



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jerneja HARMEL

**PROIZVODNJA IN UPORABA MIKROBNIH
KERATINAZ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jerneja HARMEL

PROIZVODNJA IN UPORABA MIKROBNIH KERATINAZ

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

PRODUCTION AND USE OF MICROBIAL KERATINASES

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predstavitve: 13.9.2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 602.3: 579.26: 577.15 (043.2)
- KG biotehnologija/keratin/mikrobne keratinaze/biotehnoška proizvodnja/uporaba keratinaz
- AV HARMEL, Jerneja
- SA MARINŠEK LOGAR, Romana
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2017
- IN PROIZVODNJA IN UPORABA MIKROBNIH KERATINAZ
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 20 str., 1 pregl., 5 sl., 57 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Keratinaze so proteaze, ki med drugim razgrajujejo tudi na razgradnjo zelo odporne keratinske substrate. Večina jih spada v skupino ekstracelularnih serinskih proteaz ali metaloproteaz. Proizvajajo jih številne glive in bakterije, kjer prevladujeta predvsem *Bacillus subtilis* in *Bacillus licheniformis*, pogosto so izolirane tudi iz aktinomicet. Postopki biotehnoške proizvodnje se razlikujejo glede na vrsto mikroorganizma. Večinoma je v uporabi submerzna kultura, s keratinskim substratom kot glavnim virom ogljika in dušika. Pogosto se za optimizacijo proizvodnje dodajajo različni viri ogljika in dušika, ter kovinski ioni, ki delujejo stimulatивно. Večina keratinaz je alkalnih ali nevtralnih proteaz, z temperaturnim optimumom med 40-70°C. Izolirani so bili številni sevi z široko pH in termostabilnostjo, zaradi česar so zanimive za uporabo v številnih industrijskih aplikacijah. V zadnjih letih se odkrivajo vedno nove možnosti njihove uporabe. Veliko zanimanje je za uporabo na področju razgradnje odpadkov agroživilske in usnjarske industrije, proizvodnjo bioplina, razgradnjo prionov, obdelavo tekstila, dostavo zdravil, v kozmetiki,... Biotehnoški postopki, kjer so v uporabi mikrobne keratinaze lahko tako na več načinov pripomorejo k manjši obremenitvi okolja z organskimi odpadki in proizvodnji recikliranih produktov z dodano vrednostjo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 602.3: 579.26: 577.15 (043.2)
- CX biotechnology/keratin/microbial keratinases/biotechnological production
- AU HARMEL, Jerneja
- SA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2017
- TI PRODUCTION AND USE OF MICROBIAL KERATINASES
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 20 p., 1 tab., 5 fig., 57 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Keratinases are proteases that, among other molecules, degrade robust keratin substrates. Most of them belong to extracellular serine proteases or metalloproteases. A number of fungi and bacteria produces them. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* are two of the most investigated producers, but they are also often isolated from actinomycetes. Methods of biotechnological production are different for every microorganism. Submerged cultivation is most frequently used, with a keratin substrate as the main source of carbon and nitrogen. Often, various sources of carbon, nitrogen and metal ions that act stimulative are added to the medium for optimization of production. Most keratinases are alkaline or neutral proteases, with a temperature optimum between 40-70°C. Many strains with a wide pH and thermostability range were isolated, which makes them applicable in many industries. In recent years, new possibilities for their use have been discovered. There is a great interest in their use in the field of degradation of waste from the agricultural and leather industry, biogas production, prion degradation, textile processing, medicines delivery, cosmetics, ... Biotechnological procedures using microbial keratinases can in many ways contribute to reduced organic waste accumulation in the environment and the production of recycled products with added value.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
2 MIKROBNE KERATINAZE	2
2.1 LASTNOSTI MIKROBNIH KERATINAZ	2
2.2 MEHANIZEM DELOVANJA MIKROBNIH KERATINAZ	2
2.2.1 Sulfitoliza	3
2.2.2 Proteoliza - mehanizem delovanja serinskih proteaz	3
3 MIKROORGANIZMI	4
3.1 EVKARIONTI	4
3.2 BAKTERIJE	4
4 BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA KERATINAZ	5
4.1 INDUKCIJA SINTEZE KERATINAZ	5
4.2 VIRI OGLJIK A IN DUŠIKA ZA PROIZVODNJO KERATINAZ	5
4.3 STRATEGIJE PROIZVODNJE KERATINAZ	5
4.4 TEMPERATURA IN pH PROIZVODNJE KERATINAZ	6
4.5 STIMULANTI PROIZVODNJE MIKROBNIH KERATINAZ	6
4.6 HETEROLOGNO IZRAŽANJE MIKROBNIH KERATINAZ	6
4.7 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE KERATINAZ	7
5 ANAEROBNA PROIZVODNJA MIKROBNIH KERATINAZ	8
5.1 MEZOFILNI ANAEROBNI MIKROORGANIZMI	8
5.1.1 <i>Alcaligenes sp.</i>	8
5.1.2 <i>Bacillus megaterium</i>	8
5.2 TERMOFILNI ANAEROBNI MIKROORGANIZMI	9
5.2.1 <i>Keratinibaculum paraultunense</i>	9
5.2.2 <i>Thermoanaerobacter keratinophilus</i>	9
6 UPORABA KERATINAZ	10
6.1 PROCESIRANJE AGROINDUSTRIJSKIH ODPADKOV	10
6.2 RAZGRADNJA PRIONOV	11
6.3 USNJARSKA INDUSTRIJA	11
6.4 GNOJILA	11
6.5 RAZGRADNJA MIKROBNIH BIOFILMOV	12
6.6 BIOGORIVA	12
6.7 OSTALO	12
7 OKOLJSKI VIDIK	13
7.1 PROBLEMATIKA ODPADKOV AGROŽIVILSKE INDUSTRIJE	13
7.2 KAJ PA PROCESIRANJE USNJA?	14
8 ZAKLJUČEK	15
9 VIRI	16

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prednosti in slabosti najpogostejših metod izolacije keratinaz (Brandelli in sod., 2015).....	7
--	---

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura α - (The University of Arizona, 2003) in β -keratina (McMurry, 2003)	1
Slika 2: Razgradnja perja z <i>B. megaterium</i> po: (A) 0 , (B) 2, (C) 3, (D) 4 dnevih (Park, 2009).	10
Slika 3: Odlagališče perutninskih odpadkov (Payne, 2017)	13
Slika 4: Delovanje keratinaze na kozjem, ovčjem in kravjem kožuhu (Bouacem, 2015)	14
Slika 5: 3D struktura keratinaze <i>B. licheniformis</i> PWD-1 (Versazyme, 2017).....	15

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

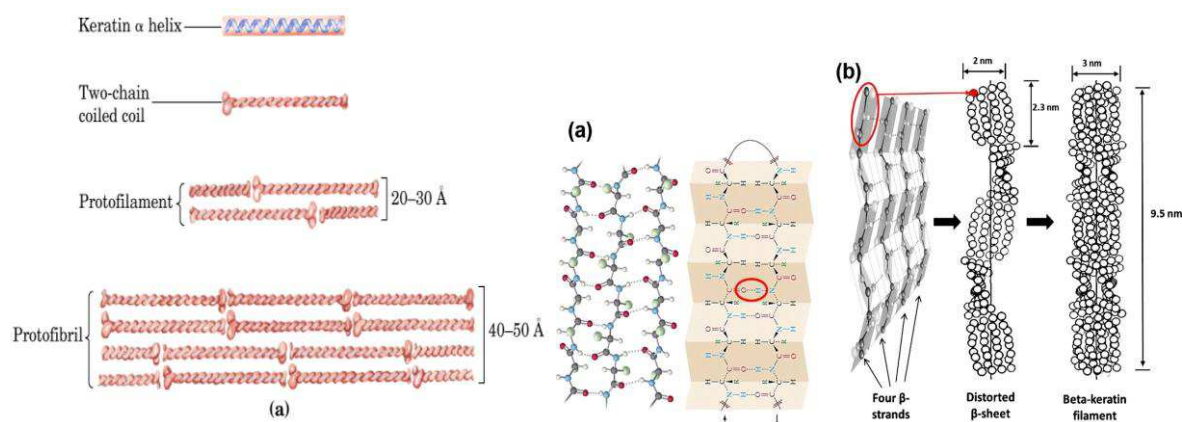
E/ml ... enota encimske aktivnosti na mililiter

1 UVOD

Keratini so skupina vlaknastih strukturnih proteinov. Prisotni so v epitelnih tkivih ptic, dvoživk, plazilcev in sesalcev. So strukturna komponenta perja, dlak, nohtov, rogov, kopit, kosti, dlak, krempljev, kljunov, kože, volne in lusk. Keratin je sestavljen iz številnih aminokislin, prevladujejo pa cistein, lizin, prolin, serin, glicin in alanin (Selvam in sod., 2012). Spada v skupino skleroproteinov z visoko odpornostjo na fizikalne, kemične in biološke dejavnike. Ima gosto pakirano strukturo, ki jo stabilizirajo številne hidrofobne interakcije in vodikove vezi. Poleg tega pa se proteinske verige povezujejo z disulfidnimi vezmi, kar mu daje visoko mehansko stabilnost in odpornost na proteolitsko razgradnjo z običajnimi proteazami (npr. pepsinom, tripsinom, papainom) (Gupta in Ramnani, 2006).

Glede na sekundarno strukturo vrste keratina ga delimo na dve skupini: α -keratin in β -keratin. α -keratini (α -heliks) so običajno prisotni v dlakah, volni, rogovih, nohtih in krempljih sesalcev, medtem, ko je trši β -keratin (β -heliks), prisoten v perju, kljunih in krempljih ptic in plazilcev (Gupta in Ramnani, 2006). Poleg tvorbe α oziroma β heliksa se keratinska veriga naknadno zvije še v ovito vijačnico, kar daje keratinu še dodatno mehansko stabilnost (Meyers in sod., 2008).

Kljub visoki stabilnosti tega proteina pa obstaja v naravi več mikroorganizmov, ki lahko razgradijo te snovi. Mikrobne keratinaze so proteolitični encimi, ki jih lahko pridobimo iz keratinolitičnih gliv in bakterij. V zadnjem času ugotavljajo, da imajo keratinaze veliko uporabnih aplikacij. Najbolj raziskana je uporaba tovrstnih encimov za razgradnjo keratinskih odpadkov. Predvsem živilska industrija jih vsako leto odvrže več milijard ton in akumulacija le-teh povzroča nekatere okoljske probleme. Zato se pojavlja vse večja potreba po razvoju enostavnih in ekonomičnih metod za razgradnjo keratinskih odpadkov. Encimska hidroliza nam omogoča pretvorbo netopnega keratina iz odpadnega materiala v produkte z dodano vrednostjo, kot na primer: v krmo za živino, gnojila in bioplin. V farmaciji in biomedicini pa uporaba keratinaz kaže obete na področju razgradnje prionov in dostave nekaterih zdravil. Keratinaze imajo potencial tudi za uporabo v usnjarski in tekstilni industriji, kjer bi lahko nadomestile nekatere kemikalije (Onifade in sod., 1998).



Slika 1: Struktura α - (The University of Arizona, 2003) in β -keratina (McMurry, 2003)

2 MIKROBNE KERATINAZE

Keratinaze so razred proteolitičnih encimov s sposobnostjo razgradnje netopnih keratinskih substratov. Prvi mikroorganizem (*Bacillus licheniformis*) s tovrstnim delovanjem je izoliral Molyneux leta 1959 iz dermoidnih cist ovce. S to bakterijo mu je uspelo razgraditi volnena vlakna *in vitro* in *in vivo*. Istega leta so dokazali tudi keratinolitično aktivnost *Streptomyces fradiae*. Na tej točki so bile raziskave usmerjene predvsem na razgradnjo keratinskega odpada in v zgodnji fazi raziskav keratinaz so odkrili več encimov, za katere je bilo ugotovljeno, da spadajo v skupino serinskih proteaz, večinoma iz rodov *Bacillus* in *Streptomyces* (Brandelli in sod., 2010). Danes je najbolj opisana keratinaza iz *B. licheniformis* PWD-1, ki jo kodira jo gen *kerA* (Lin in sod., 1995).

2.1 LASTNOSTI MIKROBNIH KERATINAZ

Lastnosti mikrobnih keratinaz so odvisne od mikroorganizma, ki jih proizvaja. Najpogosteje gre za ekstracelularne encime, čeprav so bile opisane tudi intracelularne in celično vezane keratinaze (Gupta in Ramnani, 2006). Encimi imajo širok spekter substratne specifičnosti in lahko razgrajujejo vlaknasti protein (elastin, kolagen, keratin,...) kot tudi nevlaknaste proteine (kazein, albumin, gelatin) (Syed in sod., 2009; Bressollier in sod., 1999). Njihova posebnost je zmožnost adhezije na netopne substrate (Brandelli in sod., 2010). Večina keratinaz je monomernih encimov, znane pa so tudi multimerne keratinaze (Nam in sod., 2002). Keratinaze so običajno endoproteaze (cepijo neterminalne peptidne vezi znotraj polipeptidne verige) in spadajo v skupino serinskih proteaz (funkcionalna skupina aktivnega mesta je serin), nekaj jih je tudi metaloproteaz (Selvam in sod., 2012). Te imajo v katalitični mehanizem vključen kovinski atom, pogosto je to cink. Poleg homologije aminokislinskih zaporedij s Carlsberg subtilizinom, dobro opisanim članom skupine serinskih proteaz, imajo keratinaze, ki spadajo pod serinske proteaze, tudi enaka aktivna mesta (Asp32, His64, Ser221), značilna za subtilizine, in podobno kinetiko pri večini substratov, s preferenčnim rezanjem ob hirofobnih in aromatskih ostankih (Evans in sod., 2000). Poleg tega pa so sorodnost dokazali tudi z inhibicijo z inhibitorji serinskih proteaz (polimetilsulfonil flourid, benzamidin in EDTA) (Bressollier in sod., 1999).

Molekulske mase keratinaz se gibljejo med 18 in 240 kDa pri *Streptomyces albidoflavus* (Bressollier in sod., 1999) in *Kocuria rosea* (Bernal in sod., 2006), a večina keratinaz ima manj kot 50 kDa. Višje molekulske mase so običajno povezane s keratinazami iz skupine metaloproteaz ali s termofilnim karakterjem. Večina mikrobnih keratinaz je alkalnih ali nevtralnih proteaz z optimalno aktivnostjo v območju pH od 7.5 do 10. Nekatere pa so optimalno aktivne pri ekstremno bazičnem pH ali rahlo kislem pH. Za številne je značilna stabilnost pri širokem pH in temperaturnem spektru, iz mezofilnega do termofilnega območja (Gupta in Ramnani, 2006; Brandelli in sod., 2010). Zaradi teh lastnosti imajo keratinaze velik potencial za uporabo v biotehnoloških in okoljskih aplikacijah, kjer običajne proteaze odpovejo.

2.2 MEHANIZEM DELOVANJA MIKROBNIH KERATINAZ

Razgradnjo keratina zmorejo le keratinaze, saj je površje proteina bogato z hidrofobnimi aminokisljinami (Ramanai in Gupta, 2007). Vendar pa proteoliza ni edini proces, ključen za

hidrolizo proteina. Za učinkovito razgradnjo mora namreč poteči tudi sulfitoliza, to je cepitev disulfidnih vezi. Dokaz za to, je dejstvo, da večina očiščenih keratinaz ni sposobna učinkovite hidrolize nativnega keratina, saj ima ta visoko vsebnost disulfidnih vezi (Nam in sod., 2002; Cao in sod., 2008).

2.2.1 Sulfitoliza

Prekinitev disulfidnih vezi spremeni konformacijo keratina in izpostavi več mest za delovanje keratinaz (Cao in sod., 2008). Sulfitoliza se lahko izvede s pomočjo kemičnih (tioglikolat, bakrov sulfat, amonijev in natrijev sulfat) ali celičnih redoks sistemov (običajno disulfidne reduktaze (Kumar in sod., 2008)). Pri bioprocesu se tako kot dokaz v gojišču akumulira tudi sulfit (Ramnani in Gupta, 2007). Pomembnost disulfidnih vezi za razpad keratinske strukture je bila dokazana s pospešitvijo hidrolize keratina z očiščenimi keratinazami ob dodajanju reducentov, ki promovirajo sulfitolizo (Cai in sod., 2009).

2.2.2 Proteoliza - mehanizem delovanja serinskih proteaz

Serinske proteaze so encimi, ki cepijo peptidne vezi proteinov, pri katerih serin služi kot nukleofilna aminokislina na aktivnem mestu encima. Serinske proteaze spadajo v dve širši kategoriji glede na njihovo stukturo: kimotripsinu podobne in subtilizinu podobne. Subtilizin je serinska proteaza pri prokariontih. Evolucijsko je nepovezan s kimotripsinsko vejo, a si delita isti katalitični mehanizem s katalitično triado na aktivnem mestu encima. Triada je struktura iz treh aminokislin: histidina, serina in aspartamske kisline. Vsaka od njih odigra določeno vlogo v tem procesu (Sahni in sod., 2016).

Epidermijski mehki α -keratin, ki ima nižjo vsebnost S-S vezi v primerjavi z trdim α -keratinom iz volne in dlak, je običajno bolj občutljiv na hidrolizo s strani keratinaz (Gradisar in sod., 2005). Prav tako je bolj uspešna hidroliza β -keratina iz perja v primerjavi s trdim α -keratinom iz volne in dlak. Razlog za to so disulfidne vezi, ki so prisotne v večjem številu v volni, kot v β -keratinu perja in pa narava sekundarne strukture, ki omogoča bolj razširjeno konformacijo β -keratinov v primerjavi z α -keratini, kar lahko rezultira v boljši dostopnosti keratinaz do substrata. Zagotovo pa tudi ostale lastnosti, kot je struktura vlaken in poroznost teh, določajo diferencialno hidrolizo substratov (Moreira-Gasparin in sod. 2009).

Večina keratinaz ni sposobna popolne razgradnje nativnega keratina, narava encimov, ki omogočajo keratinolizo pa še ni popolnoma znana. Čeprav se lahko o keratinolitičnem mehanizmu lahko približno sklepa, pa je za pojasnitev tega kompleksnega procesa potrebno več raziskav in podatkov. Množica mehanizmov delovanja, opaženih pri mikrobnih keratinazah, ima verjetno pomemben učinek v naravnem okolju, kjer medsebojno dopolnjevanje keratinolitičnih mikroorganizmov in njihovih encimov lahko razgradi robustno strukturo nativnega keratina lažje kot čista kultura. Ko delo opravijo keratinaze in disulfidne reduktaze pa lahko ostale proteaze delujejo na substrat, kar rezultira v popolni razgradnji substrata (Brandelli, 2015).

3 MIKROORGANIZMI

Keratinaze so zelo razširjene v mikrobnem svetu in jih lahko izoliramo iz mikroorganizmov vseh treh domen: Eukarionti, Bakterije in Arheje. Ti organizmi so bili do sedaj izolirani iz zelo raznolikih mest, od zemlje na Antarktiki do vročih izvirov, vključno z aerobnimi in anaerobnimi okolji. Posledično tudi med mikrobnimi keratinazami opazimo veliko raznolikost v njihovih lastnostih, tako biokemijskih, kot tudi biofizikalnih. Za izolacijo iz okolja se večinoma uporablja obogatitvena tehnika. Poročanj o keratinazah, pridobljenih iz arhej je zelo malo, glive in bakterije pa so na tem področju zelo raziskane (Kublanov in sod., 2009).

3.1 EVKARIONTI

Večinoma gre za antropofilne ali zoofilne glive. Keratinolitičnih gliv je veliko in vključujejo številne taksone, vključno z hipomicetami (Kumar in sod., 2013), ki jih sestavljajo tako dermatofiti (npr. rod *Microsporum*), ki sicer nimajo velike komercialne vrednosti, pa tudi nedermatofitne glive (npr. rod *Chrysosporium*). Nekateri rodovi nedermatofitnih gliv proizvajajo keratinaze, ki kažejo atraktivne biokemijske lastnosti: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Doratomyces*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, pa tudi *Acremonium*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Curvularia* in *Penicillium*. V vzorcih zemlje se najpogosteje pojavljajo keratinolitične glive rodov *Microsporum*, *Trichophyton*, *Chrysosporium* (Cao in sod., 2008; Gradišar in sod., 2000; Moreira-Gasparin in sod., 2009; Gradisar in sod., 2005; Shadzi in sod., 2002). Pri glivah keratinoliza vključuje tudi mehanski napad na keratinski substrat z micelijskim pritiskom, zato jim je omogočena lažja kolonizacija trdnjše keratina v primerjavi z bakterijami (Mitola in sod., 2002).

3.2 BAKTERIJE

Zanimanje za bakterijske keratinaze je v industrijskih aplikacijah v primerjavi z glivami večje, saj so sposobne hitreje rasti. Raziskovanje keratinolitičnih bakterij pa je pokazalo tudi izjemno raznolikost. Številni bakterijski sevi, ki razgrajujejo keratin so bili izolirani iz zemlje, perutninskih odpadkov in ostalih virov. Kot so povzeli Brandelli in sod. (2010), to vključuje nekatere Gram pozitivne bakterije, kot so predstavniki rodu *Lysobacter*, *Nesterenkonia*, *Microbacterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus pseudofirmus*, *Kocuria rosea*, sp., med njimi je tudi veliko aktinomicet: *Microbispora aerata*, *Streptomyces gulbarguensis*, *Streptomyces thermoviolaceus*, *Streptomyces thermonitrificans*, *Streptomyces flavis*, *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces graminofaciens*, *Streptomyces pactum*, *Nocardiopsis* sp., *Thermoactinomyces candidus*,... Keratinaze so bile izolirane tudi iz Gram negativnih bakterij iz rodu *Vibrio*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Serratia*, *Xanthomonas*,... Med proizvajalci keratinaz se najde tudi nekaj termofilov in ekstremofilov, npr. *Fervidobacterium pennavorans*, *Thermoanaerobacter keratinophilus*, *Fervidobacterium islandicum*, *Meiothermus ruber*, *Clostridium sporogenes* (Riessen in Antranikian, 2001; Nam in sod., 2002; Cai in sod., 2008; Gupta in Ramnani, 2006). Ker je razgradnja keratina olajšana pri visokih temperaturah in pH, so termofilni in alkalofilni (*Nesterenkonia* sp., *Nocardiopsis* sp.) mikroorganizmi zelo zanimivi za uporabo v različnih industrijskih procesih. *B. licheniformis* je tudi vir Versazyme, prve termo rezistentne, komercialno dostopne keratinaze.

4 BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA KERATINAZ

Za komercialno uporabo mora biti proizvedeni encim dovolj poceni in učinkovit. Trenutno je le malo keratinaz komercialno dostopnih in v uporabi, kar je najverjetneje posledica previsoke cene encima (Brandelli in sod., 2010).

4.1 INDUKCIJA SINTEZE KERATINAZ

Izločanje keratinaz je večinoma inducirano s keratinom (Cai in sod., 2009), zato je najprej potrebno izbrati ustrezen keratinski substrat za dodatek h gojišču. Dodajanje keratinskega substrata pa ni vedno nujno potrebno za indukcijo izločanja keratinaz. Kot so povzeli Brandelli in sod. (2010), lahko temu namenu služijo tudi nekateri drugi nekeratinski substrati, kot je na primer sojina moka, posneto mleko, prah lupine rakov, želatin, kazein in sirotka. V nekaterih primerih pa se je proizvodnja keratinaz izkazala celo za konstitutivno (Son in sod., 2008). Razlog za keratinolitično aktivnost na keratinskih substratih v primerjavi z zlahka asimilirajočimi substrati, je najverjetneje posledica omejitev dušika in ne direktne indukcije s keratinom (Adıgüzel in sod., 2009).

4.2 VIRI OGLJIKA IN DUŠIKA ZA PROIZVODNJO KERATINAZ

Čeprav nekateri mikroorganizmi lahko rastejo na keratinu kot edinem viru ogljika in dušika, pa dodajanje različnih virov ogljika in dušika običajno rezultira v višji proizvodnji keratinaz. Iz pregleda znanstvene literature je razvidno, da lahko dodajanje glukoze, saharoze, škroba, melase in ostankov sladkornega trsa ter dodatnih virov dušika, kot je urea, pepton, tripton, kvasni ekstrakt, amonijev klorid in natrijev nitrat poveča donos encimov. Nasprotno pa dodatek nekaterih drugih dopolnilnih substratov (ogljikovih hidratov; anorganskih in organskih virov dušika) pogosto zmanjša proizvodnjo encima, predvsem zaradi mehanizmov katabolne represije. Učinek različnih rastnih substratov na proizvodnjo keratinaz je zelo različen, odvisno od mikroorganizma, substrata in vsebnosti ogljika in dušika, kar kaže na to, da je sestavo gojišča potrebno določiti za vsak posamezen primer posebej. Čeprav ima vsak mikroorganizem drugačne zahteve glede hranil, se za produkcijo alkalnih proteaz najpogosteje dodajajo kompleksni viri dušika (Prakasham in sod., 2006). Za gojenje keratinolitičnih gliv se pogosto uporablja Sabouraudov dekstrozno gojišče (Mahmoudabadi in Zarrin, 2008).

4.3 STRATEGIJE PROIZVODNJE KERATINAZ

Optimalni inokulum za proizvodnjo keratinaz je običajno med 1 in 5% (v/v) (Yusuf in sod., 2016). Večina dosedanjih raziskav na področju keratinaz je bila narejenih v pogojih submerzne kultivacije. V zadnjih letih je bila proizvodnja preizkušena tudi v bioprocesu s trdnim gojiščem, ki tudi kaže velik potencial za industrijsko proizvodnjo s prednostmi, kot so nizki produkcijski stroški, manjša poraba vode in energije, minimiziranje odplak,...(Rai in sod., 2009). Pri submerzni in kultivaciji na trdnem gojišču se aktivnost posameznih predstavnikov keratinolitičnih mikroorganizmov razlikuje. Pri kultivaciji na trdnem gojišču so tako od gliv najbolj aktivni predstavniki rodov *Fusarium*, *Acremonium* in *Geotrichum*. Pri submerznih

pogojih pa so se kot najbolj primerne izkazale druge vrste, kot na primer *Aspergillus flavus* in *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis* in *Stachybotrys atra* (Friedrich in sod., 1999). Maksimalna aktivnost keratinaz je običajno dosežena v pozni eksponentni ali stacionarni rastni fazi. Večinoma je optimalni čas produkcije keratinaz s strani bakterij in gljiv med 48 ur do 9 dni.

4.4 TEMPERATURA IN pH PROIZVODNJE KERATINAZ

Poleg sestave gojišča so temperatura, pH in zračenje med najpomembnejšimi spremenljivkami za doseg velikega donosa. Keratinolitični encimi so mezofilni ali termofilni. Večina raziskav poroča o optimalni temperaturi med 40 in 70°C za keratinazno aktivnost. V izjemnih primerih, kot je na primer *Fervidobacterium islandicum*, je optimum dosežen tudi pri 100°C (Nam in sod., 2002). Večina mikrobnih keratinaz je bazičnih ali nevtralnih proteaz, s pH optimumom med 7,5 in 9,0 (8 pri *Bacillus sp.*), nekatere pa so vseeno optimalno aktivne tudi zunaj tega razpona, pri ekstremno alkalnem pH ali pri rahlo kislem pH. Številne keratinaze so pokazale tudi stabilnost v širokem območju pH.

4.5 STIMULANTI PROIZVODNJE MIKROBNIH KERATINAZ

Le malo je na voljo podatkov o faktorjih, ki kontrolirajo sintezo in sproščanje ekstracelularnih keratinaz. Rezultati številnih študij (Gupta in Ramnani, 2006) pa kažejo, da prisotnost dvovalentnih kovinskih ionov, kot je Ca^{2+} , Mg^{2+} in Mn^{2+} pogosto stimulira ekspresijo keratinaz. Ta pozitivni efekt je verjetno povezan z vzdrževanjem aktivne konformacije encima in stabilizacijo kompleksa encim-substrat (Cao in sod., 2008). Kovinski ioni pa imajo morda tudi vlogo zaščite encima pred denaturacijo (Bressollier in sod., 1999; Kublanov in sod., 2009). Pri subtilizin-sorodnih keratinazah na primer interakcija kalcija z specifičnimi Ca^{2+} vezavnimi mesti ali mesti avtolize, lahko razloži izboljšano termostabilnost v prisotnosti kovinskih ionov. Na drugi strani težke kovine, kot je Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} in Pb^{2+} običajno povzročajo inhibicijo keratinolitičnih encimov. Organska topila, detergenti in reducenti imajo različne učinke na različne keratinaze. A v številnih raziskavah so opazili stimulacijo keratinolitične aktivnosti s strani reducentov. Ta efekt je običajno pripisan redukciji disulfidnih vezi in ne direktnim učinkom na encim (Cao in sod., 2008).

4.6 HETEROLOGNO IZRAŽANJE MIKROBNIH KERATINAZ

S spoznanjem potencialne uporabnosti keratinaz se raziskovanje širi na področje povečane ekspresije teh encimov v različnih heterolognih gostiteljih. Razvoj mutiranih in rekombinantnih mikrobnih sevov je v procesu raziskovanja in predstavlja uporabno tehniko za povečanje proizvodnje keratinaz in razgradnja keratina (Wang in sod., 2004). Gen *kerA*, ki kodira keratinazo v *B. licheniformis* (Lin in sod., 1995), je bil najpogosteje kloniran in izražen v heterolognem mikroorganizmu, kot je *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* in *B. subtilis* (Shu in sod., 2016). Povečanje donosa je možno s kromosomsko integracijo večih kopij v gostiteljskem organizmu, kot je bilo preizkušeno s *kerA* v *B. licheniformis* in *B. subtilis* (Wang in sod., 2004). Povečana pH stabilnost je bila pred kratkim dosežena z rekombinantnimi keratinazami, kot je

keratinaza iz *B. licheniformis*, izražena v *P. pastoris* X33 (Radha in Gunasekaran, 2009). Kloniranje in heterologna ekspresija keratinaznih genov patogenih mikroorganizmov predstavlja tudi možno alternativo za zagotavljanje varnosti (*Pseudomonas aeruginosa*) (Lin in sod., 2009).

4.7 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE KERATINAZ

Običajna strategija je čiščenje encima s precipitacijo (soli ali organska topila), gelsko filtracijo, ionsko izmenjevalno kromatografijo, ultrafiltracijo in vodnim dvofaznim sistemom (Brandelli in sod., 2015).

Preglednica 1: Prednosti in slabosti najpogostejših metod izolacije keratinaz (Brandelli in sod., 2015)

Metoda izolacije	Prednosti in slabosti posamezne metode
Precipitacija s solmi ali organskimi topili	Prednosti: enostavna tehnika, možnost povečevanja obsega, nizki stroški, enostavno delo.
	Slabosti: običajno slaba resolucija; nekateri organska topila pripomorejo k denaturaciji encima; po precipitaciji s soljo je potrebna dializa.
Dvofazni vodni sistem	Prednosti: nizki stroški, dobra resolucija, možnost povečevanja obsega, rahlo toksično, primerno okolje za proteine, lahko odstrani tudi ostanke celic.
	Slabosti: pogosto pride do sprememb v fazni viskoznosti, polimeri in soli lahko vplivajo na določanje proteinov v vzorcu.
Ultrafiltracija	Prednosti: nizek tlak in temperatura zmanjšata možnost determinacije encima, preprosta izvedba in koncentracija proteina, enostavno povečanje obsega.
	Slabosti: drage membrane, obraščanje in polarizacija membrane, nizka resolucija.
Gelska filtracija	Prednosti: visoka resolucija, razsoljevanje.
	Slabosti: počasen proces, težko povečevanje obsega, drag proces, razredčen vzorec na koncu procesa.
Ionska izmenjevalna kromatografija	Prednosti: visoka resolucija, enostavno povečevanje obsega, visoka zmogljivost za vezavo proteinov.
	Slabosti: drag proces, slabša pretočnost v primerjavi s nekromatografskimi procesi.

5 ANAEROBNA PROIZVODNJA MIKROBNIH KERATINAZ

Anaerobna proizvodnja je z vidika proizvodnje keratinaz bolj zanimiva kot aerobna, saj ponuja poleg možnosti proizvodnje keratinaz tudi istočasno pridobivanje biogoriva oz. energije. Mnenja glede prednosti uporabe mezofilnih in termofilnih mikroorganizmov za proizvodnjo keratinaz so deljena. Termofilni mikroorganizmi naj bi sicer pospešili proces hidrolize in zmanjšali tveganje za kontaminacijo, po drugi strani pa mezofilni zahtevajo manjši energetski vložek (Brandelli in sod., 2010).

5.1 MEZOFILNI ANAEROBNI MIKROORGANIZMI

5.1.1 *Alcaligenes* sp.

Proizvodnjo keratinaze iz bakterije *Alcaligenes* AQ05-001 so optimizirali z uporabo metode OFAT (one-factor-at-a-time method) in s statistično optimizacijo. Vzorec je bil nanešen na agarško gojišče s perno moko (FMA), ki je vseboval perje, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·6H₂O in agar. Suspenzija čiste kolonije iz FMA je bil inokulirana na gojišče s perno moko FMB, ki je vseboval perje, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄ in MgSO₄·6H₂O. Optimalen inokulum je bil opažen pri 2% (v/v). Optimizacija gojišča je pokazala 10-kratno povečanje produkcije keratinaz (88.4 U/mL) ob dodatku amonijevega bikarbonata (0.15 g/L), posnetega mleka (3.0 g/L), saharoze (5.0 g/L) in uree (0.01 g/L) z 4,5 g/l perja. Popolna razgradnja perja je bila dosežena pri pH 8, 27°C po 36 urah. pH je med fermentacijo narasel na 9.1, po 72 urah pa se je produkcija keratinaz pričela zaustavljati (Yusuf in sod., 2016).

5.1.2 *Bacillus megaterium*

Park in sod., 2009 so vzorec sprva kultivirali v bazalnem slanem gojišču z 0.1% (w/v) piščančjim perjem, NH₄Cl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgCl₂·6H₂O in kvasnim ekstraktom. Perje je bilo predhodno oprano z vodo in posušeno pri 60°C za 72 ur ter shranjeno pri 4°C. Za kulturo v stresalnih bučkah je bilo 50 ml gojišča dodano vsaki erlenmajerici z inokulumom 1mL bakterijske kulture (2x10⁷ celic/ml), ki je rasla 24 ur v hranilni mešanici pri 30°C. Kultivacija je potekala 5 dni pri 30°C pri 200rpm na stresalniku, pH gojišča je bil 7.5. Za produkcijo keratinaz je zadoščalo perje kot vir ogljika in dušika, z optimalno koncentracijo 1,6% w/v. Frukoza, galaktoza in glukoza, manitol in glicerol so delovali stimulatивно na produkcijo encima. Kot najbolj primeren dodatek dušika so se izkazali tripton, posneto mleko in kazein. Večina perja je bila popolnoma razgrajenega po 4 dneh, popolnoma pa se je razgradilo po 7 dneh. Maksimalna aktivnost keratinaz je bila 58 E/ml po 5 dneh bioprocasa. pH je med procesom narasel na 8.8, kot posledica produkcije amonijaka.

5.2 TERMOFILNI ANAEROBNI MIKROORGANIZMI

5.2.1 *Keratinibaculum paraultunense*

Keratinibaculum paraultunense so izolirali na selektivnem gojišču SM s perjem, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, raztopino vitaminov, raztopino elementov v sledih, L-Cys-HCl in resazurinom s pH 7-7.5. Bakterijska kultura je bila dodana gojišču in inkubirana pri 55°C. Rast je bila optimalna pri 55°C, pH 8.5 in NaCl 0.2%. Optimalna aktivnost keratinaze je bila dosežena pri 70°C in pH 8.5. Generacijski čas je bil pri tem 3,02 ure, popolna razgradnja nativnega perja je bila dosežena v 24 urah. Ocetna kislina, propionska kislina, izomaslena kislina, maslena kislina in izovalerenska kislina so bile glavne nastale kratkoverižne maščobne kisline, ob majhnih vrednostih metanola, etanola, izobutanola in heksanjske kisline pri uporabi perja kot substrata. V ekstracelularni brozgi so bile zaznane proste tiolne skupine. Keratinaza je bila močno inhibirana z fenilmetansulfonil fluoridom in šibko z EDTA, kar je potrdilo, da spada med alkalne serinske proteaze. Dodatek reducentov (b-merkaptoetanol in ditiotreitol) je povečalo encimsko aktivnost (Huang in sod., 2013).

5.2.2 *Thermoanaerobacter keratinophilus*

Thermoanaerobacter keratinophilus sta Riessen in Antranikian (2001) izolirala iz vzorca prsti, zbrane v nepredušno zaprte steklenice z dodatkom reducenta 5% (wt/v) $Na_2S \cdot 9H_2O$. Nato je bil inokulum prestavljen v 100mL stekleničke z 50mL anaerobno pripravljenega gojišča in ovčje volne. Gojišče CM je vsebovalo: K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $SrCl_2 \cdot 6H_2O$, H_3BO_3 , $NaWO_4$, kvasni ekstrakt, tripton, raztopino elementov v sledih, raztopino vitaminov, resazurin, $NaHCO_3$ in $Na_2S \cdot 9H_2O$. pH gojišča je bil 6,8. Kulture, ki so rasle na keratinskem gojišču so subkultivirali vsaj trikrat in izbrali čiste kulture. Rastne poskuse so izvedli na gojišču CM s 0.05% (wt/v) kvasnim ekstraktom in 0.05% (wt/v) triptonom v 10ml Hungatovih epruvetah. Končna koncentracija substrata v testnih epruvetah je bila 0.5% (wt/v), dodan je bil inokulum (5%, vol/v) kulturo v eksponentni fazi. Stekleničke so inkubirali pri 70°C v netresoči vodni kopeli za 10 dni. Optimalni pogoji za rast so bili pri 70°C, pH 7.0, 0.5% - 1% (wt/v) NaCl, 5 g/l kvasnega ekstrakta in 5 g/l triptona, generacijski čas je bil 67 min. Sulfat je bil uporabljen kot sprejemnik elektronov. Zamenjava sulfata s 2,5 g/l tiosulfatom je pokazala 3x večjo rast. Ugotovljeno je bilo, da je prisotnost 0.05% (wt/v) kvasnega ekstrakta in 0.05% (wt/v) triptona nujna za uspevanje bakterije. Po 6 dneh je izolirana bakterija razgradila 60% volne. Keratinaza je bila optimalno aktivna pri pH 8 in 85°C. Divalentni kovinski ioni Mg^{2+} , Ca^{2+} , in Mn^{2+} so do 5 mM koncentracije rahlo povečevali delovanja keratinaze.

6 UPORABA KERATINAZ

Mikrobne keratinaze so obetavni encimi za številne aplikacije. Uporaba keratinaz bi lahko bila pomembna alternativa za recikliranje keratinskih stranskih produktov iz agroživilske industrije. Poleg tega imajo potencial za proizvodnjo gnojil, uporabo v detergentih, strojenju in tekstilni industriji pa tudi za farmacevtske in biomedicinske aplikacije. Kljub temu njihova uporaba v industriji še ni popolnoma zaživela (Rai in sod., 2009), saj so tradicionalne metode pogosteje cenejše.

6.1 PROCESIRANJE AGROINDUSTRIJSKIH ODPADKOV

Biokonverzija materialov bogatih s keratinom v aminokislino, peptide in topne proteine s keratinolitičnimi encimi je potencialna metoda za izboljšanje prebavljivosti in hranilne vrednosti keratinskega odpada kot dodatka h krmi (Cai in sod., 2008). Za ta namen se aktivno iščejo ustrezni nepatogeni keratinolitični mikroorganizmi za izboljšane proteinske krme, kar bi zmanjšalo uporabo soje in ribje moke v ta namen (Bertsch in Coello, 2005). Perni keratin je bogat z glicinom, prolinom, alaninom, serinom, cisteinom, valinom,... Ker keratinu primanjkuje nekaj osnovnih aminokislin, kot je metionin, fenilalanin in histidin, pa lahko mikrobnii proteini, aminokislino in mikrobnii biomasa pripomorejo k obogatitvi proteinskih hidrolizatov (Nam in sod., 2002). Perje se trenutno pretvarja v perno moko in uporablja kot proteinsko prehransko dopolnilo za živino na omejeni ravni zaradi slabe prebavljivosti in nizke hranilne vrednosti produktov (pomanjkanje histidina, metionina in triptofana), ki se ustvarijo pri običajno uporabljeni fizikalni in kemični obdelavi (Onifade in sod., 1998). Produkcija bioaktivnih peptidov med razgradnjo keratinskih odpadkov je še eno potencialno zanimivo področje za raziskovanje (Riessen in Antranikian, 2001). Ponekod je danes že v uporabi tudi perna krma obdelana s keratinazami (Grazziotin in sod., 2006). Največja omejitev pa je trenutno visok strošek proizvodnje tovrstnih encimov. Keratinazni dodatek h krmi ima pozitivne učinke na uspešnost rasti, donos mesa, prebavljivost prehranskih komponent in razvoj črevesja piščancev v primerjavi s hranjenjem z sojinim pripravkom. Keratinaza iz *B. licheniformis* na primer znatno poveča prebavljivost aminokislin in je komercialno dostopna pod imenom Versazyme (Wang in sod., 2008).



Slika 2: Razgradnja perja z *B. megaterium* po: (A) 0, (B) 2, (C) 3, (D) 4 dnevih (Park, 2009).

6.2 RAZGRADNJA PRIONOV

Prioni so infektivne molekule, ki jih predstavljajo proteini v napačno zviti obliki. Glavni prionski protein je PrP (protease resistant protein). Prisoten je v pre in posinaptičnih nevronskih celicah, a v največjih koncentracijah ga najdemo v presinaptičnih celicah, kjer je vključen v transport bakra v okoljske celice. Bolezen povzroča napačno zvita oblika PrP^{Sc}, ki je zaradi svoje sekundarne strukture zelo odporna na proteolizo. Akumulacija te oblike povzroča nevrodegeneracijo, kot posledica bolezni TSE (prenosljiva spongiformna encefalopatija), BSE (govedna spongiformna encefalopatija) in Creutzfeldt Jakobova bolezen. Leta 2003 so odkrili izjemno sposobnost keratinaz za razgradnjo prionov (Sahni in sod., 2015). Yoshioka in sod. (2007) so opravili raziskavo o učinkovitosti razgradnje PrP^{Sc} v homogenatu okuženih mišjih in govejih možganov s strani keratinaze iz *B. licheniformis* PWD1. Za doseg tega je običajno potrebno mehansko ali termoično predtretiranje. Keratinaze iz *Nocardia* sp. TOA-1 pa so učinkovito razgradile prionski protein celo brez kemičnih ali fizikalnih tretiranj (Mitsuiki in sod., 2006). Ti encimi bi bili lahko primerni za dekontaminacijo medicinskih pripomočkov, ki so občutljivi na okužbo s prioni in dekontaminacijo ter nadaljnjo uporabo živalske hrane za krmo (Suzuki in sod., 2006).

6.3 USNJARSKA INDUSTRIJA

Keratinolitični encimi, ki ne kažejo kolagenolitične aktivnosti so vse pogosteje predmet raziskovanj s strani usnjarske industrije, predvsem za proces odstranjevanja dlak, in predstavljajo ustrezno alternativo konvencionalnim strojarskim procesom z uporabo sulfida (Bouacem in sod., 2016). Encimsko odstranjevanje dlak običajno uporablja proteaze skupaj z majhno količino sulfida in apna. Keratinaze eo pri usnjarski industriji lahko uporabljajo v različnih fazah procesa: nevtralne keratinaze pri namakanju, alkalne pri odstranjevanju dlak in mehčanju. Thanikaivelan in sod. (2004) so opisali pa popolno odstranitev kravjih dlak z 0.5% natrijevega sulfida in 1% koncentracijo encima. Iskanje bolj učinkovitih, varnih in okolju prijaznih strategij za procesiranje usnja in shranjevanje surovih kož se nadaljuje. Na tem mestu mikrobne keratinaze veliko obljublajo. Nekatere so aktivne pri višjih temperaturah (70-85°C). Zaradi variabilnih razmer in temperatur procesiranja se aktivno še naprej išče termo, nevtralno in alkalno stabilne encime za povišano katalitično učinkovitost procesov.

6.4 GNOJILA

Hidrolizat, nastal pri biokonverziji keratinskega odpada je lahko primeren za uporabo v dušikovitih gnojilih in izboljšanje prsti. V tem smislu so produkti razkroja perja pokazali primerljive rezultate z referenčnim gnojilom pri 27 dnevni raziskavi rasti korenja (Kim in sod. 2005). V zadnjem času so razgradni produkti keratina s glavnimi keratinazami pokazali potencial za uporabo pri foliarnem gnojenju; količina aminokislin v encimskem hidrolizatih je bila višja kot tista, pridobljena v mikrobnih razgradnji, kar kaže prednost uporabe encimskih pripravkov namesto mikroorganizmov za hidrolizo keratina. Med rastjo je namreč prišlo do porabe dela raztopljenih produktov s strani mikrobnih celic (Vesela in Friedrich, 2009).

6.5 RAZGRADNJA MIKROBNIH BIOFILMOV

Zanimiva je tudi sposobnost razgradnje biofilmov patogenih bakterij s strani keratinaz, kar bi bilo koristno na področju medicine za odstranjevanje biofilmov iz medicinskih pripomočkov, na primer katetrov. Za ta namen so preizkusili keratinazo *Stenotrophomonas maltophilia* Kb2, ki je uspešno razgradila biofilme patogenov *Staphylococcus aureus* in *E. coli* (Bhange in sod., 2015). Za ta namen se sicer uporabljajo druga sredstva, ki pa ali niso dovolj učinkovita ali pa so preveč toksična za uporabo na pripomočkih, ki so v stiku s človekom.

6.6 BIOGORIVA

V zadnjem času se je pojavil naraščajoč interes po uporabi obnovljivih virov za zadostitev naraščajočih energetskih potreb človeštva. Tu pridejo v poštev tudi keratinski odpadki s proizvodnjo H_2 ali metana iz biomase v fermentacijskem postopku z mikrobnimi keratinazami, kar bi združilo proizvodnjo energije s tretiranjem organskih odpadkov. Balint in sod. (2005) so izvedli dvodelni temni fermentacijski proces, v katerem so združili sposobnost razgradnje keratinskega materiala seva *B. licheniformis* KK1 s proizvodnjo vodika s strani anaerobne arheje *Thermococcus litoralis*. *B. licheniformis* KK1 je bil uporabljen za pretvorbo keratinskih odpadkov v fermentacijski produkt, bogat z aminokislinami in peptidi. Nato je bil produkt fermentacije keratina, ob dodatku esencialnih aminokislin, metaboliziran s strani *Thermococcus litoralis*. Opazili so dobro rast *T. litoralis*, skupaj s produkcijo vodika, ki je znašala med 50 in 70 ml H_2/l v termofilni kulturi znotraj 48 ur. Za optimalen čas hidrolize keratina je bilo določeno 60 ur (Balint in sod., 2005) z 24ml/g perja.

6.7 OSTALO

V farmacevtski in kozmetični industriji so keratinaze uporabne pri eliminaciji keratina v aknah, odstranjevanju keratinizirane kože, odstranjevanju brazgotin, regeneriranju epitelija, pospeševanju procesa celjenja (Chao in sod., 2007), depilaciji, pripravi cepiv za dermatofitoško terapijo in povečanju dostave zdravil za nohte (Mohorcic in sod., 2007). Keratinolitični mikroorganizmi bi bili lahko uporabni tudi za obdelovanje odpadne vode in odstranjevanje čepov in oblog v kanalizacijskih sistemih (Tapia in Simões, 2008), modifikacijo proteinskih vlaken v tekstilni industriji (Riessen in Antranikian, 2001; Cao in sod., 2009), pretvorbo odpadkov v biorazgradljive filme in lepila (Gupta in Ramnani, 2006; Brandelli in sod., 2008). Poleg tega pa odpadki, bogati s keratinom, lahko služijo tudi kot substrat za kultivacijo entomopatogenih bakterij in proizvodnjo toksinov za komarje (Poopathi in Abidha, 2008). Aktivnost alkalnih proteaz v prisotnosti denaturantov, surfaktantov, organskih topil in detergentov so zelo zaželeni lastnosti za uporabo v industriji. Raziskuje se tudi uporaba keratinaz v imobilizirani obliki. Imobilizacijske tehnike običajno izboljšajo stabilnost encimov glede na pH in temperaturo in povečajo njihov potencial za različne uporabe. Imobilizacija keratinaze zmanjša učinek avtolize, kar tudi poveča stabilnost pri shranjevanju, poleg tega pa je encime v tej obliki mogoče reciklirati (Farag in Hassan, 2004).

7 OKOLJSKI VIDIK

7.1 PROBLEMATIKA ODPADKOV AGROŽIVILSKE INDUSTRIJE

Na letni ravni nastane bilijone ton keratinskega odpada, kot posledica dejavnosti v perutninski, tekstilni, usnjarski, ribji in mesni industriji. Pri tem največji delež tega odpada zavzema piščančje perje, saj keratin kot glavna komponenta perja predstavlja kar 10% celotne teže piščanca (Kim in Patterson, 2000). Zbiranje in odlaganje agroživilskega odpada se po svetu razlikuje. Večinoma se za ta namen uporabljajo odlagališča, sežigalnice, kemična in termična obdelava odpadkov (alkalna hidroliza z NaOH), ponekod pa so začeli material kompostirati (Onifade in sod., 1998; Riffel in Brandelli, 2006).

Po eni strani odlaganje in akumulacija odpadkov agroživilske industrije v okolju predstavlja okoljski problem, po drugi strani pa se organski material, ki bi bil lahko ponovno uporabljen, zavrže. Alkalna hidroliza in termotretiranje se običajno izvajata z namenom reciklaže odpadkov v dodatek za krmo živine (»perno moko«), a pri tem nista dovolj učinkoviti, saj se v postopku uničijo aminokisliline, poleg tega pa zahtevata še velik energetske vložek. Prav tako pa tudi sežiganje in kemijska predelava nista okolju prijazni alternativni, saj se pri tem izločajo onesnažila v obliki izpušnih plinov oziroma kemikalij. Uveljavljene metode so tako relativno neekonomične, predvsem pa netrajnostne. Ker se neprestano generirajo velike količine odpadkov, je treba najti rešitev, ki jih bo lahko procesirala zelo hitro, bo enostavna in ekonomična. Ena od zelo perspektivnih možnih rešitev te problematike je encimska hidroliza s keratinazami.



Slika 3: Odlagališče perutninskih odpadkov (Payne, 2017)

7.2 KAJ PA PROCESIRANJE USNJA?

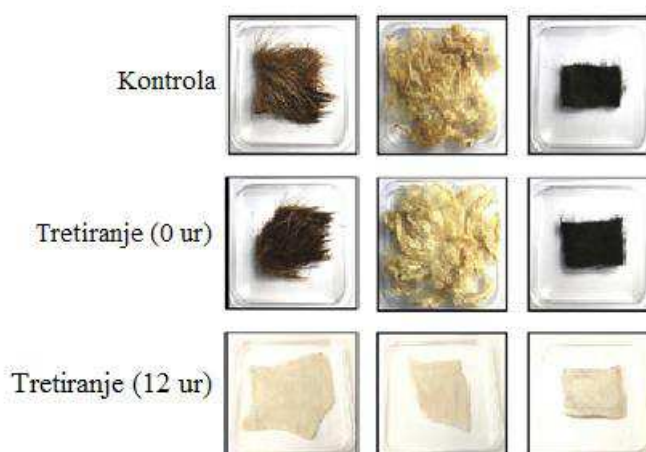
Prav tako narašča tudi usnjarska industrija (Bouacem in sod., 2016), samo v Evropi se proizvede okoli 74,000 ton usnjenih izdelkov letno. Proizvodnja usnja ustvarja velike količine organskih in anorganskih odpadkov ter odplak. To povzroča tri glavne težave:

- rabo velikih količin čiste/pitne vode,
- onesnaževanje voda z odpadnimi vodami iz usnjarske industrije v primeru, če se odpadne vode ne tretirajo primerno in
- sulfidne emisije med odstranjevanjem dlak.

Pri vsakem koraku procesiranja uporabljajo veliko kemikalij, ki se iztekajo v površinske in podzemne vode. Predstrojenje je najbolj onesnažujoč del procesiranja usnja in ustvarja kar 70% vseh odplak, te pa vsebujejo tudi korozivne sulfide (Thanikaivelan in sod., 2004). Pri strojenju s kromom se ustvarjajo tudi velike emisije kroma.

Uporaba keratinolitičnih encimov lahko pripomore k proizvodnji visoko kakovostnega usnja, zmanjšanju uporabe kemikalij, manj onesnaženim odpadnim vodam ter s tem zmanjšanju onesnaževanja okolja. Encimsko odstranjevanje dlak namreč zmanjša porabo sulfida za 85%, pri čemer nastane 20% manj trdnih odpadkov, celotni suh odpadek pa se zmanjša iz 152 kg na 8 kg na tono procesiranega surovega materiala, kar je velik dosežek v kontekstu upravljanja z trdnimi odpadki (Thanikaivelan in sod., 2004).

Alternativna pot mikrobnih keratinaz torej poveže proizvodnjo dragocenih produktov (keratinaz, mikrobnih biomase, proteinskih hirolizatov, bioplina) iz poceni substrata z učinkovitim načinom ravnanja z odpadki. To omogoča možnost recikliranja odpadkov v vredne produkte in s tem zaščito okolja z minimiziranjem odpadkov ter predstavlja okolju prijazno in ekonomično alternativo.

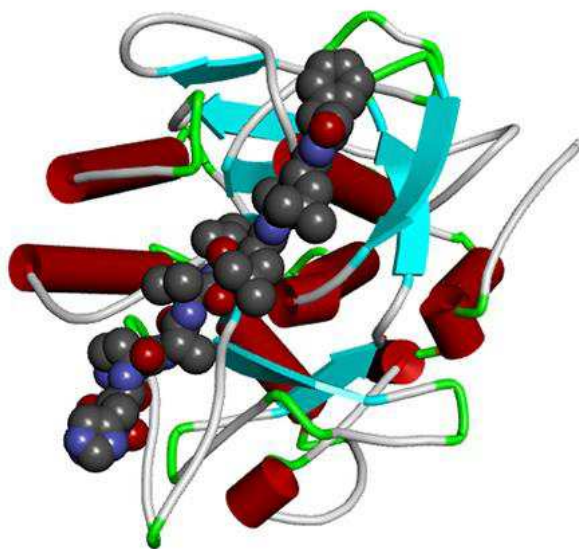


Slika 4: Delovanje keratinaze na kozjem, ovčjem in kravjem kožuhu (Bouacem, 2015)

8 ZAKLJUČEK

Trenutno se s področjem keratinaz ukvarja veliko raziskav, pri čemer se kopiči literatura o raznolikosti keratinolitičnih mikroorganizmov, informacije o biokemijskih lastnostih encimov in odkrivajo potencialni producenti keratinaz. To omogoča boljše razumevanje mehanizma njihovega delovanja in posledično povečano zanimanje za njihove aplikacije. Unikatna sposobnost mikrobnih keratinaz, ki jim omogoča bioprosesiranje keratinskega odpada bi lahko bila rešitev za onesnaževanje z odpadki živilskih industrij. Kot posledica vedno večjega povpraševanja po predvsem perutninskem mesu, se povečuje tudi količina keratinskih odpadkov, ki lahko predstavlja okoljski problem. Poleg tega pa uporaba keratinolitičnih encimov sega še na področje kozmetike in biomedicine ter na proizvodnjo biogoriv in gnojil, odpirajo pa se še številne možnosti za njihovo uporabo.

Glavne prepreke pri proizvodnji velikih količin keratinaz za širšo uporabo so predvsem premajhna robustnost encimov, previsoka cena in neučinkovitost proizvodnje velikih količin encimov v kratkem času. Nove raziskave tako stremijo k optimizaciji in amplifikaciji proizvodnje z optimizacijo pogojev in uporabo mutaganeze ter rekombinantnih encimov z namenom, da se čimprej razvijejo postopki učinkovite in cenovno sprejemljive proizvodnje encimov. Versazyme, Valkerase, Prionzyme in PURE100 so trenutno edini komercialno dostopni produkti, ki vsebujejo keratinaze. Vsi temeljijo na keratinazi iz *B. licheniformis* PWD-1.



Slika 5: 3D struktura keratinaze *B. licheniformis* PWD-1 (Versazyme, 2017)

9 VIRI

- Bálint B., Bagi Z., Tóth A., Rákhely G., Perei K., Kovács K. L. 2005. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 404–410
- Bernal C., Cairo´ J., Coello N. 2006. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 49–54
- Bertsch A., Coello N. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource Technology*, 96: 1703–1708
- Bhange K., Chaturvedi V., Bhatt R. 2015. Potential biofilm dispersal by a partially purified keratinase produced by *Stenotrophomonas maltophilia* strain Kb2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4: 801–805
- Versazyme Protease Feed Additive. 2014. BioResource International. <http://briworldwide.com/products/versazyme/> (2. sept. 2017)
- Bouacem K., Bouanane-Darenfed A., Zarái Jaouadi N., Joseph M., Hacene H., Ollivier B., Fardeau M.L., Bejar S., Jaouadi B. 2016. Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 321–328
- Brandelli A. 2008. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food Bioprocess Technology*, 1: 105–116
- Brandelli A., Daroit D.J., Riffel A. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1735–1750
- Brandelli A., Sala L., Kalil J. 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73: 3–12
- Bressollier P., Letourneau F., Urdaci M., Verneuil B. 1999. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied Environmental Microbiology*, 65,6: 2570–2576
- Cai C., Chen J., Qi J., Yin Y., Zheng X. 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B - Biomedicine & Biotechnology*, 9, 9: 713–720
- Cao L., Tan H., Liu Y., Xue X., Zhou S.. 2008. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 3: 389–394
- Chao Y., Xie F., Yang J., Lu J., Qian S. 2007. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 1125–1128

- Evans K.L., Crowder J., Miller E.S. 2000. Subtilisins of *Bacillus* spp. hydrolyze keratin and allow growth on feathers. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 11:1004-11
- Farag A., Hassan M. 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 2: 85-93
- Friedrich J., Gradišar H., Mandin D., Chaumont J.P. 1999. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. *Letters in Applied Microbiology*, 28: 127–130
- Gradišar H., Kern S., Friedrich J. 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Applied Microbiol Biotechnology*, 53: 196-200
- Gupta R., Ramnani P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70: 21–33
- Huang Y., Sun Y., Ma S., Chen L., Zhang H., Deng Y. 2013. Isolation and characterization of *Keratinibaculum paraultunense* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *FEMS Microbiology Letters*, 345: 56–63
- Kim J., Man J., Choi Y. M., Suh H. J. 2005. Preparation of Feather Digests as Fertilizer with *Bacillus pumilis* KHS-1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 3: 472–476
- Kim W. K., Patterson P. H. 2000. Nutritional Value of Enzyme- or Sodium Hydroxide-Treated Feathers from Dead Hens. *Poultry Science*, 79, 4: 528–534
- Kublanov I.V., Perevalova A.A., Slobodkina G.B., Lebedinsky A.V., Bidzhieva S.K., Kolganova T.V., Kaliberda E.N., Rumsh L.D., Haertlé T., Bonch-Osmolovskaya E.A. 2009. Biodiversity of Thermophilic Prokaryotes with Hydrolytic Activities in Hot Springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Applied Environmental Microbiology*, 75, 1: 286–291
- Kumar A. G., Swarnalatha S., Gayathri S., Nagesh N., Sekaran G. 2013. Characterization of an alkaline active – thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 2: 1364-5072
- Lin X., Kelemen D. W., Miller E. S., Shih J. C. H. 1995. Sequence and Expression of *kerA*, the Gene Encoding a Keratinolytic Protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4: 1469–1474
- Lin H., Yin L., Jiang S. 2009. Cloning, Expression, and Purification of *Pseudomonas aeruginosa* Keratinase in *Escherichia coli* AD494 (DE3) pLysS Expression System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3506–3511
- Mahmoudabadi A. Z., Zarrin M. 2008. Isolation of dermatophytes and related keratinophilic fungi from the two public parks in Ahvaz. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 1: 20-23
- McMurry J., Fay R. 2003. Chemistry. ZDA, Pearson Prentice Hall: 1080 str.

- Meyers M. A., Chen P. Y., Lin A. Y., Seki Y. 2008. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science* 53: 1–206
- Mitola G., Escalona F., Salas R., Garcia E., Ledesma A. 2002. Morphological characterization of in-vitro human hair keratinolysis, produced by identified wild strains of *Chrysosporium* species. *Mycopathologia*, 156: 163–169
- Mitsuiki S., Hui Z., Matsumoto D., Sakai M., Moriyama Y., Furukawa K., Kanouchi H., Oka T. 2006. Degradation of PrPSc by Keratinolytic Protease from *Nocardiosis* sp. TOA-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 5: 1246–1248
- Mohorčič M., Torkar A., Friedrich J., Kristl J., Murdan S. 2007. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 332: 196–201
- Molyneux G.S. 1959. The digestion of wool by a keratinolytic *Bacillus*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 12, 3: 274-281
- Moreira-Gasparin F. G., Marques de Souza C. G., Costa A. M., Alexandrino A. M., K. Bracht C., G. Boer C., M. Peralta R. 2009. Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation*, 20: 727-736
- Nam G. W., Lee D. W., Lee H. S., Lee N. J., Kim B. C., Choe E. A., Hwang J. K., Suhartono M. T., Pyun Y. R. 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, 178, 6: 538-47
- Onifade A. A., Al-Sane N. A., Al-Musallam A. A., Al-Zarban S. 1998. Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, 66: 1-11
- Park G. T., Son H. J. 2009. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiological Research*, 164: 478-485
- Payne J. Avian Influenza Mortality Management Options, Composting Procedures and Lessons Learned. 2017. eXtension. <https://articles.extension.org/pages/74369/avian-influenza-mortality-management-options-composting-procedures-and-lessons-learned> (2. sept. 2017)
- Poopathi S., Abidha S. 2008. Biodegradation of poultry waste for the production of mosquitocidal toxins. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62: 479–482
- Prakasham R.S., Subba Rao C., Sarma P.N. 2006. Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 97: 1449–1454

- Radha S., Gunasekaran P. 2009. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains. *Protein Expression and Purification*, 64: 24–31
- Rai S. K., Konwarh R., K. Mukherjee A. 2009. Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. *Biochemical Engineering Journal*, 45: 218–225
- Riessen S., Antranikian G. 2001. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles*, 5: 399–408
- Riffel A., Brandelli A. 2006. Keratinolytic Bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 395-399
- Sahni N., Sahota P. P., Phutela U. G. 2015. Bacterial keratinases and their prospective applications: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 6, 4: 768-783
- Shadzi S., Chadeganipour M., Alimoradi M. 2002. Isolation of keratinophilic fungi from elementary schools and public parks in Isfahan, Iran. *Mycoses*, 45: 496–499
- Shu M., Shen W., Yang S., Wang X., Wang F., Wang Y., Ma L. 2016. High-level expression and characterization of a novel serine protease in *Pichia pastoris* by multi-copy integration. *Enzyme and Microbial Technology*, 92: 56–66
- Son H., Park H., Kim H., Lee C. 2008. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. *Biotechnology Letters*, 30: 461–465
- Suzuki Y, Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. 2006. Decomposition of Extremely Hard-to-Degrade Animal Proteins by Thermophilic Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, 2: 73–81
- Syed D. G., Lee J. C., Li W. J., Kim C. J., Agasar D. 2009 Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technology*, 100: 1868–1871
- Tapia D. M., Garcia Simões M. L. 2008. Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 7, 3: 296-300
- Thanikaivelan P., R. Rao J., U. Nair B., Ramasami T. 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends in Biotechnology*, 22, 4: 182-188

- The University of Arizona. Department of Biochemistry and Molecular Biophysics. Proteins: Secondary Structure and Fibrous Proteins. 2013.
http://cbc.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Protein_Structure/secondary_structure.htm (2. sept. 2017)
- Veselá M., Friedrich J. 2009. Amino Acid and Soluble Protein Cocktail from Waste Keratin Hydrolysed by a Fungal Keratinase of *Paecilomyces marquandii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 84-90
- Wang H., Guo Y., C.H. Shih J. 2008. Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. *Animal Feed Science and Technology*, 140: 376–384
- Wang J., Rojanatavorn K., C.H. Shih J. 2004. Increased Production of *Bacillus* Keratinase by Chromosomal Integration of Multiple Copies of the *kerA* Gene. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 4: 459-464
- Yoshioka M., Miwa T., Horii H., Takata M., Yokoyama T., Nishizawa K., Watanabe M., Shinagawa M., Murayama Y. 2007. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 2: 1364-5072
- Yusuf I., Ahmad S. A., Phang L. Y., Syed M. A., Shamaan N. A., Khalil K. A., Dahalan F. A., Shukor M. Y. 2016. Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium *Alcaligenes* sp. AQ05-001. *Journal of Environmental Management*, 183: 182-195