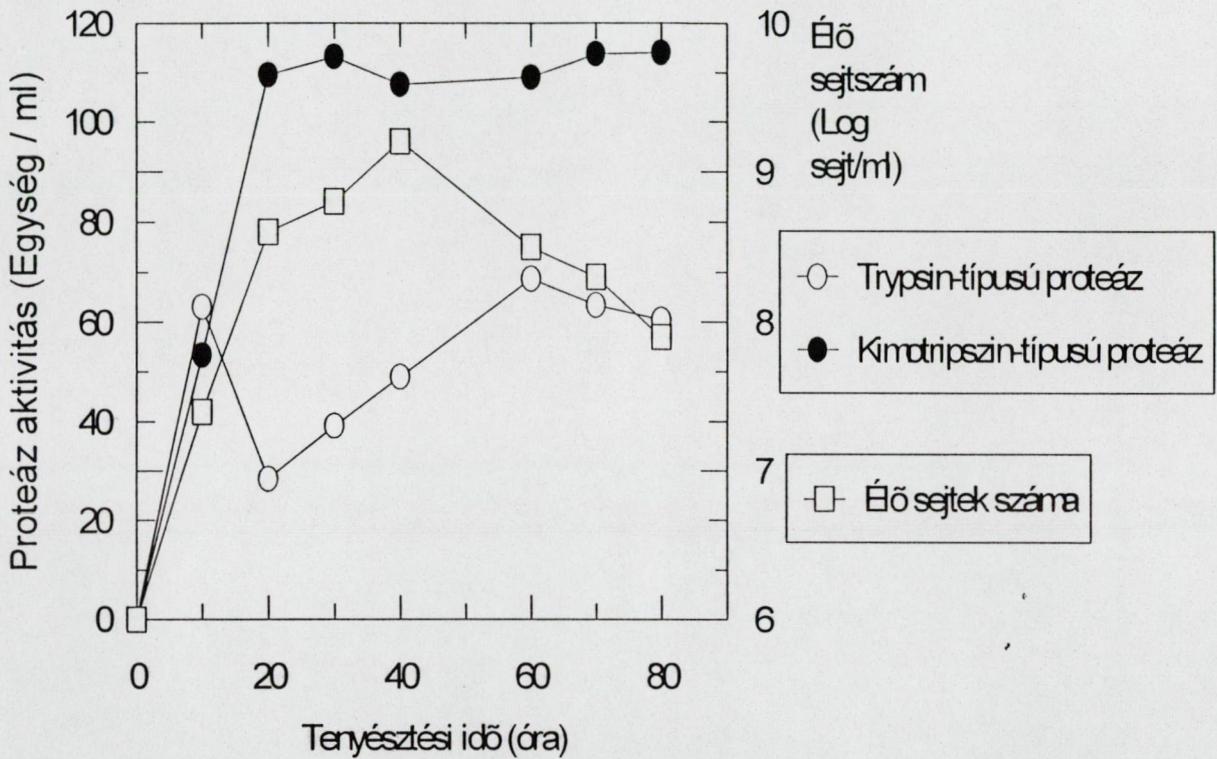
3. ábra. A *B. licheniformis* K-508 törzs proteáz aktivitása örölt tollat tartalmazó különböző tápközegben.



A *B. licheniformis* K-508 törzs proteáz aktivitása örölt tollat tartalmazó (ÖT) különböző tápközegben; kazein, zselatin és borjú szérum-albumin jelenlétében. Aktivitásként a peptid kötések hidrolízise során felszabaduló primer amino-csoportok mennyiségét mértük Fluram reagenssel. DTT: ditiotreitol, ME: 2-merkaptoetanol, TP. BM2 kiegészítve 0,2% tejjel, ÖT: BM2 kiegészítve 1% örölt tollal, GT: BM2 kiegészítve 0,2% glükózzal, ÖT+SZ: nátrium-szulfittal kezelt örölt tollpor.

A keratin 1 órás 70°C-on történő szulfít kezelése kevésbé volt hatékony. Ugyanezek a minták sokkal hatékonyabbak voltak más proteáz szubsztrátokon, pl. kazein, zselatin és borjú szérum-albumin.

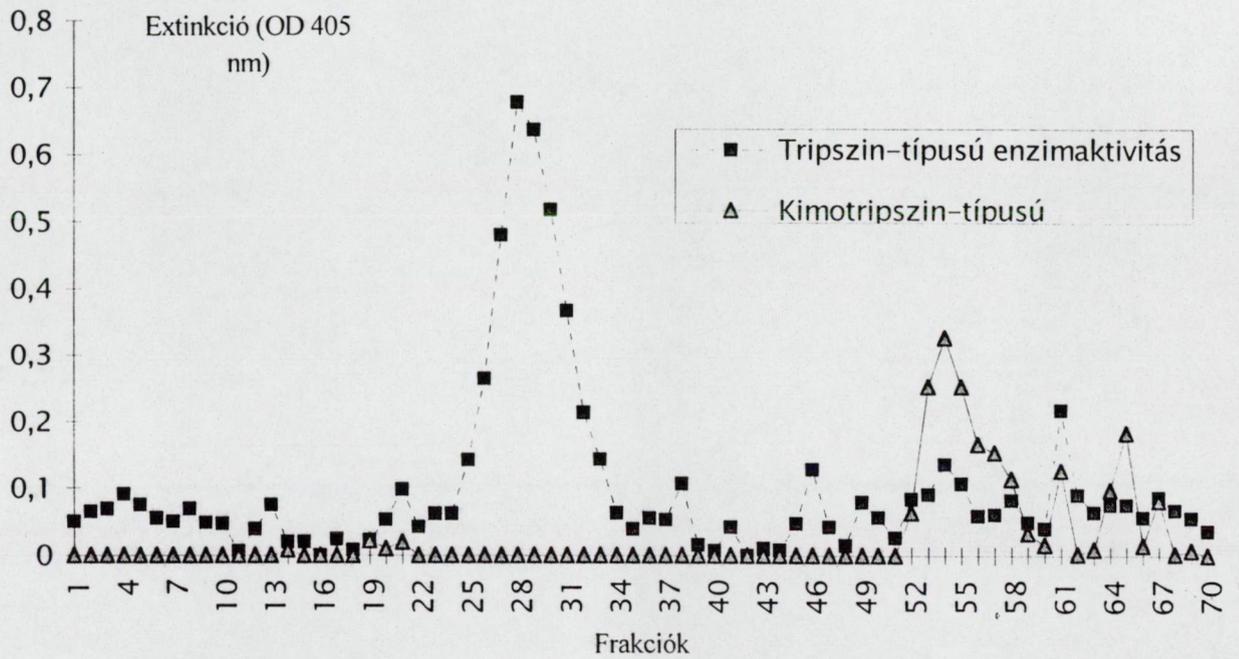
4. ábra. A *B. licheniformis* K-508 törzs növekedése és proteáz termelése 1% (w/v) örölt tollport tartalmazó BM2 tápközegben 35°C-on.



A tripszin-típusú proteáz aktivitást Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanliden és a kimotripszin-típusú proteáz aktivitást Szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroaniliden mértük.

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) (4. ábra). 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

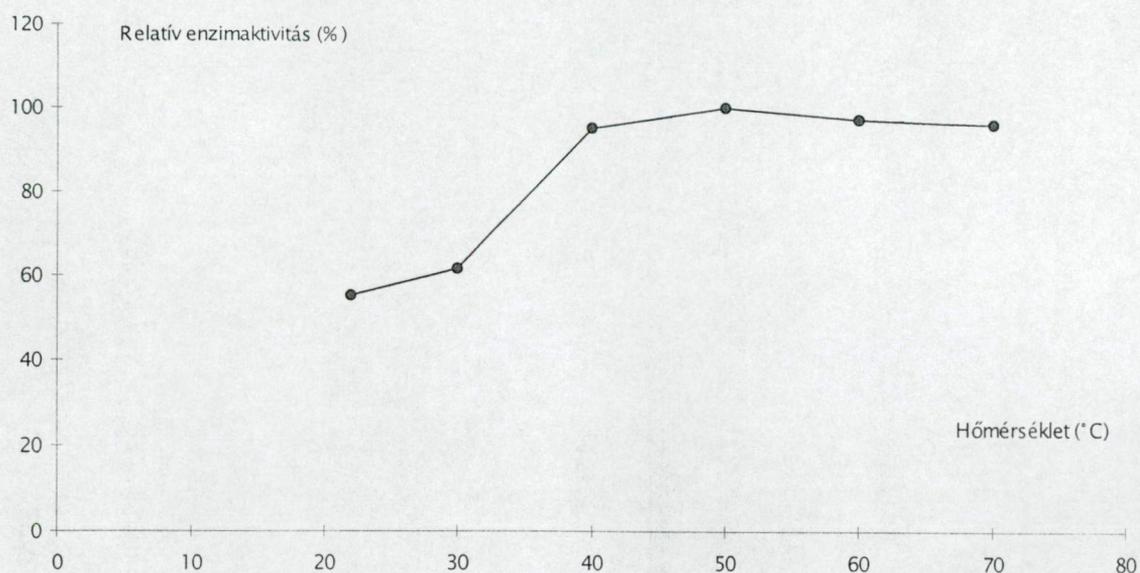
5. ábra. A *B. licheniformis* K-508 törzs fermentlevében található tripszin-típusú és kimotripszin-típusú proteáz aktivitások elválasztása Sephadex G-100 gél-szűrési kromatográfiával.



A fermentlé örölt baromfitollat tartalmazott. Az enzimaktivásokat Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid és Szukcinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid kromogén szubsztrátokkal határoztuk meg.

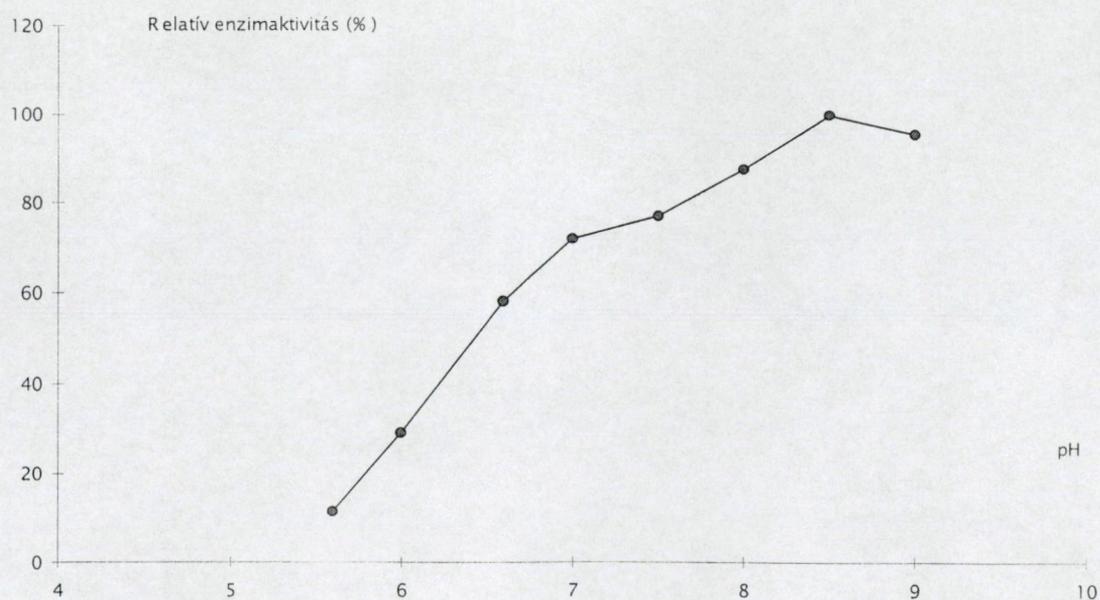
A 6. és 7. ábra a pH és a hőmérséklet függvényében szemlélteti a tripszin-típusú enzim aktivitását.

6. ábra. A hőmérséklet hatása a *B. licheniformis* K-508 tisztított tripszin-típusú proteáz enzimének aktivitására.



Az aktivitást 10 mM Tris/HCl pufferben (pH 8,5) oldott 0,4 mM Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid kromogén szubsztráttal mértük.

7. ábra. A pH hatása a *B. licheniformis* K-508 tisztított tripszin-típusú proteáz enzimének aktivitására.



Az aktivitást 1/15 M foszfát pufferben (pH4-7) és 10 mM Tris/HCl pufferben (pH 7-10) oldott 0,4 mM Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid kromogén szubsztráttal mértük.

Leszögezhető, hogy ez az enzim alacsony lúg és magas hőmérséklet toleranciájú tripszin-típusú proteáz, melynek pH=8,5 és 52°C a hőmérséklet optimuma.

A specifikus proteáz gátlószerekkel végzett kísérletekből (3. táblázat) egyértelműen kiderült, hogy ez a proteáz sem nem szerin-, sem nem metallo-proteáz, mivel a PMSF, TPCK, TLCK és az EDTA nem gátolták.

3. táblázat. Különböző proteáz inhibitorok hatása a *B. licheniformis* K-508 törzs tripszin-típusú proteáz enzimének aktivitására.

Inhibitorok	Koncentráció	Enzimaktivitás (%)
MgCl₂	1.0 mM	100
PMSF	1.0 mM	100
TPCK	0.1 mM	99
TLCK	0.1 mM	100
EDTA	1.0 mM	99
HgCl₂	1.0 mM	49
pCMB	1.0 mM	92

(PMSF= fenilmetilszulfonil fluoride, TPCK= tozil-L-fenilalanin klorometil keton, TLCK= tozil-L-lizin klorometil keton, pCMB= para-kloromerkuribenzoát, EDTA= etilenediamin tetraecetsav). A kísérleteket háromszor ismételtük meg. A táblázatban szereplő adatok a kísérletek tipikus eredményeit képviselik.

Nagy valószínűség szerint, ez a tripszin-típusú proteáz ciszteint tartalmaz az aktív centrumában, mivel 1 mM HgCl₂ nagymértékben gátolja az enzimet. Ebből kifolyólag ez a proteáz a tiol proteázok csoportjába tartozik, ami nem gyakori a mikroorganizmusok extracelluláris proteázai körében.

5. Eredmények megvitatása

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 pálcáforma, 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 keratinolitikus 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 keratinolitikus aktivitású baktériumot írtak le (Onfade és mtsai 1998) és ezen belül is elsősorban a *Bacillus licheniformis* ilyen jelentősége kiemelkedő (pl. Lin és mtsai. 1992; 1995; 1996). Kutatásaink során izolált új magas keratinolitikus 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 (Cheng és mtsai. 1995) 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 proteáz-termelő mutáns képes nagy mennyiségben szubtilizint termelni (Bierbaum és mtsai., 1994).

A K-508 törzs kiváló keratinbontónak bizonyult, míg a baktériumsejt mentes fermentlé csak lassan tudta a keratint bontani. Ereményeink 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 molekulásúlya 42kD körüli. Az enzimet, ami a *Bacillus* nemzetségnél újonnan leírt, tiol proteáz, a TPCK, TLCK, PMSF és EDTA nem gátolta, míg a HgCl₂ 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* (Cole és mtsai., 1993), a *Vibrio harvey* egy patogén törzs (Liu és mtsai., 1997) és egy pszikrotróf *Azospirillum sp.* (Oh és mtsai., 1999) törzs esetében fellelhetők.

6. 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 végzett kísérletekben 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 (aktivitás: 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 keratinolitikus 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 valószínűleg spontán mutáció következhetett be, ami felelős a különböző proteázok konstitutív szekrécijáért. 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-szűrőssel és jellemeztük. A tripszin-típusú enzim egyetlen éles csúcsként jelent meg a 26-31 frakciónál és továbbra is magas aktivitást mutatott a Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid, specifikus kromogén tripszin szubsztráton. Az enzim molekulásúlyát (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 HgCl₂ 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 nagyon hasznosak lehetnek a proteázok termelésének technológiai szintű fermentációs folyamataiban. 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. Ereményeink figyelembevételével a K-508 konstitutív proteáz-szekretáló *B. licheniformis* törzs alkalmas a keratinhulladék nagy hatásfokú *in situ* bakteriális lebontására (pl. komposztálási technológia).

Summary

Introduction

Feathers represent 5 to 7% of the total weight of mature chickens and are generated in huge quantities as a waste by-product at commercial poultry-processing plants. Feathers are made up primarily of keratin, which is also found in the claws and armour of reptiles and the hooves, horns, hide, hair and nails of mammals. Keratin in its native state is not degradable by common proteolytic enzymes such as trypsin, pepsin, and papain. Its degradation by microorganisms is performed by specific proteases (keratinases). The properties, secretion and use of microbial keratinases have recently been reviewed.

As a substrate of microbial decomposers, keratin does not accumulate in substantial quantity in nature. Keratinolytic activity has been reported for many fungal genera, and for various bacteria, e.g. *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Vibrio* and *Bacillus*: as an example the digestion of wool keratin by a *Bacillus* species has been reported.

The most effective keratin-degrading strains in the *Bacillus* genus belong in the *B. licheniformis* species. Keratinase of *B. licheniformis* PWD-1 is a serine protease that effectively degrades feather keratin and is active against both insoluble azokeratin and soluble FITC-casein. While the *kerA* protease of strain PWD-1 efficiently degrades keratin, keratin hydrolysis and the growth of PWD-1 on feathers can be induced by appropriate expression of the major subtilisin-type enzymes. Until recently, feather waste was utilised mainly as a dietary protein supplement for animal feedstuff. Biodegradation by microorganisms possessing keratinolytic activity is an alternative method for improvement of the nutritional value of feather waste and for avoidance of the destruction of certain amino acids.

Isolation and characterisation of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain

Feather samples rotting in natural habitats were collected. From this was isolated a new keratin degrading bacteria, which was named K-508. This strain had high chicken feather-degrading activity when cultured in feather-containing broth, with a growth optimum at pH 7.0 and 47. K-508 proved to be a Gram-positive bacterium. It is a straight rod-shaped bacterium, the rods being 2.5-3.5 microns long and 0.8-1.0 microns wide, with the ends rounded. The cells are found both singly and double, and can form chains. One subterminal oval endospore is produced per cell. It forms opaque colonies which are irregular in shape, glistening dull, dry, smooth and rough. The colonies are seen to disassociate. The strain grows at temperatures of from about 20°C, to about 55°C with a temperature optimum of 47°C. The results of metabolic tests and rDNA sequence analysis, it was identified as *Bacillus licheniformis*.

The results of API-ZYM diagnostic test showed that the strain posses high phosphatase and esterase activities. Of the disaccharase activities only β -glucosidase and β -galactosidase could be detected. Aminopeptidase activities were not present in the ferment broth.

Without any induction, in glucose minimal salts medium, the strain secreted at least two types of proteases, a trypsin-like protease (active towards Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide) and a chymotrypsin-like protease (active towards Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide). The ferment broth produced in the presence of milled chicken feathers displayed a very similar substrate-affinity picture. In response to the inductive effect of skim milk powder or of oligopeptides present in yeast extract, the strain secreted a protease with chimoelastase-like activity (degradation of CBZ-gly-gly-leu-p-nitroanilide). This protease does not have a role in the degradation of feather keratin in the case of strain K-508 as it was not present in ferment broths produced in feather medium.

As a distinguishing feature, strain K-508 displays a significant keratinolytic activity on native feather keratin (without any pretreatment) in the presence of SH-reducing compounds. Both trypsin-like and chymotrypsin-like proteases were constitutively secreted by this strain.

The highly keratinolytic *B. licheniformis* K-508 strain was able to secrete trypsin and chymotrypsin-like proteases practically independently of the carbon source used and without the presence of a protein or peptide inducer. This is unusual behaviour in respect of the regulation of proteases of bacteria. The extracellular proteases of the bacteria are generally regulated both by induction and by repression. In other strains of *B. licheniformis*, e.g. in strain PWD-1, the glucose practically totally suppresses the protease secretion and in strain MIR29 beside glucose, glycerol, D-xylose and sucrose were also strong repressors. In strain K-508, a mutation may have occurred which is responsible for this constitutive secretion of distinct proteases. Derepressed protease secretion mutants were earlier reported in *B. licheniformis*. Shorter oligopeptide substrates did not prove good substrates for either type of protease.

Of the two types of proteases, the one showing trypsin-like activity proved to be more stable in the ferment broths. The chymotrypsin-like enzymes underwent very rapid degradation in the crude ferment broths and this degradation was accelerated in the 10-fold concentrated samples. In this way the trypsin-like enzyme was purified by Sephadex G-100 gel-filtration and characterised.

The trypsin-like enzyme appeared as a single sharp peak in fractions 26-31 and exhibited high activity towards Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide, a very specific chromogenic trypsin substrate. The calculated M_w of the enzyme, determined by fractionation of a molecular weight standard was 42 kD

It can be concluded that this enzyme is a weakly alkaline and high temperature tolerant trypsin-like protease with optimum points of pH= 8.5 and 52 C. From the investigations performed with specific protease inhibitors, it is evident that this protease is not a serine- or metallo-protease as PMSF, TPCK, TLCK and EDTA were not inhibitory. It is very likely that this trypsin-like protease contains cysteine in the active

centre as 1 mM HgCl₂ markedly inhibited the enzyme. This protease therefore belongs in the group of thiol proteases, which are not common amongst the extracellular proteases of microorganisms.

Strain K-508 proved to be an excellent feather keratin degrader, while its ferment broths without the presence of bacterium cells were able to degrade feather keratin only slowly. In light of our results K-508 is a constitutive protease-secreting *B. licheniformis* strain, which is suitable for the in situ bacterial degradation of keratin wastes, e.g. with composting technology, but its ferment broth is not suitable for the conversion of feather to feedstock additives.

7. Hivatkozási lista

Abdel-Hafez, A. I. I. & El-Sharoumy, H. M. M. 1990. The occurrence of keratinolytic fungi in sewage sludge from Egypt. *J. of Basic Microbiol.*, 30, 73-79.

Adbul-Fatah, H. M., Moubasher, H. H. & Maghazy, S. M. 1982. Keratinolytic fungi in Egyptian soils. *Mycopathologia*, 79, 49- 53.

Al-Musallam, A., Alzarban, S. S., Al-Sane, N. A. & Ahmad, T. M. 1995. A report on the predominance of a dermatophyte species in cultivated soil from Kuwait *Mycopathologia*, 130, 159-161.

Akimkina, T. V., E. A. Nosovskaya, and S. V. Kostrov. 1992. Cloning and expression of the neutral proteinase gene of *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Biol.* 26: 418-423.

Al-Musallam, A. A. 1988. Distribution of keratinolytic fungi in the desert soil of Kuwait. *Mycoses*, 32, 296-302.

Al-Musallam, A. A. 1990. Distribution of keratinolytic fungi in animal folds in Kuwait *Mycopathologia*, 79, 49-53.

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. 1997. „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Amerik, A., L. G. Chistyakova, N. I. Ostroumova, A. I. Gurevich, and V. K. Antonov. 1988. Cloning, expression and structure of the truncated functionally active lon gene of *Escherichia coli*. *Bioorg. Khim.* 14: 408-411.

- Ammerer, G., C. P. Hunter, J. H. Rothman, G. C. Saari, L. A. Valls, and T. M. Stevens.** 1986. PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2490-2497.
- Apodaca, G. & Mckerrow, J. H.** 1989. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect. Immun.*, 57, 3081-3090.
- Argos, P.** 1987. A sensitive procedure to compare amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* 193: 385-396.
- Asahi, M. R., Lindquist, K., Fukuyama, G., Apocarda, W. L., Epstein, W. L., & McKerrow, J. H.** 1985. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.*, 232, 139-144.
- Ashour, S. A., El-Shorah, H. M. & Ghanem, A. A.** 1992. Keratinolytic activity of thermophilic bacteria isolated from Egyptian soil. *J. Environ. Sci Mansoura University, Egypt.*, 4, 335-339.
- Atsumi, Y., S. Yamamoto, K. Morihara, J. Fukushima, H. Takeuchi, N. Mizuki, S. Kawamoto, and K. Okuda.** 1989. Cloning and expression of the alkaline proteinase gene from *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455. *J. Bacteriol.* 171: 5173-5175.
- Austew, B. M., and E. L. Smith.** 1976. Action of staphylococcal proteinase on peptides of varying chain length and composition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 411-417.
- Avakov, A. S., A. P. Bolotin, and S. V. Sorokin.** 1990. The structure of *Bacillus brevis* metalloprotease gene. *Mol. Biol.* 24: 1363-1372.
- Bahuguna, S. & Kushwaha, R. K. S.** 1989. Hair perforation by keratinolytic fungi. *Mycoses*, 32, 340-343.
- Baker, D. H., Blitenthal, R. C., Boebel, K. P., Czarnecki, G. L., Southern, L.L. & Willis, G.M.** 1981. Protein amino acid evaluation of steam-processed feather meal. *Poult. Sci.*, 60, 1865-1872.
- Baker, E. N., and J. Drenth.** 1987. Active sites of enzymes, p. 314. In F. A. Jornak, and A. McPherson (ed.), *Biological macromolecules and assemblies*, vol. 3. Active sites of enzymes. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

- Barett, A. J.** 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244: 1-15.
- Barett, A. J.** 1995. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248: 183.
- Baxter, M. & Mann, P. R.** 1969. Electron microscopic studies on the invasion of human hair in vitro by three keratinophilic fungi. *Sabouraudia*, 7, 33-37.
- Benedek, A., Szabo, I., Barabas, G., Czappan, M. & Szabo, G.** 1985. Digestion of chicken feather by keratinase enzyme(s) of an *Actinomyces* strain. In: *Biological Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Proceedings of the Sixth International Symposium on Actinomycete Biology, Debrecen, Hungary, 26-30 August, 1985*, ed G. Szabo, S. Biro & M. Goodfellow, Akademiai Kiado, Budapest, 1986.
- Berglund, P., M. R. Stabile, M. Gold, J. B. Jones, C. Mitchinson, R. R. Bolt, and T. P. Graycar.** 1996. Altering the specificity of subtilisin *B. lentus* by combining site-directed mutagenesis and chemical modification. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6: 2507-2512.
- Bierbaum, G., Karutz, M., Weuster-Botz, D. and Wandrey, C.** 1994. Production of protease with *Bacillus licheniformis* mutants insensitive to repression of exoenzyme biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 611-617.
- Binnie, C., L. Liao, E. Walczyk, and L. T. Malek.** 1996. Isolation and characterization of a gene encoding a chymotrypsin-like serine protease from *Streptomyces lividans* 66. *Can. J. Microbiol.* 42: 284-288.
- Blobel, G., and B. Dobberstein.** 1975. Transfer of proteins across membranes. *J. Cell Biol.* 67: 835-851.
- Bockle, B., Galunsky, B. & Muller, R.** 1995. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61. 3705-3710.
- Boguslawski, G., J. L. Shultz, and C. O. Yehle.** 1983. Purification and characterization of an extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. *Anal. Biochem.* 132: 41-49.
- Boyer, P. D.** 1971. *The enzymes*, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

- Brenner, S.** 1988. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334: 528-530.
- Browner, M. F., W. W. Smith, and A. L. Castelhana.** 1995. Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteinases. *Biochemistry* 34: 6601-6610.
- Brueckner, R., O. Shoseyov, and R. H. Doi.** 1990. Multiple active forms of a novel serine protease from *Bacillus subtilisin*. *Mol. Gen. Genet.* 221: 486-490.
- Bruinenberg, P. G., W. M. De Vos, and R. J. Siezen.** 1994. Prevention of C-terminal autoprocessing of *Lactococcus lactis* SK11 cell-envelope proteinase by engineering of an essential surface loop. *Biochem. J.* 302: 957-963.
- Cerny, G.** 1978. Studies on the aminopeptidase test for the distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5: 113-122.
- Chang, P. C., T.-C. Kuo, A. Tsugita, and Y.-H. W. Lee.** 1990. Extracellular metalloprotease gene of *Streptomyces cacaoi*: structure, nucleotide sequence and characterization of the cloned gene product. *Gene* 85: 87-95.
- Cheng, S.-W., Hu, H.-M., Shen, S.-W., Takagi, H., Asano, M. and Tsai, Y.-C.** (1995) Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2239-2243.
- Chin, D. T., S. A. Goff, T. Webster, T. Smith, and A. L. Goldberg.** 1988. Sequence of the lon gene in *Escherichia coli*. A heat-shock gene which encodes the ATP-dependent protease La. *J. Biol. Chem.* 263: 11718-11728.
- Chung, C. H., and A. L. Goldberg.** 1981. The product of the lon (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP dependent protease, protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4931-4935.
- Claus D., Berkeley R. C. W.** 1986. Genus *Bacillus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1105-1139.

- Cole, S. C. J., Charnley, A. K. and Cooper, R. M.** 1993. Purification and partial characterisation of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Lett. 113: 189-196.
- Dalev, P., Ivanov, I. & Liubomirova, A.** 1997. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. J. Sci. Food. Agric., 73, 242-244.
- Dancer, B. N., and J. Mandelstam.** 1975. Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 121: 406-410.
- Date, T., and W. Wickner.** 1981. Isolation of the *Escherichia coli* leader peptidase gene and effects of leader peptidase overproduction in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6106-6110.
- David, V. A., A. H. Deutch, A. Sloma, D. Pawlyk, A. Ally, and D. R. Durham.** 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. Gene 112: 107-112.
- Davidow, L. S., M. M. O'Donnell, F. S. Kaczmaerk, D. A. Pereira, J. R. DeZeeuw, and A. E. Franke.** 1987. Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. J. Bacteriol. 169: 4621-4629.
- De Marco, A. C., and A. J. Dick.** 1978. Aminopeptidase I activities in several microorganisms. Can. J. Biochem. 56: 66-71.
- De Vos, W. M.** 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. FEMS Microbiol. Rev. 46: 281-295.
- De Vos, W. M., P. Vos, H. deHaard, and I. Boerrigter.** 1989. Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Sk11 gene encoding an extracellular serine proteinase. Gene 85: 169-176.
- Deane, S. M., F. T. Robb, S. M. Robb, and D. R. Wood.** 1989. Nucleotide sequence of the *Vibrio anguolyticus* calcium-dependent, detergent-resistant alkaline serine exoprotease A. Gene 76: 281-288.

Desmukh, S. K. & Agrawal, S. C. 1982. In vitro degradation of human hair by some keratinophilic fungi. *Mykosen*, 25, 454-458.

Desmukh, S. K. & Agrawal, S. C. 1985. Degradation of human hair by some dermatophytes and other keratinophilic fungi *Mykosen*, 28, 463-466

Dozie, I. N. S., Okeke, C. N. & Unaeze, N. C. 1994. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Cryosporium keratinophilum*. *Wld. J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 563-567.

Ebeling, W. N., Hennrick, M., Klockow, H., Metz, H., Orth, D. & Lang, H. 1974. Proteinase K from *Titrirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem.*, 47, 91-97.

Eijsink, V. G. H., G. Vriend, B. vanden Burg, J. R. vander Zee, and G. Venema. 1992. Increasing the thermostability of a neutral protease by replacing positively charged amino acids in the N-terminal turn of α -helices. *Protein Eng.* 5: 165-170.

Eijsink, V. G. H., J. K. vander Zee, B. vanden Burg, G. Vriend, and G. Venema. 1991. Improving the thermostability of the neutral protease of *Bacillus stearothermophilus* by replacing a buried asparagine by leucine. *FEBS Lett.* 282: 13-16.

El-Shora, H. M., Ashour, S. A. & Ghanem, A. A. 1992. Growth and keratinolytic activity of selected *Bacillus spp.* in relation to the initial pH, molarity, different vitamins and trace elements. *Egypt. J. Appl. Sci.*, 7, 320-334.

El-Shora, H. M., Ashour, S. A. & Ghanem, A. A. 1993. Purification and characterization of keratinase from *B. circulans*, *B. licheniformis*, and *B. megaterium*. *J. Environ. Sci., Mansoura University Egypt.*, 6, 89-103.

Elmayergi, H. H. & Smith, R. E. 1971. Influence of growth of *Sreptomycetes fradiae* on pepsin-HCl digestibility and methionine content of feather meal. *Can. J. Microbiol.*, 17, 1067-1072.

El-Naghy M. A., El-Ktatny M. S., Fadi-Allah E. M., Nazeer W. W. 1998. Degradation of chicken feathers by *Chryso sporium georgiae*. *Mycopathol.* 143: 77-84.

- Epstein, D. M., and P. C. Wensink.** 1988. The α -lytic protease gene of *Lysobacter enzymogenes*. *J. Biol. Chem.* 263: 16586-16590.
- Estell, D. A., T. P. Gyaycar, J. V. Miller, D. B. Powers, J. P. Burnier, P. G. Ng, and J. A. Wells.** 1986. Probing steric and hydrophobic effects on enzyme substrate interactions by protein engineering. *Science* 233: 659-663.
- Evans, K. L., Crowder, J. and Miller, E.S.** 2000. Subtilisins of *Bacillus spp.* hydrolyze keratin and allow growth on feathers. *Can. J. Microbiol.* 46: 1004-1011.
- Everett, A. L., Gordon, T. C. & Windus, W.** 1962. Assay of proteolytic depilatory enzymes on keratin: action of metabisulphite. *Enzymologia*, 24, 14 -24.
- Fasasi, Y. A.** 1997. Studies on keratinophilic actinomycetes isolated from Kuwait soil. MSc Thesis, Department of Biological Sciences, Kuwait University.
- Ferrero, M. A., Castro, G.R., Abate, C. M., Baigori, M. D. and Sineriz, F.** 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45: 327-332.
- Figueras, M. J., Gurrado, J. & Zaror, L.** 1997. Ultrastructural aspects of hair digestion in black piedra infection. *J. Med. Vet. MvcoL*, 35, 1-6.
- Fishman, Y., J. Bricker, J. V. Gilbert, A. G. Plant, and A. Wright.** 1985. Cloning of the type 1 immunoglobulin A1 protease from *Neisseria gonorrhoeae* and secretion of the enzyme from *Escherichia coli*, p. 164-168. In G. K. Schoolnik (ed.), Proceedings of the Fourth International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Fox, J. W., J. D. Shannon, and J. B. Bjarnason.** 1991. Proteinases and their inhibitors in biotechnology. *Enzymes in biomass conversion. ACS Symp. Ser.* 460: 62-79.
- Fraser R. D. B.** 1969. Keratins. *Sci. Am.* 221: 87-97.
- Fujii, M., M. Takagi, T. Imanaka, and S. Aiba.** 1983. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 154: 831-837.

- Garcia-Kirchner, O., Bautista-Ramirez, M. E. and Segura-Granados, M.** 1998. Submerged culture screening of two strains of *Streptomyces* sp. with high keratinolytic activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 70: 277-284.
- Geisen, R.** 1993. Cloning of a protease gene from *Pseudomonas nalgiovensis* by expression in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16: 303-306.
- Gilbert, C., D. Atlan, B. Blane, R. Portalier, J. E. Germond, L. Lapierre, and B. Mollet.** 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 178: 3059-3065.
- Gilbert, J. V., A. G. Plant, Y. Fishman, and A. Wright.** 1988. Cloning of the gene encoding streptococcal immunoglobulin A1 protease and its expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56: 1961-1966.
- Gilles, A. M., J. M. Imhoff, and B. Keil.** 1979. α -Clostripain. Chemical characterization, activity and thiol content of the highly active form of clostripain. *J. Biol. Chem.* 254: 1462-1468.
- Goldberg, A. L., K. H. Shreedharaswamy, C. H. Chung, and F. S. Larimore.** 1983. Proteases of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 80: 680-702.
- Gradisar H., Kern S., Friedrich J.** 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 196-200.
- Gradisar, H., Kern, S. and Friedrich, J.** 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 196-200.
- Graham, L. D., K. D. Haggett, P. A. Jennings, D. S. Brocque, and R. G. Whittaker.** 1993. Random mutagenesis of the substrate binding site of a serine protease can generate enzymes with increased activities and altered primary specificities. *Biochemistry* 32: 6250-6258.
- Grappel, S. F. & Blank, F.** 1972. Role of keratinase in dermatophytes. *Dermatologica*, 145, 245-255.

- Grodberg, J., M. D. Lundrigan, D. L. Toledo, W. F. Mangel, and J. J. Dunn. 1988. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the omp T gene of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 16: 1209.
- Gunkel, P. A., and H. G. Gassen. 1989. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber: characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 179: 185-194.
- Gustin, J. K., E. Kessler, and D. E. Ohman. 1996. A substitution at His-120 in the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* blocks enzyme activity without affecting propeptide processing or extracellular secretion. *J. Bacteriol.* 178: 6608-6617.
- Guzzo, J., M. Murgier, A. Filloux, and A. Lazdunski. 1990. Cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease gene and secretion of the protease into the medium by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 942-948.
- Han J., Park C-H, Ruan R. 1995. Concentrating alkaline serine protease, subtilisin, using a temperature-sensitive hydrogel. *Biotechnol. Lett.* 17: 851-852.
- Hanel. H., Kalisch, J., Keil, M., Marsch, W. C. & Buslau, M. 1991. Quantification of keratinolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. *Med. Microbiol., Immun.*, 180, 45-51.
- Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29: 45-72.
- Hase, C. C., and R. A. Finkelstein. 1991. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease negative strain. *J. Bacteriol.* 173: 3311-3317.
- He, C., M. Xu, J. Jin, and D. Reu. 1988. Cloning and expression of an alkaline protease gene from *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis*. *Gongye Weishengwu* 18: 1-5.
- Henderson, G., P. Krygsman, C. J. Liu, C. C. Davey, and L. T. Malek. 1987. Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 169: 3778-3784.

Henner, D. J., M. Yang, L. Band, and J. A. Wells. 1985. Expression of cloned protease genes in *Bacillus subtilis*, p. 95-103. In Proceedings of the 9th International Spore Conference.

Hershko, A., E. Leshinsky, D. Ganoth, and H. Heller. 1984. ATP-dependent degradation of ubiquitin protein conjugates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1619-1623.

Higuchi, D., Takiuchi, J. & Negi, M. 1981. The effect of keratinase on human epidermis especially on stratum corneum Jpn. J. Dermatol., 91, 119-125.

Hirchsmann, D. J., Zametkin, J. M. & Rogers, R. E. 1994. The utilization of wool by four saprophytic microorganisms in the presence of added nutrients. Am. Dyestuff Rep., 33, 353-359.

Holmes, M. A., and B. W. Matthews. 1981. Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysine suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis. Biochemistry 20: 6912-6920.

Honjo, M., K. Manabe, H. Shimada, I. Mita, A. Nakayama, and Y. Furutani. 1984. Cloning and expression of the gene for neutral protease of *Bacillus amyloliquefaciens* in *Bacillus subtilis*. J. Biotechnol. 1: 265-77.

Hwang, D. H., J. C. Kim, J. H. Ko, M. J. Chun, and S. M. Byun. 1993. Molecular cloning and nucleotide sequence of the protease B gene from *Streptomyces griseus* ATCC 10137. Korean Biochem. J. 26: 383-390.

Ichihara, S., T. Suzuki, M. Suzuki, and S. Mizushima. 1989. Molecular cloning and sequencing of the sppA gene and characterization of the encoded protease IV, a signal peptide peptidase, of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 261: 9405-9411.

Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G. and Nedkov, P. 1999. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. Can. J. Microbiol., 45: 217-222.

Ikemura, H., H. Takagi, and M. Inouye. 1987. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 262: 7859-7864.

- Imanaka, T., M. Shibasaki, and M. Takagi.** 1986. A new way of enhancing the thermostability of proteases. *Nature* 324: 695-697.
- Ivanoff, L. A., T. Towatari, J. Ray, B. D. Korant, and S. R. Patteway, Jr.** 1986. Expression and site specific mutagenesis of the poliovirus 3C protease in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5392-5396.
- Jacobs, M., M. Eliasson, M. Uhlen, and J.-I. Flock.** 1985. Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Res.* 13: 8913-8926.
- Kakudo, S., N. Kikuchi, K. Kitadokoro, T. Fujiwara, E. Nakamura, H. Okamoto, M. Shin, M. Tamaki, H. Teraoka, H. Tsuzuki, and N. Yoshida.** 1992. Purification, characterization, cloning and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. *J. Biol. Chem.* 33: 23782-23788.
- Kalisz, M. H.** 1988. Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 36: 17-55.
- Kaneko, R., N. Koyama, Y.-C. Tsai, R.-Y. Juang, K. Yoda, and M. Yamasaki.** 1989. Molecular cloning of the structural gene for alkaline elastase YaB, a new subtilisin produced by an alkalophilic *Bacillus* strain. *J. Bacteriol.* 171: 5232-5236.
- Kapica, L. & Blank, F.** 1957, Growth of *Candida albicans* on keratin as a sole source of nitrogen. *Dermatologia (Mexico)*, 115, 81-105.
- Kapica, L. & Blank, F.** 1958. Growth of *Candida parapsilosis* on keratin as a sole source of nitrogen *Dermatologia (Mexican)*, 117, 433-454.
- Karnovsky, M. J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137 A.
- Kaul, S. and Sumbali, G.** 1999. Production of extracellular keratinases by keratinophilic fungal species inhabiting feathers of living poultry birds (*Gallus domesticus*): A comparison. *Mycopathologia*, 146: 19-24.
- Keil, B.** 1992. Specificity of proteolysis. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.

- Kikuchi, M., K. Nakahama, and K. Yoshimura.** July 1985. Molecular cloning of *Bacillus amyloliquefaciens* neutral proteinase gene in *Bacillus subtilis*. Japanese patent 60, 145, 090.
- Kim, M. H., s. K. Choi, B. T. Koo, B. S. Shin, C. B. Sohn, and J. Kim.** 1992. Cloning and expression of *Serratia marcescens* protease gene in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2: 231-236.
- Kitadokora, K., E. Nakamura, M. Tamaki, T. Horii, H. Okamoto, M. Shin, T. Sato, T. Fujiwara, H. Tsuzuki, N. Yoshida, and H. Teraoka.** 1993. Purification, characterization and molecular cloning of an acid amino acid-specific proteinase from *Streptomyces fradiae* ATCC 14544. *Biochim. Biophys. Acta* 1163: 149-157.
- Kitadokoro, K., Tsuzuki, H., Nakamura, E., Sato, T. & Teraoka, H.** 1994. Purification and charaterization, primary structure, crystallization and preliminary crystallographic study of a serine proteinase from *Streptomyces fradiac* ATCC 14544. *Eur.J. Biochem.*, 220, 55-61.
- Kiwaki, M., H. Ikemura, M. Shimizu-Kadoba, and A. Hirashima.** 1989. Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCDO 763. *Mol. Microbiol.* 3: 359-369.
- Koide, Y., A. Nakamura, T. Uozumi, and T. Beppu.** 1986. Cloning and sequencing of the major intracellular serine protease gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 167: 110-116.
- Kubo, M., and T. Imanaka.** 1988. Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1883-1891.
- Kubo, M., and Y. Higo.** 1989. Expression and genetic analysis of the highly thermostable neutral protease (aspartame synthetic enzyme) gene in *Bacillus subtilis*. *Toso Kenkyu Hokoku* 33: 101-112.
- Kunert, J. & Krajci, D.** 1981. An elctron microscopy study of keratin degradation by the fungus *Microsporium gypseum* in vitro. *Mykosen*, 24, 485-496.
- Kunert, J.** 1972. Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of sulphitolysis of the protein. *Experientia* , 28, 1025-1026.

- Kunert, J.** 1973. Keratin decomposition by dermatophytes: I. Sulfite production as a possible way of substrate denaturation. *Zeitschrift fuer Allgemeine Microbiologie Morphologie, Genetic und Oekologie der Microorganismen*, 13, 489-498.
- Kunert, J.** 1975. Formation of sulphate, sulfite and S-sulfocysteine by the fungus *Microsporium gypseum* during growth on cystine. *Folia Microbiologica*, 20, 142-151.
- Kunert, J.** 1976. Keratin decomposition by dermatophytes: II. Presence of S-sulfocysteine and cysteic acid in soluble decomposition product. *Zeitschrift fuer Allgemeine Microbiologie Morphologie, Genetic und Oekologie der Microorganismen*, 16, 97-105.
- Kunert, J.** 1985. Metabolism of sulphur containing amino acids in the dermatophyte *Microsporium gypseum*. I: Neutral amino acids. *J. Basic. Microbiol.*, 25, 31-37.
- Kunert, J.** 1985. Metabolism of sulphur containing amino acids in the dermatophyte *Microsporium gypseum*. II: Acidic amino acids derivatives. *J. Basic. Microbiol.*, 25, 111-118.
- Kunert, J.** 1987. Utilization of various concentrations of free cystine by fungus *Microsporium gypseum*. *J. Basic. Microbiol.*, 27, 207-213.
- Kunert, J.** 1988. Thiosulfate production from cystine by the keratinolytic prokaryote *Streptomyces fradiae*. *Arch. of Microbiol.*, 150, 600-601.
- Kunert, J.** 1989. Biochemical mechanisms of keratin degradation by actinomycete *Streptomyces fradiae* and fungus *Microsporium gypseum*, a comparison. *J. Basic Microbiol.*, 29, 597-604.
- Kunert, J.** 1992. Effects of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*. *Mycoses*, 35, 343-348.
- Kwon, S. T., H. Matsuzawa, and T. Ohta.** 1988. Determination of the positions of the disulfide bonds in aqualysin I (a thermophilic alkaline serine protease) of *Thermus aquaticus* YT-1. *J. Biochem.* 104: 557-559.
- Kwon, S. T., I. Terada, H. Matsuzawa, and T. Ohta.** 1988. Nucleotide sequence of the gene for aqualysin I (a thermophilic alkaline serine protease) of *Thermus aquaticus* YT-1

and characteristics of the deduced primary structure of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 173: 491-497.

Lamkin, I., Hamilton, A. J. & Hay, R. J. 1996. Purification and characterisation of a novel 34,000-Mr cell-associated proteinase from the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 13, 131-140.

Latshaw, J. D., Musharaf, N. & Retrum, R. 1994. Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 47, 179-188.

Law, J., P. Vos, F. Hayes, C. Daly, W. de Vos, and G. Fitzgerald. 1992. Cloning and partial sequencing of the proteinase gene complex from *Lactococcus lactis subsp. lactis* UC317. *J. Gen. Microbiol.* 138: 709-718.

Lecadet, M. M., M. Lescourret, and A. Klier. 1977. Characterization of an intracellular protease isolated from *Bacillus thuringiensis* sporulating cells and able to modify homologous RNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* 79: 329-338.

Lee, C., S. Su, and R. Liaw. 1995. Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* 141: 2569-2576.

Lee, G. G., Ferket, P. R. & Shih, J. C. H. 1991. Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. *FASEB J.*, 59, 1312

Lee, S., K. Yoon, H. Nam, T. Oh, S. Lee, and K. Chae. 1996. Cloning and molecular characterization of a nprx gene of *B. subtilis* N515-4 encoding a neutral protease. *J. Microbiol.* 34: 63-73.

Leenhouts, K. J., J. Gietema, J. Kok, and G. Venema. 1991. Chromosomal stabilization of the proteinase genes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2568-2575.

Li, S. L., S. Norioka, and F. Sakiyama. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of the B-lytic protease gene from *Achromobacter lyticus*. *J. Bacteriol.* 172: 6506-6511.

Lichenstein, H. January 1993. Isolation and characterization of a novel protease from *Streptomyces lividans*. U.S. patent 724: 721.

- Lin X., Inglis G. D., Yanke L. J., Cheng K. J.** 1999. Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 23: 149-153.
- Lin, X., Kelemen, D. W., Miller, E. S. & Shih, J. C. H.** 1995. Nucleotide sequence and expression of ker A, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1469-1474.
- Lin, X., Lee, C., Casale, E. S. & Shih, J. C. H.** 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3271- 3275.
- Lin, X., Shih, J. C. H. & Swaisgood, H. E.** 1996. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4273-4275.
- Lin, X., Wong, S.-L., Miller, E. S. and Shih, J. C. H.** 1997. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis*. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 134-138.
- Lindberg, R. A., L. D. Eirich, J. S. Price, L. Wolfenbarger, Jr., and H. Drucker.** 1981. Alkaline protease from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 256: 811-814.
- Liu, P. C., Lee, K. K., Tu, C. C. and Chen, S. N.** 1997. Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.* 35: 32-39.
- Liu, P. V.** 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 130: 94-99.
- Liu, Y.-N., J.-L. Tang, B. R. Clark, J. M. Dow, and M. J. Danniels.** 1990. A multipurpose broad host range cloning vector and its use to characterize an extracellular protease gene of *Xanthomonas campestris* pathovar. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 220: 433-440.
- Malviya, H. K., Rajak, R. C & Hasija, S. K.** 1992. Synthesis and regulation of extracellular keratinase in three fungi isolated from the grounds of a gelatin factory, Jabalpur, India *Mycopathologia*, 120, 1-4.

Malviya, H. K., Rajak, R. C. & Hasija, S. K. 1993. In vitro degradation of hair keratin by *Graphium penicillodeus*: evidences for sulfitolysis and peptidolysis. *Crypt. Bot.*, 3, 197-201.

Malviya, H. K., Tiwari, S., Rajak, R. C. & Hasija, S. K. 1993. Keratinolysis by four fungi isolated from the soil and effluent of a gelatin factory at Jabalpur (M.P.). *Crypt. Bot.*, 3, 108-116.

Manabe, K., Morh, M. Honjo, M. Ohoka, K. Fushimi, A. Sawakura, and Y. Furutani. 1985. N-terminal amino acid sequences of neutral proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*: identification of a neutral protease gene cloned in *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* 49: 2261-2267.

Manachini P. L., Fortina M. G. 1998. Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 20: 565-568.

Masaki, T., K. Nakamura, M. Isono, and M. Soejima. 1978. A new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M497-1. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1443-1445.

Maurizi, M. R., P. Trisler, and S. Gottesman. 1985. Insertional mutagenesis of the lon gene in *Escherichia coli*: lon is dispensable. *J. Bacteriol.* 164: 1124-1135.

Maurizi, M. R., W. P. Clark, Y. Katayama, S. Rudikoff, J. Pumphrey, B. Bowers, and S. Gottesman. 1990. Sequences and structure of ClpP, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265: 12536-12544.

Mercer, E. H. & Verma, B. S. 1963. Hair digested by by *Trichophyton mentagrophytes* An electron microscope examination.. *Arch. Dermatol (Chicago)*, 87, 357-360.

Mohammed EI-Akied, Z.M. 1987. Microbial production of amino acids and proteins by thermophilic actinomycetes as a biodegradation of chicken feather. M.Sc. Thesis, Zagazig University, Egypt.

Molyneaux, G. S. 1959. The digestion of wool by a keratinolytic *Bacillus*. *Aust. J. Oiol. Sci.*, 12: 274-278.

Morihara, K. & Oda, K. 1992. Microbial degradation of proteins. In *Microbial degradation of natural products*, ed. G. Winkelmann. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. pp. 293-364.

Morihara, K., and K. Oda. 1993. Microbial degradation of proteins, p. 293-364. In W. Guenther (ed.), *Microbial degradation of natural products*. VCH Publishers, Weinheim, Germany.

Morihara, K., Tatsushi, O, & Tsuzuki, H. 1967. Multiple proteolytic enzymes of *Streptomyces fradiae*. Production, isolation, and preliminary characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 382-397.

Morita, S., M. Kuriyama, M. Nakatsu, and K. Kitano. 1994. High level expression of Fusarium alkaline protease gene in *Acremonium chrysogenum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 627-630.

Moses, E. K., J. I. Rood, W. K. Yong, and G. G. Riffkin. 1989. Molecular analysis of one of multiple protease-encoding genes from the prototype virulent strain of *Bacteroides nodosus*. *Gene* 77: 219-228.

Mukhopadhyay, R. P. & Chandra, A. L. 1990. Keratinase of a *Streptomyces*. *Indian. J. Exp. Biol.*, 28, 575-577.

Nagami, Y., and T. Tanaka. December 1986. Expression plasmid of *Bacillus natto* protease. Japanese patent 61, 282, 400.

Naguib, M. I., Mohammed, N. K. & Yassin, A. F. 1984. Studies on *Actinomycetes* of Egyptian soils: Effect of continuous incubation on keratin hydrolysis with reference to peptide formation. *Egypt. J. Bot.*, 22, 57-72.

Nakanishi, T. & Yamamoto, T. 1974. Action and specificity of a *Streptomyces alkalophilic* proteinase. *Agric. Biol. Chem.*, 35, 2391-2397.

Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224: 350-357.

Nishiya, Y., and T. Imanaka. 1990. Cloning and nucleotide sequences of the *Bacillus stearothermophilus* neutral protease gene and its transcriptional activator gene. *J. Bacteriol.* 172: 4861-4869.

- Nissen-Meyer, J., D. Lillehaug, and I. F. Nes.** 1992. The plasmid-encoded lactococcal envelope-associated proteinase is encoded by a chromosomal gene in *Lactococcus lactis* subsp. cremoris BC101. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 750-753.
- Noval J. J. & Nickerson, W. J.** 1959. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.*, 77, 251-259.
- Noval, J. and Nickerson, W. J.** 1959 Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.*, 77: 73-86.
- Oh, K. H., Seong, C. S., Lee, S. W., Kwon, O. S. and Park, Y. S.** 1999. Isolation of a psychrotrophic *Azospirillum sp.* and characterization of its extracellular protease. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 173-178.
- Okada, J., H. Shimogaki, K. Murata, H. Kimura, and K. Oba.** January 1986. Genetically engineered *Bacillus subtilis* for extracellular protease manufacture. Japanese patent 61, 12, 287.
- Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Mussallam, A. A. and Al-Zarbam, S.** 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Biores. Technol.*, 66: 1-11.
- Pantoliano, M. W., R. C. Ladner, P. N. Bryan, M. L. Rollence, J. F. Wood, and T. L. Poulos.** 1987. Protein engineering of subtilisin BPN': enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond. *Biochemistry* 26: 2077-2082.
- Papadopoulos, M. C.** 1985. Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A review. *Agricultural Wastes*, 14: 275-290.
- Papadopoulos, M. C., El Boushy, A. R. and Roodbeen, A. E.** 1985. The effect of varying autoclaving conditions and added sodium hydroxide on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal. *J. Sci. Food Agric. Abstr.*, 36: 1219-1226.
- Papadopoulos, M. C., El-Boushy, A. R. & Ketelaars, E. H.** 1985. Effect of different processing condions on amino acid digestibility of feather meal determined by chick assay. *Poult. Sci.*, 64, 1729-1741.

- Papadopoulos, M.C., El Boushy, A. R., Roodbeen, A. E. and Ketelaars, E.H.** 1986. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meat. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 14: 279-290.
- Papadopoulos, M. C.** 1989. Effect of processing on high protein feedstuffs: A review *Biol. Wastes*, 29, 123-138.
- Perlmann, G. E., and L. Lorand.** 1970. Proteolytic enzymes. *Methods Enzymol.* 19: 732-735.
- Pickersgill, R. W., I. G. Sumner, and P. W. Goodenough.** 1990. Preliminary crystallographic data for protease a. *Eur. J. Biochem.* 190: 443-444.
- Poldermans, B.** 1990. Proteolytic enzymes, p. 108-123. In W. Gerhartz (ed.), *Proteolytic enzymes in industry: production and applications*. VCH Publishers, Weinheim, Germany.
- Porro, A. M., Yushioka; M. C. N., Kaminski, S. K., Palmeira, M. C. A., Fischman, O. & Alchorne, M. A. M.** 1997. Disseminated dermatophytosis caused by *Microsporium gypsum* in two patients infected with the acquired immune deficiency syndrome. *Mycopathologia*, 137, 9-12.
- Postemsky, C. J., S. S. Dignam, and P. Setlow.** 1978. Isolation and characterization of *Bacillus megaterium* mutants containing decreased levels of spore protease. *J. Bacteriol.* 135: 841-850.
- Poulsen, K., J. Reinholdt, and M. Kilian.** 1996. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* immunoglobulin A1 protease gene (iga) and its translation product. *Infect. Immun.* 64: 3957-3966.
- Rajak, R. C., Parwekar, S., Malviya, H. & Nasija, S. K.** 1991. Kertin degradation by fungi isolated from the grounds of a gelatin factory in Jabalpur (India). *Mycopathologia*, 114, 83-87.
- Rao, M. B., and V. V. Deshpande.** Proteases and their applications in biotechnology. In A. Varna (ed.), *Microbes: for health, wealth and sustainable environment*, in press. Malhotra Publishing House, New Delhi, India.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635.

Raubitshek, F. 1961. Mechanical versus chemical keratinolysis by dermatophytes. *Sabouraudia*, 1, 87-90.

Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290: 205-218.

Rivero, O., J. Anguita, C. Paniagua, and G. Naharro. 1990. Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 172: 3905-3908.

Rivero, O., J. Anguita, D. Mateos, C. Paniagua, and G. Naharro. 1991. Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 81: 1-8.

Rougeau, C. T., M. W. Lauvel, and H. Fukuhara. 1988. The *Kluyveromyces lactis* KEX1 gene encodes a subtilisin-type serine protease. *FEBS Lett.* 234: 464-470.

Ruffin, P., Andrieu, S. & Biserte, G. 1976. Sulphytolysis in keratinolysis. Biochemical proof. *Sabouraudia*, 14, 181-184.

Safranek, W. W. & Goos, R. D. 1982. Degradation of wool by saprophytic fungi. *Can. J. Microbiol.*, 28, 137-140.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sangali, S. and Brandelli, A. 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 735-743.

Santos, R. M. D. B., Firmino, A. A. P., de Sa, C. M. & Felix, C. R. 1996. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Curr. Microbiol.*, 33, 364-370.

Saul, D. J., L. C. Williams, H. S. Toogood, R. M. Daniel, and P. L. Bergquist. 1996. Sequence of the gene encoding a highly thermostable neutral proteinase from *Bacillus* sp. strain EA1: expression in *Escherichia coli* and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1308: 74-80.

- Schmidt, B. F., L. Woodhouse, R. M. Adams, T. Ward, S. E. Mainzer, and P. J. Lad. 1995. Alkalophilic *Bacillus* sp. strain LG12 has a series of serine protease genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4490-4493.
- Sen Gupta, S. R., Nigam, S. S. and Tandan, R. N. 1950. A new wool degrading fungus *Ctenomyces* species. *Text. Res. J.*, 20: 671-675.
- Shibano, Y., K. Morihara, K. Okuda, and A. Fukushima. December 1991. Molecular cloning of alkaline protease gene of *Pseudomonas aeruginosa*. Japanese patent 03, 277, 278.
- Sidorenkov, I. N., E. A. Nosovskaya, and S. V. Kostrov. 1995. Cloning and expression of *Bacillus stearothermophilus*-thermostable metallo-protease gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Biol.* 29: 507-511.
- Silen, J. L., D. Frank, A. Fujishige, R. Bone, and D. A. Agard. 1989. Analysis of preprolytic proteases expression in *Escherichia coli* reveals that the proregion is required for activity. *J. Bacteriol.* 171: 1320-1325.
- Simpanya, M. F. & Baxter, M. 1996. Isolation of fungi from soil using keratin baiting technique. *Mycopathologia*, 136, 85-89.
- Singh, C. T. 1997. Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. *Mycopathologia*, 137, 13-16.
- Sinha, U. S., Wolz, A. & Pushkaraj, J. L. 1991. Two new extracellular serine proteinases from *Streptomyces fradiae*. *Int. J. Biochem.*, 23, 979-984.
- Sloma, A., A. Ally, D. Ally, and J. Pero. 1988. Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170: 5557-5563.
- Sloma, A., C. F. Rudolph, G. A. Rufo Jr, B. J. Sullivan, K. A. Theriault, D. Ally, and J. Pero. 1990. Gene encoding a novel extracellular metalloprotease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172: 1024-1029.
- Sloma, A., G. A. Rufo, Jr., C. F. Rudolph, B. J. Sullivan, K. A. Theriault, and J. Pero. 1990. Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: purification of the protein and cloning of the gene. *J. Bacteriol.* 172: 1470-1477.

- Sobek, H., H. J. Hecht, B. Hoffman, W. Aeble, and D. Schomburg.** 1990. Crystal structure of an alkaline protease from *Bacillus alkalophilus* at 2.4 Å resolution. *FEBS Lett.* 274: 57-66.
- Sohair, A. M. & Assem, M. H.** 1974. Biological and biochemical studies on thermophilic actinomycete isolated from Egyptian soil. *Zentralbl. Bakteriologie, Abt. II*, 129, 591-599.
- Stahl, M. L., and E. Ferrari.** 1984. Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an in vitro-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* 158: 411-418.
- Steiner, R. J., Kellems, R. O. and Church, D. C.** 1983. Feather and hair meals for ruminants. IV. Effects of chemical treatments of feather and processing time on digestibility. *J. Anim. Sci.*, 57: 495-502.
- Stilborn, H. L., Moran, E. T., Gous, R. M. & Harrison, M. D.** 1997. Effect of age on feather amino acid content in two broiler strain crosses and sexes. *J. Appl. Poultry Res.*, 6, 205-209.
- Stoll, E., H. G. Weder, and H. Zuber.** 1976. Aminopeptidase II from *Bacillus sterothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* 438: 212-220.
- Strausberg, S. L., P. A. Alexander, D. T. Gallagher, G. L. Gilliland, B. L. Barnett, and P. B. Bryan.** 1995. Directed evolution of a subtilisin with calcium-independent stability. *Bio/Technology* 13: 669-673.
- Sussman, M. D., and P. Setlow.** 1991. Cloning, nucleotide sequence and regulation of the *Bacillus subtilis* gpr gene, which codes for the protease that initiates degradation of small, acid-soluble proteins during spore germination. *J. Bacteriol.* 173: 291-300.
- Suzuki, C. K., M. Rep, J. M. Van Dijk, K. Suda, L. A. Grivell, and G. Schatz.** 1997. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 22: 118-123.
- Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 625-630.

- Suzuki, T., A. Itoh, S. Ichihara, and S. Mizushima.** 1987. Characterization of the *sppA* gene coding for protease IV, a signal peptide peptidase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 2523-2528.
- Takagi, H., T. Morinaga, H. Ikemura, and M. Inouye.** 1989. The role of pro-239 in the catalysis and heat stability of subtilisin E. *Eur. J. Biochem.* 105: 953-956.
- Takagi, H., T. Takahashi, H. Momose, M. Inouye, Y. Maeda, H. Matsuzawa, and T. Ohta.** 1990. Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease. *J. Biol. Chem.* 265: 6874-6878.
- Takagi, H., Y. Morinaga, H. Ikemura, and M. Inouye.** 1988. Mutant subtilisin E with enhanced protease activity obtained by site directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 263: 19592-19596.
- Takagi, M., T. Imanaka, and S. Aiba.** 1985. Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 163: 824-831.
- Takami, H., Nakamura, F., Aono, R. & Horishiri, K.** 1992. Degradation of human hair by a thermostable alkaline proteinase from alcalophilic *Bacillus sp.* no. AH 101. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1667-1669,
- Takiuchi, I., Sci, Y., Tagagi, H. & Negi, M.** 1984. Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporium canis*. *Sabouraudia*, 22, 219-224.
- Tawara, T., S. Nanba, and J. Nagai.** April 1989. Alkaline proteinase, its cloning and recombinant manufacture with *Bacillus*. Japanese patent 01, 101, 886.
- Tobe, S., M. Odera, and Y. Asai.** July 1992. Cloning and expression of gene for alkaline protease Ya of *Bacillus*. Japanese patent 04, 197, 182.
- Toma, S., M. Delbue, A. Pirola, and G. Grandi.** 1986. *nprR1* and *nprR2* regulatory regions for neutral protease expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 167: 740-743.
- Tran, L., X. Wu, and S. Wong.** 1991. Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173: 6364-6372.

- Tsujibo, H., K. Miyamoto, K. Tanaka, M. Kawai, T. Tainaka, C. Imada, Y. Okami, and Y. Inamori.** 1993. Cloning and sequence of an alkaline serine protease-encoding gene from the marine bacterium *Alteromonas sp.* strain O-7. *Gene* 136: 247-251.
- Tsujibo, H., K. Miyamoto, K. Tanaka, Y. Kaidzu, C. Imada, Y. Okami, and Y. Inamori.** 1996. Cloning and sequence analysis of a protease encoding gene from the marine bacterium *Alteromonas sp.* strain O-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 1284-1288.
- Ulfig, K. & Korcz, M.** 1983. Isolation of keratinolytic fungi from sewage sludge. *Sabouraudia*, 21, 247-250.
- Ulfig, K. & Korcz, M.** 1994. Keratinolytic fungi in sewage applied to devastated urban soil. A preliminary experiment. *Inter. J. Environ. Hlth. Res.*, 4, 244-253.
- Ulfig, K. & Ulfig, A.** 1990. Keratinolytic fungi in bottom sediment of surface waters. *J. Med. Vet. Mycol.*, 28, 419-422.
- Ulfig, K.** 1991. Keratinolytic fungi in waste water sediments. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 42, 309-315.
- Ulfig, K.** 1992. Selected group of geophilic fungi in sediments of Catalonian waters as microorganisms of ecological and public health significance. Madrid Ministerio de education yCiencia.
- Ulfig, K., T'erakowski, M., Plaza, Ci. & Kosarewicz, O.** 1996. Keratinolytic fungi in sewage sludge. *Mycopathologia*, 136, 41-46.
- Van der Laan, J. C., G. Gerritse, L. Mulleners, R. Van der Hoek, and W. J. Quax.** 1991. Cloning, characterization and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 901-909.
- Van Melderren, L., M. Thi, P. Leechi, S. Gottesman, M. Couturier, and M. L. Maurizi.** 1996. ATP-dependent degradation of Ccd A by Lon protease. *J. Biol. Chem.* 271: 27730-27738.
- Vasantha, N., L. D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle, and D. Filpula.** 1984. Genes for alkaline protease and neutral protease from *Bacillus amyloliquefaciens* contain a

large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *J. Bacteriol.* 159: 811-819.

Wandersman, C., P. Delepelaire, S. Letoffe, and M. Schwartz. 1987. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 5046-5053.

Wang, X. & Parsons, C. M. 1997, Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals. *Poult. Sci.*, 76, 491-496.

Ward, O. P. 1983. Proteinases, p. 251-305. In W. M. Fogarty (ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publishers, London, England.

Watson, R. R. 1976. Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. *Methods Microbiol.* 9: 1-14.

Wawrzekiewicz, K., Lobarzewski, J. & Wolski, T. 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinge*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 25, 261-268.

Wawrzekiewicz, K., Wolski, T. & Lobarzewski, J. 1991. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia*, 114, 1-8.

Weisburg, W. G., Barns, M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697-984.

Wells, J. A., and D. B. Powers. 1986. In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin. *J. Biol. Chem.* 261: 6564-6570.

Wells, J. M., E. Ferrari, D. J. Henner, D. A. Estell, and E. Y. Chen. 1983. Cloning, sequencing and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 11: 7911-7925.

Williams, C. M. & Shih, J. C. H. 1989. Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 25-35.

Williams, C. M., Richester, C. S, Mackenzi, J. M. & Shih, J. C. H. 1990. Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1509-1515.

- Xu, F.-F., L. E. Pearce, and P.-L. Yu.** 1990. Molecular cloning and expression of a proteinase gene from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris H2 and construction of a new lactococcal vector pFX1. *Arch. Microbiol.* 154: 99-104.
- Yamagata, Y., and E. Ichishima.** 1995. A new alkaline serine protease from alkalophilic *Bacillus* sp.: cloning, sequencing and characterization of an intracellular protease. *Curr. Microbiol.* 30: 357-366.
- Yamagata, Y., R. Abe, Y. Fujita, and E. Ichishima.** 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the 90K serine protease gene, hsp K, from *Bacillus subtilis* (natto) no. 16. *Curr. Microbiol.* 31: 340-344.
- Yang, M. Y., E. Ferrari, and D. J. Henner.** 1984. Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an in vitro-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* 160: 15-21.
- Yang, Q., X. Jiang, L. Wu, Y. Cui, and S. Yang.** 1991. Cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis*. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 7: 207-212.
- Yang, S., C. Jin, D. Bao, and S. Zhang.** 1996. Cloning and expression of thermostable protease gene from *Bacillus stearothermophilus* HY-69 in *Bacillus subtilis*. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 782: 219-225.
- Yoshimoto, T., H. Oyama, T. Takeshita, H. Higashi, S. L. Xu, and D. Tsuru.** 1990. Nucleotide sequence of the neutral protease gene from *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *J. Ferment. Bioeng.* 70: 370-375.
- Yoshimoto, T., R. Walter, and D. Tsuru.** 1980. Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*: purification and properties. *J. Biol. Chem.* 225: 4786-4792.
- Yoshimura, K., T. Miyazaki, K. Nakahama, and M. Kikuchi.** 1985. Cloning and partial nucleotide sequence of a neutral protease gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Takeda Kenkyusho Ho* 44: 42-50.
- Yu, R. J., Harmon, S. R. & Blan, F.** 1968. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Bacteriol.* 96, 1435-1436.

Yu, R. J., Harmon, S. R. & Blank, F. 1969. Hair digestion by keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. J. Invest. Dermatol., 53, 166-171.

Yu, R. J., Harmon, S. R., Grappel, S. F. & Blank, F. 1971. Two cell bound keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. J. Inves. Dermatol., 56, 27-32.

Zehnbaauer, B. A., and A. Markovitz. 1980. Cloning of gene lon (CapR) in *Escherichia coli* K-12 and identification of polypeptide specified by the cloned deoxyribonucleic acid fragment. J. Bacteriol. 143: 852-863.

Ziegler, H., Bohme, H. & Reichmann, G. 1969, Stoffwecheslphysiologische Untersuchungen uber den Abbau von Proteinen durch *Microsporium gypseum* und *M. canis*. Dermatol. Mschr., 155, 835-856.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a tudományos munkámhoz nyújtott segítséget:

az SZTE Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének Dr. Kevei Ferencnek, hogy tanszékén lehetőséget biztosított a tudományos munkám elvégzéséhez. Két témavezetőmnek Dr. Manczinger Lászlónak, a baktérium élettan és enzim biokémia területén és Dr. Vágvölgyi Csabának a molekuláris biológiai témakörökben nyújtott alapos segítségét.

Rozsman Kft.-nek a kísérleteimhez szükséges anyagi források biztosítását, és a cég keretein belül folytatott kísérleti munkák feltételeink biztosítását.

a Bolognai Tudomány Egyetem Ipari Kémiai Tanszékéről Dr. Antonio Vara González y Rodríguez-nek a baktérium fiziológia és fermentációs technológiák elsajátításában a szakmai irányítását. Dr. Alehjandro Hoechkopplernek az enzim kutatás területén nyújtott segítségét.

Gyógyszer Biotechnológiai Tanszékéről Prof. Matteuchi-nak a kísérletem elvégzéséhez szükséges vegyszerek, műszerek és laborhátér biztosítását.

Dr. Rojik Imrének az elektronmikroszkópos, Nagy Lajos Gergelynek a fénymikroszkópos képek elkészítését.

Köszönettel tartozom mindazoknak, akik tanácsokkal, vagy egyéb módon hozzájárultak ennek a dolgozatnak a megszületéséhez.

Hálával tartozom szüleimnek és Pék Józsefnek a tudományos munka ideje alatti támogatásukért.