



## Keratyny i ich biodegradacja

Anna Rodziewicz, Wojciech Łaba

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Wrocław

### Keratins and their biodegradation

#### Summary

The family of keratins comprises fibrous proteins of high mechanical and chemical stability, present in skin appendages like feathers, horn, hoof or hair, as well as cytokeratins forming a part of cytoskeleton of epithelial cells. The ability of keratin degradation is a feature of many saprophytic and pathogenic microorganisms, including bacteria, fungi and streptomycetes. That also occurs during caspase-mediated apoptotic processes in vertebrate cells. The mechanism of microbial keratinolysis involves action of mainly alkaline serine proteases, but additional processes like sulphitolysis or mechanical breakdown are also known. Among a wide variety of microbes, bacteria, especially from the genus *Bacillus*, are of interest in terms of large scale biodegradation of keratinic wastes. Diverse applications, including poultry industry or farm wastes digestion, fertilizer composts production, broiler diets supplementation and prion protein decomposition, are mentioned.

#### Key words:

keratin, keratin filaments, degradation, keratinases, keratinolytic microorganisms, bioremediation.

#### Adres do korespondencji

Anna Rodziewicz,  
Katedra Biotechnologii  
i Mikrobiologii Żywności,  
Akademia Rolnicza,  
ul. Norwida 25,  
50-375 Wrocław;  
e-mail:  
arod@wnoz.ar.wroc.pl

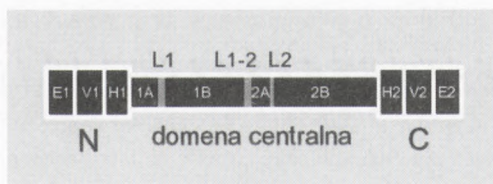
### 1. Wprowadzenie

Keratyny (gr. *kéras* = róg) stanowią wysoce heterogeniczną rodzinę białek włókienkowych o zwartej strukturze, którą utrzymują mostki S-S cystyny. W komórkach nabłonkowych człowieka zidentyfikowano dwadzieścia izoform keratyn o masie cząsteczkowej od 40 do 70 kDa, natomiast w komórkach innych ssaków wykazano około 10 izoform tzw. keratyn twardych, obecnych w wytworach skóry: piórach, wełnie, rogach, paznokciach i innych.

Charakteryzują się one znaczną odpornością na działanie czynników fizycznych i chemicznych, a także enzymów proteolitycznych. Są wybitnie higroskopijne, lecz nierozpuszczalne w wodzie. W epitelium większości komórek zwierzęcych tworzą sieci filamentów pośrednich (IF, ang. *intermediate filaments*), które obok mikrofilamentów oraz mikrotubul są podstawą cytoszkieletu. Stanowią ponad 85% wszystkich białek i pełnią różne funkcje, polegające między innymi na wzmocnieniu struktury komórki. Keratyna wchodząca w skład filamentów pośrednich ma strukturę dwuniciowej superhelisy  $\alpha$ . IF biorą istotny udział w podziałach komórkowych, w przestrzennej organizacji chromatyny, przekazywaniu sygnałów wewnątrz- i międzykomórkowych oraz w skurczu włókien mięśniowych (1).

## 2. Cytokeratyny

Cytokeratyny są największą i najbardziej złożoną grupą filamentów pośrednich wykazujących specyficzność tkankową względem tkanki nabłonkowej. Tworzą sieć filamentów asocjujących z desmosomami i chemidesmosomami w połączeniach komórka – komórka oraz komórka – błona podstawna. Zbudowane są według modelu wspólnego dla wszystkich IF. Częsteczki białek różnych typów IF mają konserwatywną domenę centralną w postaci helisy  $\alpha$ , składającą się z 310-315 reszt aminokwasowych. W przeprowadzonej analizie sekwencji aminokwasów  $\alpha$ -keratyny wykazano powtarzający się odcinek o długości siedmiu reszt, przedstawiony symbolicznie jako (a-b-c-d-e-f-g)<sub>n</sub>, gdzie a i d są zazwyczaj aminokwasami hydrofobowymi (Leu, Val, Ile). Konfiguracja helisy  $\alpha$  formowanych przez domeny centralne umożliwia stabilizację tworzonych dimerów poprzez wiązania wodorowe. Dodatkowo w poddomenach 1A i 2B domeny centralnej wyróżniono powtarzające się fragmenty składające się z 13 reszt aminokwasowych, określane jako *trigger sites*, odpowiedzialne również za stabilizację struktury helisowej oraz dimerów (1). W pałeczkowatej domenie centralnej IF wyróżnia się cztery segmenty oznaczone jako 1A, 1B, 2A, 2B (rys. 1) o stałej liczbie aminokwasów: 35(1A), 101(1B), 19(2A), 121(2B). Segment 2B tworzy helisa o zaburzonym skręcie, a pozostałe segmenty mające strukturę dwuskrętnej helisy są połączone ze sobą krótkimi niehelisowymi łącznikami L1, L1-2, L2. Łączniki te cechują się zmiennością sekwencji, destabilizują helisę  $\alpha$  i za-

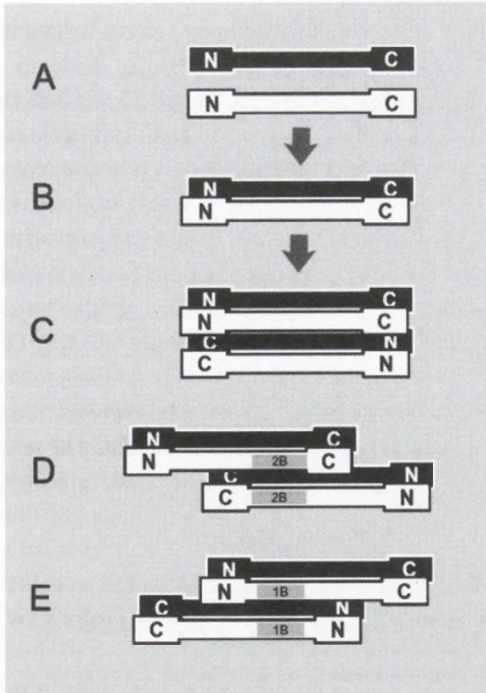


Rys. 1. Ogólny schemat domenowej budowy filamentów keratynowych.

burzają interakcje pomiędzy dwuskrętnymi zwojami. Na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej domen centralnych oraz struktury drugorzędowej i domeny, filamenty pośrednie podzielono na sześć typów, z których dwa pierwsze tworzą keratyny. Typ I stanowią keratyny kwaśne (m.cz. 40-67 kDa, pI 4,5-5,5), a typ II keratyny obojętne i zasadowe (m.cz. 40-70 kDa). Białka typu I obejmują jedenaście keratyn epitelium K9 – K20 i cztery keratyny włosów Ha1 – Ha4, a białka typu II, osiem białek epitelium K1 – K8 i cztery keratyny włosów Hb1 – Hb 4 (2).

Domeny N- i C-terminalne cytokeratyn liczą od 15 do 30 reszt o charakterze zasadowym. Wyodrębnia się wśród nich poddomeny: homologiczne H1 i H2, które występują wyłącznie w keratynach typu II, zmienne V1 i V2 o niejednakowej liczbie aminokwasów oraz końcowe E1 i E2 (rys. 1). Domeny te nie mają struktury helisowej, lecz bogate są w zwroty  $\beta$  (3). Domeny terminalne odgrywają ważną rolę w montażu filamentów i nawet drobne zmiany w ich obrębie prowadzą do utraty stabilności oraz zaburzenia funkcji (4). Keratyny obligatoryjnie są heteropolimerami podjednostek typu I i II w stosunku 1:1. Na poszczególnych etapach rozwoju oraz w różnych komórkach występują różne dimery białek, np. dimery K 8/18 obecne są w warstwie podstawnej nabłonka, a K 1/10 w warstwie rogowej. Zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, dimery keratynowe spontanicznie asocjują, bez udziału dodatkowych czynników lub energii. Jest to charakterystyczny sposób agregacji począwszy od dimerów, poprzez tetramery, protofilamenty, protofibryle, do filamentów. Włączanie podjednostek białkowych przebiega potranslacyjnie, wzdłuż całej powierzchni cząsteczek, w budowie których zakodowana jest informacja dotycząca wyższych struktur filamentów keratynowych (rys. 2).

Funkcjonowanie filamentów keratynowych w komórkach wymaga współdziałania zasocjowanych z nimi białek towarzyszących (IFAP, ang. *intermediate filament associated proteins*). IFAP są morfologicznie i funkcjonalnie spokrewnione z filamentami keratynowymi, ale nie są ich strukturalnymi komponentami. Ze względu na masę cząsteczkową oraz funkcję dzielą się na cztery klasy: I – IFAP o niskiej masie cząsteczkowej (10-45 kDa) wiążące bocznie filamenty w zwarte agregaty makrofilamentów (np. filagryna), II – IFAP o wysokiej masie cząsteczkowej (100-500 kDa) wiążące filamenty zarówno krzyżowo w luźne sieci, jak i z innymi elementami komórki (np. plektyna) oraz III i IV – IFAP sprzęgające końce filamentów z błoną komórkową oraz z otoczką jądrową (np. desmoplakina). W rogowaciejących komórkach naskórka filagryna, która jest białkiem o charakterze zasadowym z przewagą sekwencji Gly-Ser-Glu-Arg-His, tworzy niekowalencyjne wiązania z sekwencjami Gly – Ser w terminalnych domenach podjednostek keratynowych. Wiąże filamenty keratynowe o m.cz. 61-66 kDa w mikrofibryle, zanurzone w macierzy keratynocytów (5-7). Filagryna uważana jest za specyficzny wyznacznik keratynizacji komórek. Desmoplakiny: DP I i DP II mocują filamenty keratynowe w desmosomach. Należą one do rodziny białek linkerowych o wysokiej masie cząsteczkowej (5). Mutacje genów keratyny ulegających ekspresji w błonie podstawnej naskórka, zmieniają organizację filamentów keratynowych, co zwiększa ich wrażliwość na uszkodzenia, a w efek-



Rys. 2. Asocjacja podjednostek cytokeratyn. A – Równoległe monomery cytokeratyn typu I i II. B – Dimer złożony z równoległych monomerów cytokeratyn typu I i II. C – Tetramer złożony z antyrównoległe ułożonych dimerów. D – Tetramer z przylegającymi segmentami 2B. E – Tetramer z przylegającymi segmentami 1B.

cie powoduje brak adhezji międzykomórkowej. Konsekwencją są groźne pęcherze skóry, co jest symptomem pęcherzycy, choroby potencjalnie śmiertelnej dla człowieka (1).

### 3. Keratyny przydatków skóry

Keratynowe wytwory skóry charakteryzują się wielopoziomową strukturą nadającą im znaczną wytrzymałość mechaniczną. Podstawą tych struktur są „twarde”  $\alpha$ -keratyny, charakterystyczne dla poszczególnych martwych elementów skórnych, cechujące się wspólnym planem budowy i wysoką homologią do cytokeratyn. Złożone z nich mikrofibryle zanurzone są w bezpostaciowej, wysokosiarkowej macierzy białek niekeratynowych. Helisy  $\alpha$  prawoskrętne uformowane są w lewoskrętne superhelisy (protofibryle), które z kolei składają się na mikro- i makrofibryle, umieszczone ostatecznie w wydłużonych, dachówkowato ułożonych komórkach. Jest to model budowy charakterystyczny dla włosów, wełny i innych wyrostków skórnych (7,8).

Keratyna piór, w stosunku do keratyn paznokci, rogów i naskórka, różni się 2,5-krotnie wyższą zawartością cystyny (7,8%) (9). Jej budowa odbiega nieco od typowej struktury  $\alpha$ -keratyny, gdyż obok helis  $\alpha$ , od 25 do 30% białek tworzy strukturę harmonijki  $\beta$ . W badaniach przy użyciu mikroskopii elektronowej wykazano, że  $\alpha$ -keratyna składa się z włókien mikrofibrylarnych o średnicy 8 nm zanurzonych w białkowej macierzy. Cechą charakterystyczną jest obecność na przekroju upakowanych stref mikrofibryli, których warstwy wyraźnie się odznaczają. W keratynie dojrzałego pióra mikrofibryle mają średnicę około 3 nm, a odległość pomiędzy ich osiami wynosi 3,5 nm. Odznaczają się tam wyraźnie grupy pojedynczych mikrofibryli oraz struktury warstwowe, o grubości jednej mikrofibryli. Obok keratyn, w skład pióra wchodzi również ziarna melaninowe, o jednolitej strukturze wewnętrznej i znacznym zagęszczeniu. W trakcie badań nad właściwościami mechanicznymi keratyny piór stwierdzono zmiany ułożenia włókien białkowych, zależnie od pozycji na stosinach piór ptaków lotnych. Im bliżej końcówki stosiny, tym wyższa jest jej wytrzymałość (6).

#### 4. Drobnoustroje keratynofilne i keratynolityczne

Pióra ptaków jako struktury keratynowe, są miejscem bytowania różnych drobnoustrojów keratynofilnych. Część z nich to mikroorganizmy patogenne, w większości jednak są to drobnoustroje saprofityczne, pochodzące z gleby. Występują wśród nich zarówno bakterie, jak i promieniowce, grzyby strzępkowe oraz drożdże (10). Pierwsze z nich stanowią grupę dominującą. Burt i Ichida (11) w badaniach na grupie ponad 1500 ptaków różnych gatunków dowiedli, że upierzenie jest miejscem bytowania różnorodnych bakterii, z których ok. 80% wykazuje dodatkowo zdolności keratynolityczne. Wśród izolatów znalazło się kilkanaście szczepów należących do gatunków *Bacillus licheniformis* i *B. pumilus*. Liczba bakterii wykrytych w upierzeniu zależna była od sezonu, pory roku oraz gatunku ptaków. Obecność mikroorganizmów zdolnych do degradacji keratyny piór wywiera w pewnym stopniu negatywny wpływ na kondycję upierzenia (10). W świecie ptaków funkcjonują jednak mechanizmy uniemożliwiające nadmierny rozwój pasożytniczych drobnoustrojów. Oprócz zachowań ptaków polegających na pielęgnacji, piskowaniu i suszeniu piór, efekt antibakteryjny wykazuje wydzielina gruczołu kuprowego, służąca do natłuszczenia upierzenia (12). Ponadto wyższa odporność na degradację mikrobiologiczną stwierdzona została w przypadku piór barwnych, w porównaniu z piórami białymi. Wykazano, że obecne tam barwniki melaninowe posiadają właściwości bakteriostatyczne w stosunku do bakterii keratynolitycznych (13).

#### 4.1. Bakterie z rodzaju *Bacillus*

Bakterie z rodzaju *Bacillus* należą do najważniejszych producentów keratynolitycznych proteaz. Gatunkiem najczęściej izolowanym ze zdegradowanych odpadów keratynowych jest *B. licheniformis*. Szczep PWD-1 zdolny jest do produkcji neutralnej keratynazy serynowej (pI 7,25), podczas gdy większość enzymów keratynolitycznych pochodzących z bakterii rodzaju *Bacillus* to alkaliczne proteinazy serynowe o m.c.z. 24-33 kDa. Sekwencja genu *kerA* kodującego ten enzym jest w 97% identyczna z sekwencją genu subtilizyny Carlsberg (EC 3.4.21.62). Wiele z poznanych keratynaz wykazuje typową dla subtilizyn aktywność względem syntetycznych peptydów: Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA, Z-Gly-Pro-Cit-pNA oraz Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (tab. 1). Keratynazy syntetyzowane przez bakterie z rodzaju *Bacillus* wykazują optymalną aktywność w pH 9-12, w temperaturze 50-70°C, przy czym optimum ich syntezy zazwyczaj nie pokrywa się z optimum dla wzrostu komórek. Na szczególną uwagę zasługuje alkalofilny szczep AH-101 należący do gatunku *B. halodurans*, syntetyzujący wysoce termostabilną proteinazę alkaliczną o optymalnym działaniu w pH 11-13, w temperaturze 80-90°C. W tychże warunkach enzym ten odznaczał się wysoką aktywnością względem keratyny włosów ludzkich, jednakże warunkiem jego działania było uprzednie przeprowadzenie sulfitolizy, z udziałem kwasu tioglikolowego (1-5%), pełniącego rolę czynnika redukującego mostki cystynowe keratyny. Enzym należał do subtilizynopodobnych, wykazywał też wysoką aktywność elastazową oraz kolagenazową (21,22). Bakterie *Bacillus* znane są także z syntezy keratynaz cysteinowych, jak i trypsynopodobnych (*B. licheniformis* K-508), lub metaloproteinaz, (*B. polymyxa* B20). Enzymy keratynolityczne wykazują szeroką specyficzność substratową zarówno względem keratyn wyrostków skóry, takich jak pióra, włosy, wełna, kopyta, rogi, jak i innych białek włókienkowych (kolagen, elastyna), a także białek niewłókienkowych, jak kazeina czy albumina.

Tabela 1

Charakterystyka keratynolitycznych proteaz syntetyzowanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus*

Szczep	Typ proteinazy	Masa cząst. (kDa)	pH opt.	Temp. opt. (°C)	Degradowane substraty	Literatura
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1 (ATCC 53757)	serynowa	33	7,5	50	keratyna piór, azokeratyna, kazeina, kolagen, elastyna <sup>b</sup>	(14)
<i>Bacillus licheniformis</i> K-508	cysteinowa serynowa	– –	8,5 –	50 –	Bz-Phe-Val-Arg-pNA Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	(15)
<i>Bacillus pumilus</i>	serynowa (subtilizyna)	31,1	10,0-10,5	60	kazeina, keratyna Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA $\alpha$ -benzoilo-DL-Arg-pNA	(16)

1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus pumilus</i> FH9 <sup>a</sup>		–	9,0	55	kazeina, azokeratyna, keratyna piór	(17)
<i>Bacillus</i> sp. NCDC 180	AP-1 serynowa (subtilizyna)	28	11,0	50	kazeina > elastyna > albumina > azokeratyna <sup>b</sup>	(18)
	AP-2 serynowa (subtilizyna)	29	12,0	55	Glu-Gly-Ala-Phe-pNA Glu-Ala-Ala-Ala-pNA	
<i>Bacillus pseudofirmus</i> AL-89	serynowa	24	11,0	60-70	kazeina, keratyna piór	(19)
<i>Bacillus polymyxa</i> B20 <sup>a</sup>	serynowa	–	6,6	50	kazeina keratyna rozpuszczalna keratyna piór	(20)
	metaloproteinaza	–	10,2			
<i>Bacillus halodurans</i> AH-101 (JCM 9161)	subtilizyna  elastaza, kolagenaza	–	11,0-13,0	80-90	keratyna włosów (dodatek kw. merkaptoetylowego) Z-Ala-Ala-Leu-pNA Z-Gly-Gly-Leu-pNA Z-Gly-Pro-Cit-pNA Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg	(21-23)

<sup>a</sup> – badania na surowym płynie pochodzonym,

<sup>b</sup> – aktywność wobec substratów uszeregowano według malejącej efektywności.

Większość opisanych keratynaz zalicza się do enzymów indukcyjnych. Najefektywniejszymi induktorami są zazwyczaj substraty keratynowe, a mniej efektywnymi białkowe składniki podłoża, takie jak trypton, kazeina, mączka sojowa lub ekstrakt drożdżowy. Obecność węglowodanów w podłożu najczęściej hamuje syntezę proteaz, choć przykładowo *B. pseudofirmus* AL-89 najefektywniej produkował keratynazę w pożywce zawierającej pióra i glukozę. Konstytutywny charakter keratynaz potwierdzono w przypadku *B. licheniformis* K-508 oraz *B. pumilus* FH9, ale poziom ich syntezy zależał od dostępnych składników odżywczych. W większości przypadków najwyższą syntezę obserwowano w późnej logarytmicznej fazie wzrostu. W hodowlach bakterii na podłożach z dodatkiem piór kurzych obserwowano systematyczną i szybką degradację tego substratu, który stanowił dla komórek źródło węgla i azotu. Bakterie *B. subtilis* (24), a także *B. pumilus* FH9 (17) całkowicie upłynniły keratynę piór w ciągu 72 godzin. Szczep *Bacillus* sp. FK 46 degradował pióra w ciągu 5 dni hodowli (25). W wymienionych przypadkach hodowle prowadzono w temp. 37°C, a wyjściowa ilość keratyny wynosiła 1-2%. W doniesieniach El-Refai i wsp. (17) oraz Rodziewicz i Łaby (26) znajdujemy ponadto informacje o licznych izolatach *Bacillus* degradujących do 87% keratyny piór zawartej w podłożu w ciągu 3-4 dni hodowli.

System ekspresji bakterii z rodzaju *Bacillus* oraz wysoka efektywność sekrecji produktów pozakomórkowych czyni je atrakcyjnymi biorcami genów. W tym względzie dobrze poznany jest gatunek *B. subtilis*, z którego uzyskano wiele produktów biologicznych, przy użyciu endogennych i egzogennych plazmidów jako wektorów

klonowania. Ponadto produkty ekspresji mogą być gromadzone wewnątrz komórki lub też wydzielane do podłoża. Takie systemy ekspresji stosowane są do klonowania genów odpowiedzialnych za syntezę keratynaz, np. genu alkalicznej proteinazy (*aprA*) *B. subtilis* (24), genu alkalicznej proteinazy serynowej AP *B. pumilus* przydatnej do usuwania włosów ze skór (27), lub też genu (*kerA*) *B. licheniformis* PWD-1 o poznanej sekwencji (14,28,29), a także innych proteinaz, amylaz, ksylanaz, a nawet ludzkiego interferonu  $\alpha$  i  $\beta$ , czy hormonu wzrostu. Do przykładowych genów enzymów proteolitycznych, używanych do transformacji innych gatunków, należą geny alkalicznej i obojętnej proteinazy *B. amyloliquefaciens*, obojętnej proteinazy *Geobacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprM*), glu-specyficznej proteinazy *B. licheniformis* (BLase) (30).

#### 4.2. Gramodatnie ziarniaki

Wśród innych keratynolitycznych bakterii gramodatnich wymienić można izolat *Micrococcus* sp. B1pż. Syntetyzowane enzymy stanowiły mieszaninę tiolozależnych proteinaz serynowych o najwyższej aktywności w pH 9,4 w temp. 50°C, przy czym wykazywały wyższą specyficzność względem keratyny piór niż kazeiny (20,26). Elastaza uzyskana z *Micrococcus luteus* należała do metaloproteinaz aktywnych w szerokim zakresie pH (31). W obu przypadkach aktywność enzymów zależała od obecności jonów  $\text{Ca}^{+2}$ . Wyizolowane z gleby bakterie *Kocuria rosea* LPB-3 syntetyzowały przynajmniej dwa enzymy, efektywnie hydrolizujące keratynę piór, a także kolagen i elastynę w temp 35-40°C (32,33). Autorzy z powodzeniem wykorzystali szczep do polepszania wartości odżywczej mączek keratynowych na drodze fermentacji. Dodatkowym atutem szczepu była jego zdolność do syntezy karotenoidu astaksantyny.

#### 4.3. Bakterie gramujemne

Spośród bakterii gramujemnych uzdolnienia keratynolityczne wykazuje wiele gatunków zarówno tlenowców, jak i beztlenowców. Z rodzaju *Xanthomonadaceae* opisano dwa gatunki bakterii należące do *Stenotrophomonas* i *Xantomonas*. Bakterie *Stenotrophomonas* sp. produkują dwa typy enzymów współdziałających w degradacji keratyny: proteazę o m.cz. 40 kDa i pI 7,5, o optimum działania w pH 8-9, a także reduktazę disulfidową. Zespół tych enzymów był aktywny wobec keratyny włosów ludzkich oraz rogu bydłęcego, a także, w mniejszym stopniu, elastyny i kolagenu. Kompletna degradacja keratyny piór podczas hodowli następowała w ciągu 2,5 doby (34,35). Szczepy *Xantomonas maltophilia* oraz *Vibrio* sp. kr2 wydzielają alkaliczne endoproteinazy serynowe. Nagromadzenie grup tiolowych w podłożu sugerowało obecność aktywności reduktazowej (36-38). Podobne sugestie wysuwają inni



autorzy odnośnie do *Chryseobacterium* sp. kr6 (rodzina *Flavobacteriaceae*), który syntetyzował termostabilną metaloproteinazę aktywowaną  $\text{Ca}^{+2}$  (39-41).

Przedstawicielami bakterii beztlenowych degradujących keratynę są *Fervidobacterium pennavorans* oraz *F. islandicum* AW-1. Są to termofilne, beztlenowe pałeczki, należące do rodziny *Thermotogales*. Głównym produktem ich metabolizmu fermentacyjnego jest aceton. Bakterie produkują wiele termoaktywnych i termostabilnych enzymów, w tym serynową keratynazę nazwaną ferwidolizyną, o nietypowo wysokiej m.cz. (130 kDa) (42). Enzym całkowicie rozkładał keratynę piór w ciągu 48 godzin. Stwierdzono, że ferwidolizyna była zasocjowana z „togą”, charakterystycznym dla tej rodziny bakterii elementem ściany komórkowej. W przeprowadzonej analizie kompletnej sekwencji genu *fls*, odpowiedzialnego za syntezę keratynazy, wykazano wysoką jego homologię z rodziną subtilizyn. Stworzony został szczegółowy model centrum aktywnego, zawierający triadę katalityczną typową dla proteinaz serynowych. Ekspresja genu *fls* została z powodzeniem przeprowadzona w komórkach *E. coli* (43). Szczep *F. islandicum* AW-1 syntetyzował keratynazę o podwyższonej termostabilności, której okres półtrwania w temp. 100°C wynosił 90 minut (42). Podobnie wysoką ciepłostabilnością charakteryzowały się proteazy degradujące keratyny wełny i piór, uzyskane z hodowli beztlenowców *Thermoanaerobacter keratinophilus* (44).

#### 4.4. Promieniowce o uzdolnieniach keratynolitycznych

Promieniowce (*Actinomycetales*), tworzą rząd z klasy bakterii właściwych. Zasiadają głównie glebę, rzadziej wodę, a nieliczne formy są pasożytami. Producentami enzymów keratynolitycznych są liczne gatunki należące do rodziny *Streptomycetaceae*: *Streptomyces albidoflavus* K<sub>1-02</sub> (45), *S. pactum* DSM 40530 (46-47), *S. graminofaciens* (48) oraz termofilne *S. thermoviolaceus* SD8 (49) i *Streptomyces* sp. MG104 (50), a także alkalofilny *Nocardiopsis* sp. TOA-1 (51) (rodzina *Nocardioformeae*) oraz *Thermoactinomyces candidus* (52) i *T. vulgaris* C<sub>52</sub> (rodzina *Actinomycetaceae*) (53). Promieniowce wydzielają keratynazy o niskiej masie cząsteczkowej (18-49 kDa), podobne do bakteryjnych. Są to alkaliczne proteazy serynowe (*Nocardiopsis* sp.) lub metaloproteinazy (*S. albidoflavus*) (45,51). Niektóre z nich wykazują właściwości subtilizynopodobne (*T. candidus*, *S. pactum*) albo chymotrypsynopodobne (*Nocardiopsis* sp., *S. pactum*). W większości mają szeroką specyficzność substratową, aktywnie degradują różne białka strukturalne, jak: keratyny, kolagen, elastynę i fibrynę. Stopień indukcji keratynaz jest specyficzny dla danego szczepu, ale zauważalna jest prawidłowość wyższego poziomu ich syntezy w obecności keratyn  $\beta$  (pióra, rogi, paznokcie) niż keratyn  $\alpha$  (włosy, sierść), jak w przypadku *T. candidus*, *T. vulgaris* i *S. thermoviolaceus* (tab. 2).

Tabela 2

## Właściwości oczyszczonych keratynaz syntetyzowanych przez promienioowce

Szczep	Typ proteinazy	Masa cząst. (kDa)	pH opt.	Temp. opt. (°C)	Kofaktor	Degradowane substraty	Literatura
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	serynowa	18	7,5	60	Ca <sup>2+</sup>	Suc-(Ala) <sub>2</sub> -Pro-Phe-pNA Suc-(Ala) <sub>3</sub> -pNA Bz-Phe-Val-Arg-pNA	(45)
<i>Streptomyces thermonitrificans</i>	serynowa	–	9,0	50	–	keratyna piór kurzych	(50)
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	–	40	8,0	55	–	keratyna piór kurzych	(49)
<i>Thermoactinomyces candidus</i>	serynowa	30	8,6	70	–	albumina > kazeina > żelatyna > keratyna piór > róg > wełna > keratyna sierści psa > elastyna	(52)
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	metaloproteinaza	–	8,0-8,5	55-60	Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>	keratyna: rogu bawołu > piór kurzych > piór kaczyc i gęsi > piór indyjskich > włosów > wełny	(53)
<i>Streptomyces pactum</i>	serynowa	30	8,0	60-65	Ca <sup>2+</sup>	keratyna piór, azokeratyna, kazeina Suc-(Ala) <sub>2</sub> -Pro-Phe-pNA Bz-Arg-pNA, Ac-Lys-pNA Suc-(Ala) <sub>3</sub> -pNA	(47)
<i>Nocardioopsis</i> sp.	serynowa	20	11,0-11,5	70-75	–	proszek keratynowy, kazeina	(51)

## 4.5. Grzyby strzępkowe

Saprophytyczne, keratynofilne grzyby strzępkowe lub ich formy przetrwalne naturalnie bytują na substratach keratynowych w glebie (54), w osadach rzecznych (55) oraz w powietrzu i kurzu (56). Terminem keratynofilne określane są też dermatofity. Friedrich i wsp. (57) badając grupę około 300 izolatów grzybów, pochodzących z różnych środowisk wykazali, że ponad połowa z nich była w stanie korzystać z keratyny, jako jedyne źródła C i N. Najwyższy poziom pozakomórkowej aktywności keratynolitycznej prezentowały rodzaje: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Trichurus*, *Ulocladium*, *Fusarium* i *Curvularia*. W grupie saprofitów również znaleźć można gatunki potencjalnie przydatne w procesie bioremediacji składowisk odpadów organicznych, w tym keratynowych, jak np. proponowany przez Singh *Chrysosporium keratinophilum* (58). Keratynazy produkowane przez grzyby można zaliczyć do alkalicznych, mezofilnych proteaz serynowych. Ich synteza uwarunkowana jest indukcją substratem białkowym, chociaż niekoniecznie keratyną, natomiast glukoza i sole azotowe wywołują represję syntezy keratynaz (59). Enzymy te wykazują szeroką specyficzność substratową wobec keratyn twardych i miękkich (naskórka) oraz elastyny. Ubytek

tych białek w podłożu hodowlanym grzybów jest znacznie wolniejszy, niż z udziałem bakterii. Stwierdzono, że grzyby *Ch. keratinophilum* w ciągu piętnastodobowej hodowli rozkładały 53% keratyny skóry i 44% keratyny sierści bawolej (58). Szczepy *Trichophyton* zaliczone do dermatofitów są bardziej efektywne w syntezie enzymów niż grzyby z rodzajów *Scytalidium* czy *Fusarium* (60). Niektóre gatunki grzybów np. *Aspergillus fumigatus* mogą produkować termostabilne keratynazy (tab. 3) (59).

Tabela 3

## Właściwości oczyszczonych keratynaz syntetyzowanych przez grzyby strzępkowe

Szczep	Typ proteinazy	Masa cząst. (kDa)	pH opt.	Temp. opt. (°C)	Kofaktor	Degradowane substraty	Literatura
Saprofity							
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	alkaliczna	69	8,0	40	–	skóra bydlęca > keratyna sierści ogona bydlęcego	(58)
<i>Doratomyces microsporus</i>	serynowa	33	8,0-9,0	50	–	keratyna naskórka > skóra bydlęca > keratyna paznokci > keratyna racie świńskich; kazeina > albumina > elastyna	(61-63)
Dermatofity							
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	serynowa	38	5,5	50	–	keratyna sierści świnki morskiej > keratyna włosów > kazeina	(64)
<i>Microsporum canis</i>	alkaliczna	33	8,0	35-45	Mg <sup>+2</sup> Mn <sup>+2</sup> Ca <sup>+2</sup>	keratyna sierści świnki morskiej, azokeratyna	(65,66)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	alkaliczna	42	8,0-9,0	45	–	keratyna piór, kazeina	(59)

## 4.6. Mikroorganizmy patogenne

Patogeny zwierząt kręgowych kolonizują skórę i jej przydatki, wykorzystując swoje zdolności do degradacji keratyny. Właściwość ta warunkuje ich charakter pasożytniczy. Do dermatofitów zaliczane są grzyby strzępkowe ze spokrewnionych ze sobą rodzajów: *Epidermophyton*, *Microsporum* i *Trichophyton* (anamorfy) oraz *Arthroderma* (telomorfy) (67). Wśród grzybów patogennych, u których stwierdzono wysoki poziom syntezy proteaz, znajdują się *Trichophyton mentagrophytes*, *T. gallinae*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* (tab. 3). Zewnątrzkomórkowe proteazy dermatofitów oraz keratynofilnych grzybów glebowych należą do enzymów wykazujących optimum działania w zakresie pH 5,5-9,0. W większości są to proteazy serynowe, ale znane są również

przypadki metaloproteaz. Przykładowo, u *M. canis* wykryto zarówno proteazę serynową subtilizynopodobną, jak i metaloproteazę zależną od jonów  $Mg^{+2}$  (65,66). Enzymy te mogą degradować białka rozpuszczalne i nierozpuszczalne. Keratynaza *T. mentagrophytes*, szybciej rozkładała keratynę sierści świnki morskiej niż kazeinę (64). Zarówno grzyby dermatofityczne, jak i saprofityczne, rozkładają keratynę, wykorzystując hydrolizę enzymatyczną, niehydrolityczną sulfitolizę oraz keratynolizę mechaniczną (58,68,69).

Do keratynolitycznych patogenów zaliczane są także bakterie bytujące na skórze i błonach śluzowych jamy ustnej. Najaktywniejszymi z nich są: *Bacteroides gingivalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Brevibacterium epidermidis* i *Treponema denticola*, u których stwierdzono aktywność keratynolityczną, głównie związaną z błoną komórkową. Enzymy te miały charakter endopeptydaz i były termolabilne (70).

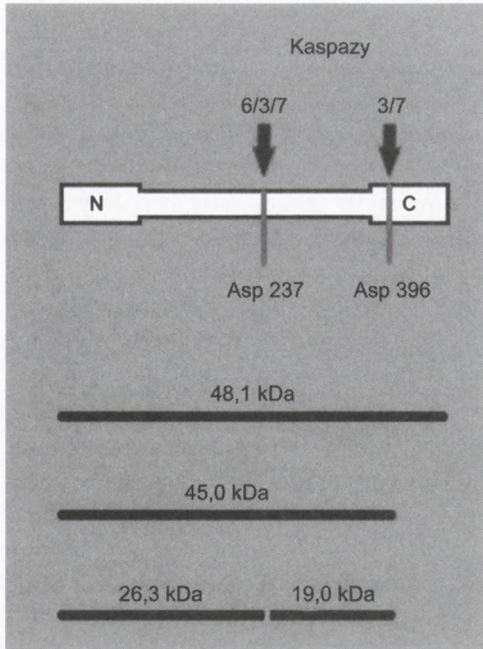
## 5. Możliwe mechanizmy degradacji keratyn

Niezwykła stabilność mechaniczna keratyn wynika z ich wielopoziomowej struktury, oraz wysokiego usieciowania, które utrzymują liczne mostki disiarczkowe cystyny, wiązania wodorowe oraz oddziaływania hydrofobowe. Tylko niektóre drobnoustroje zdolne są do rozkładu tych białek. W proces degradacji zaangażowane są enzymy hydrolityczne i oksydoredukcyjne, a także inne czynniki związane z komórkami mikroorganizmów. Mechanizmy pozakomórkowej degradacji keratyn dotychczas nie zostały całkowicie wyjaśnione. Keratynazy są zazwyczaj enzymami pozakomórkowymi, wydzielanymi do podłoża w celu hydrolizy nierozpuszczalnego substratu, choć spotyka się również wewnątrzkomórkowe, np. u *B. licheniformis* RGI (71), czy *Trichophyton gallinae* (72). Enzymy te zaliczane są do endopeptydaz EC 3.4.99.11 o nieznanym mechanizmie katalizy (71). Keratynazy pochodzące z różnych grup drobnoustrojów w większości należą do proteaz serynowych. Mechanizm działania tej grupy enzymów z udziałem triady katalitycznej jest dobrze znany, przy czym hydrolizę enzymatyczną poprzedzają zwykle reakcje redukcyjne. Według Kurnerta (73), znaczna liczba mostków disiarczkowych keratyny musi zostać zredukowana, w celu umożliwienia dostępu enzymów proteolitycznych. Autor ten wysunął jednocześnie hipotezę o różnicach w mechanizmie keratynolizy z udziałem mikroorganizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Wykazał też różnicę w proporcjach wydzielanych do podłoża związków siarki przez grzyby *Microsporum gypseum* ATCC 26554 oraz promieniowce *Streptomyces fradiae* ATCC 14544 podczas ich wzrostu w obecności wełny owczej, jako jedyne źródła węgla i azotu. Szczep *M. gypseum* intensywnie wydzielal do podłoża siarczan (IV) i siarczan ( $S^0$ ), jako produkty katabolizmu cysteiny (74). Także Rajak i wsp. (75) potwierdzili to zjawisko na przykładzie innych grzybów *Absidia cylindrospora* i *Rhizomucor pusillus*. Przypuszcza się, że obecność siarczanu (IV) umożliwia tzw. sulfitolizę mostków disiarczkowych,

czyli ich redukcję do S-sulfocysteiny oraz cysteiny, zgodnie z reakcją:  $\text{Cys-SS-Cys} + \text{HSO}_3^- \rightarrow \text{Cys-SH} + \text{Cys-SSO}_3^-$ . Skutkiem sulfitolizy jest denaturacja substratu, w czym bliżej niesprecyzowany udział mają strzępki grzybni. Rozluźniona struktura keratyny jest wówczas bardziej podatna na działanie pozakomórkowych enzymów hydrolitycznych. W efekcie proteolizy powstają peptydy i aminokwasy, a w dalszym ciągu amoniak, który alkalizuje środowisko. W warunkach tlenowych cysteina może ponownie utleniać się do cystyny.

W hodowlach promieniowców *S. fradiae* nagromadzany był tiosiarczan przy całkowitym braku siarczanu (IV) i niewielkich ilościach siarczanu (VI). Tiosiarczan jednak, w warunkach hodowli nie reaguje z resztami cystyny, co stawia pod znakiem zapytania proces sulfitolizy. Obecność znacznej ilości peptydów zawierających cysteinę sugerowała bezpośrednią redukcję mostków S-S. Funkcję taką mogłyby pełnić enzymy o charakterze reduktaz, jako biochemiczne czynniki sulfitolizy: flawoproteinowe reduktazy disulfidowe, zależne od koenzymów nikotynoamidowych (EC 1.6.4.), lub reduktazy disulfidowe, których donorami elektronów są związki siarkowe (transhydrogenazy, EC 1.8.4.), np. reduktaza białkowo-disulfidowa (76). Podobne enzymy wewnątrzkomórkowe wykazano u *Streptomyces pactum* DSM 40530 (46,47), a także u *B. licheniformis* RG1 (77). Również z bakterii *Stenotrophomonas* sp. D-1 wyizolowano enzym o charakterze reduktazy, który współdziałał z proteinazą serynową, podwyższając pięćdziesięciokrotnie jej aktywność (78). Efekt stymulacji keratynolizy wykazany został także po bezpośrednim dodaniu do mieszaniny reakcyjnej substancji o charakterze redukującym, np. 10-30 mM siarczanu (IV). Podobny efekt uzyskano po dodaniu do podłoża hodowlanego siarczku sodu lub Cys (20).

Wewnątrzkomórkowe przemiany cytokeratyn i ich regulacja również są słabo poznane, podobnie jak funkcje tych białek. Przypuszcza się, że regulacja funkcjonalna cytokeratyn zachodzi z udziałem reakcji: fosforylacji, glikozytacji, transglutaminacji oraz asocjacji z wieloma innymi białkami. Ponadto ubikwitynacja tych białek i rozszczepienie kaspazą wyznaczają kierunek degradacji komórkowej w powiązaniu z apoptozą (1). Uruchomienie tego procesu wiąże się ze zmianami organizacji i niszczeniem struktur komórkowych. Cytokeratyny ulegają destabilizacji głównie na drodze fosforylacji, z udziałem wirusów lub przez nadprodukcję pojedynczych keratyn zawierających mutacje strukturalne. Ufosforylowane cytokeratyny są prawdopodobnie uprzywilejowane pod względem wiązania przez kaspazy. Enzymy te są efektorami apoptozy, cechującymi się m.in. powinowactwem do strukturalnych białek cytoszkieletu, w tym cytokeratyn. Kaspazy są endopeptydazami cysteinowymi, wykazującymi specyficzną specyficzność względem Asp. Z cytokeratynami typu I wiążą się w domenie centralnej w miejscu łącznika L1/2. Jedynie w cytokeratynie K18 wykazano dodatkowe miejsce wiązania w obrębie sekwencji Asp-Ala-Leu-Asp domeny C-terminalnej. Dla keratyn K13-K17 jest to konserwatywna sekwencja Val-Glu-Met-Asp/Ala, natomiast w przypadku K18 i K20 jest to Val-Glu-Val-Asp. Keratyny K9 i K10 typu I pozbawione są tych sekwencji, co czyni je potencjalnie odpornymi na działanie kaspaz, podobnie jak wszystkie keratyny typu II (K1-K8). Przykładowo, w dimerze



Rys. 3. Degradacja cytokeratyny K18 przy udziale kaspaz, z uwidocznieniem masy cząsteczkowej produktów.

K8/K18, występującym w nabłonku płaskim, hydrolizie podlega jedynie podjednostka K18, z uwolnieniem N-końcowego fragmentu o m.c. 26,3 kDa. Niemniej jednak, hydroliza podjednostek K18 jest wystarczająca do kompletnej reorganizacji struktury całego dimeru (79,80) (rys. 3).

## 6. Aplikacje keratynolitycznych bakterii i enzymów

Zdolność bakterii do degradacji keratyn i innych biopolimerów wynika z ich możliwości biosyntezy odpowiednich enzymów hydrolitycznych i oksydoredukcyjnych, zarówno wewnątrz-, jak i pozakomórkowych. Z powodzeniem znajdują zastosowanie w procesie bioremediacji gleb, zanieczyszczonych keratynowymi odpadami zwierzęcymi, do kompostowania odpadów keratynowych, a także do otrzymywania mączek paszowych na drodze fermentacji. W procesach tych mogą być stosowane zarówno aktywne komórki, jak i wyizolowane enzymy. Jednakże zastosowanie żywych, metabolicznie aktywnych komórek do bioremediacji gleby *in situ*, mimo że nie jest wolne od ograniczeń jest, jak się wydaje, optymalnym rozwiązaniem (81).

Kompostowanie jest procesem tlenowego rozkładu substancji organicznych oraz ich mineralizacji przy udziale mikroorganizmów, głównie termofilnych, w tym

bakterii, promieniowców i grzybów. Kompostowanie odpadów w postaci pierza stanowi łatwą i tanią metodę ich utylizacji, z jednoczesnym uzyskaniem nawozów organicznych. Kompost składający się z piór kurzych, ściółki i słomy, inokulowano szczepionką kultury mieszanej bakterii *B. licheniformis* (OWU 1411T) i promieniowców *Streptomyces* sp. (OWU1441). Początkowy wzrost temperatury sięgający 50-67°C, spowodował eliminację drobnoustrojów patogennych oraz obniżenie liczebności i różnorodności grzybów strzępkowych. Jednocześnie wykazano rozkład keratyny, potwierdzony obrazami z mikroskopii elektronowej. W efekcie uzyskano produkt o podwyższonej wartości nawozowej (stosunek C:N = 24:7), spełniający wymogi sanitarne (82). Podobne efekty uzyskano z wykorzystaniem szczepionki bakterii *B. cereus* B5esz (83).

Komórki bakterii *B. licheniformis* PWD-1 były wykorzystane do otrzymywania mączek paszowych w procesie tlenowym oraz metodą fermentacji. Wartość odżywcza pasz zawierających dodatek tych mączek była wyższa w porównaniu z mączką handlową (84). Szczególnie wartościowa pod względem żywieniowym była mączka pochodząca z fermentacji beztlenowej. Po uzupełnieniu niedoborów Lys, Met i His, jej wartość odżywcza była porównywalna z mączką sojową. Z powodzeniem wykorzystano również enzymy keratynolityczne *B. licheniformis* PWD-1 do otrzymywania komponentów paszy kukurydziano-sojowej dla kurcząt (85), jak również mączek keratynowych z pierza i padłych kurcząt (86).

Enzymatyczna degradacja odpadów keratynowych w warunkach *in vitro* w bioreaktorach, stosowana jest do otrzymywania hydrolizatów przydatnych m.in. w farmacji i kosmetyce. Przykładem jest keratynaza *B. subtilis*, która w 80% hydrolizowała keratynę rogów i kopyt w bioreaktorze membranowym oraz mieszkadłowym, a także w systemie *repeated-bath culture* (temp. 50°C, pH 8,3, czas 1 godz., enzym w ilości 1-2 mg/l) (87). Keratynazę z *B. subtilis* S14 stosowano do usuwania sierści ze skór wołowych. Niezdolność do hydrolizy kolagenu skóry była ważnym atutem tej keratynazy, gdyż umożliwiła jej aplikację w przemyśle garbarskim. Enzym ten może być wykorzystany do depilacji skóry bez naruszenia jej struktury (88,89). Istnieje również możliwość prowadzenia hydrolizy białek keratynowych przez keratynazy immobilizowane, np. na nośnikach szklanych lub na ziarnach akrylowych, co skutkowałoby obniżeniem kosztów procesu (27,90).

W ostatnich latach obserwowany jest rozwój badań nad wykorzystaniem enzymów keratynolitycznych, do hydrolizy infekcyjnych form białek prionowych (Pr<sup>Sc</sup>), które są przyczyną chorób CJD (choroba Creutzfelda-Jacoba) u ludzi oraz BSE (ang. *Bovine Spongiform Encephalopathy*) u bydła. Enzym syntetyzowany przez *B. halodurans* AH-101, proteinaza K oraz niektóre enzymy handlowe, wykazały zdolność degradacji białka Pr<sup>Sc</sup> do form nieszkodliwych i niewykrywalnych immunochemicznie. Zatem keratynoliza potencjalnie może stanowić obiecującą metodę utylizacji kłopotliwych i niebezpiecznych odpadów pochodzących z zakażonych zwierząt, lub metodę oczyszczania narzędzi chirurgicznych oraz innego sprzętu medycznego (91-93).

## 7. Podsumowanie

W artykule omówiono budowę i właściwości keratyn zarówno komórkowych jak i przydatków skóry, a także biodegradację tych białek w środowisku naturalnym. Białka keratynowe rozpowszechnione są w komórkach zwierząt kręgowych, gdzie głównie pełnią funkcje mechaniczne. Ich biodegradacja możliwa jest z udziałem drobnoustrojów, gdyż tylko one mogą uczestniczyć w recyklingu odpadów keratynowych. Wiele jest jednak niejasności co do funkcji, specyficzności i regulacji syntezy keratyn w macierzy cytoplazmatycznej. Są one najbardziej złożoną, wielogenową rodziną białek filamentów pośrednich, ulegają zróżnicowanej ekspresji w różnych komórkach nabłonkowych, różnią się biochemicznie i immunologicznie. Te dynamiczne struktury agregują przez heteropolimeryzację, ale już niewielkie różnice w ich budowie, uniemożliwiają adhezję podjednostek. Konsekwencją tego są poważne zaburzenia, które w skali organizmu przejawiają się w postaci często dziedzicznych chorób, takich jak: dermatozy, łuszczyca, pęcherzyca, czy nowotwory.

## Literatura

1. Coulombe P. A., Omary M. B., (2002), *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14, 110-122.
2. Foisner R., (2002), *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, www.els.net
3. Parry D. A. D., North A. C. T., (1998), *J. Struct. Biol.*, 122, 67-75.
4. Bousquet O., Ma L., Yamada S., Gu C., Idei T., Takahashi K., Wirtz D., Coulombe P. A., (2001), *J. Cell. Biol.*, 155 (5), 747-753.
5. Houseweart M. K., Cleveland D. W., (1998), *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10, 93-101.
6. Cameron G. J., Wess T. J., Bonser R. H. C., (2003), *J. Struct. Biol.*, 143, 118-123.
7. Jones L. N., (2001), *Clin. Dermatol.*, 19, 95-103.
8. Fraser R. D. B., Parry D. A. D., (2003), *J. Struct. Biol.*, 142, 319-325.
9. Akhtar W., Edwards H. G. M., (1997), *Spectrochim. Acta Part A*, 53, 81-90.
10. Clayton D. H., (1999), *Auk*, 116 (2), 302-304.
11. Burtt E. H., Ichida J. M., (1999), *Auk*, 116 (2), 364-372.
12. Shawkey M. D., Pillai S. R., Hill G. E., (2003), *J. Avian Biol.*, 34, 345-349.
13. Shawkey M. D., Hill G. E., (2004), *Auk*, 121 (3), 652-655.
14. Wang J. J., Shih J. C. H., (1999), *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 608-616.
15. Rozs M., Manczinger L., Vágvölgyi Cs., Kevei F., (2001), *Microbiol. Lett.*, 205, 221-224.
16. Han X., Damodaran S., (1998), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3596-3603.
17. El-Refai H. A., Abdel Naby M. A., Gaballa A., El-Araby M. H., Abdel Fattah A. F., (2005), *Process Biochem.*, 40, 2325-2332.
18. Kumar C. G., Tiwari M. P., Jany K. D., (1999), *Process Biochem.*, 34, 441-449.
19. Gessesse A., Hatti-Kaul R., Gashe B. A., Mattiasson B., (2003), *Enz. Microb. Technol.*, 32, 519-524.
20. Łaba W., Rodziewicz A., (2004), *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 3 (1-2), 109-120.
21. Takami H., Akiba T., Horikoshi K., (1992), *Biosci. Biotechn. Biochem.*, 56 (2), 333-334.
22. Takami H., Nakamura S., Aono R., Horikoshi K., (1992), *Biosci. Biotechn. Biochem.*, 56 (10), 1667-1669.
23. Takami H., Nogi Y., Horikoshi K., (1999), *Extremoph.*, 3, 293-296.
24. Zaghoul T. I., (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 70-72, 199-205.
25. Suntornsuk W., Suntornsuk L., (2003), *Biores. Technol.*, 86, 239-243.
26. Rodziewicz A., Łaba W., (2005), *Polish J. Chem. Technol.*, 7 (2), 46-49.
27. Pan J., Huang Q., Zhang Y. Z., (2004), *Curr. Microbiol.*, 49, 165-169.



28. Lin X., Kelemen D. W., Miller E. S., Shih J. C. H., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (4), 1469-1474.
29. Wang J. J., Swaisgood H. E., Shih J. C. H., (2003), *Enz. Microb. Technol.*, 32, 812-819.
30. Schallmey M., Singh A., Ward O. P., (2004), *Can. J. Microbiol.*, 50, 1-17.
31. Clark D. J., Hawrylik S. J., Kavanagh E., Opheim D. J., (2000), *Protein Expr. Purif.*, 18, 46-55.
32. Vidal L., Christen P., Coello M. N., (2000), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 551-554.
33. Coello N., Bernal C., Bertsch A., Estrada O., Moccó Y., Hasegawa M., (2003), *Revista de la Facultad de Ingeniería de la U.C.V.*, 18 (3), 119-126.
34. Yamamura S., Morita Y., Hasan Q., Rao S. R., Murakami Y., Yokoyama K., Tamiya E., (2002), *J. Biosci. Bioeng.*, 93 (6), 595-600.
35. Yamamura S., Morita Y., Hasan Q., Yokoyama K., Tamiya E., (2002), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 294, 1138-1143.
36. de Toni C. H., Richter M. F., Chagas J. R., Henriques J. A. P., Termignoni C., (2002), *Can. J. Microbiol.*, 48, 342-348.
37. Sangali S., Brandelli A., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 89, 735-743.
38. Sangali S., Brandelli A., (2000), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 87, 17-24.
39. Riffel A., Brandelli A., (2002), *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 255-258.
40. Riffel A., Lucas F., Heeb P., Brandelli A., (2003), *Arch. Microbiol.*, 179, 258-265.
41. Brandelli A., Riffel A., (2005), *Electron. J. Biotechnol.*, 8 (1), 35-42.
42. Nam G. W., Lee D. W., Lee H. S., Lee N. J., Kim B. C., Choe H. S., Hwang J. K., Suhartono M. T., Pyun Y. R., (2002), *Arch. Microbiol.*, 178, 538-547.
43. Kluskens L. D., Voorhorst W. G. B., Siezen R. J., Schwedtfeger R. M., Antranikian G., van der Oost J., de Vos W. M., (2002), *Extremoph.*, 6, 185-194.
44. Riessen S., Antranikian G., (2001), *Extremoph.*, 5 (6), 399-408.
45. Bressollier P., Letourneau F., Urdaci M., Verneuil B., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (6), 2570-2576.
46. Böckle B., Galunsky B., Müller R., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (10), 3705-3710.
47. Böckle B., Möller R., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (2), 790-792.
48. Szabo I., Benedek A., Szabo M. I., Barabas G., (2000), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 253-255.
49. Chitte R. R., Nalawade V. K., Dey S., (1999), *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 131-136.
50. Mohamendin A. H., (1999), *Int. Biodet. Biodegr.*, 43, 13-21.
51. Mitsuiki S., Sakai M., Moriyama Y., Goto M., Furukawa K., (2002), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (1), 164-167.
52. Ignatova Z., Gousterova A., Spassov G., Nedkov P., (1999), *Can. J. Microbiol.*, 45, 217-222.
53. Abdel-Hafez A. M., Mahmoud S. A. Z., Saleh E. A., Abdel-Fatah M. K., Shehata S. F. M., (1995), *Egypt. J. Microbiol.*, 30 (3), 343-354.
54. El-Said A. H. M., (1995), *J. Islamic Acad. Sci.*, 8 (4), [www.medicaljournal-ias.org/](http://www.medicaljournal-ias.org/)
55. Ulfing K., Guarro J., Cano J., Gené J., Vidal P., Figueras M. J., Łukasik W., (1997), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 22, 111-117.
56. Katiyar S., Kushwaha R. K. S., (2002), *Int. Biodet. Biodegr.*, 50, 89-93.
57. Friedrich J., Gradišar H., Mandin D., Chaumont J. P., (1999), *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 127-130.
58. Singh C. J., (2002), *Mycopathol.*, 156, 151-156.
59. Santos R. M. D. B., Firmino A. A. P., de Sá C. M., Felix C. R., (1996), *Curr. Microbiol.*, 33, 364-370.
60. Oyeka C. A., Gughani H. C., (1997), *Mycoses*, 41, 73-76.
61. Gradišar H., Kern S., Friedrich J., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 196-200.
62. Friedrich J., Kern S., (2003), *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 21, 35-37.
63. Friedrich J., Gradišar H., Vrecl M., Pogačnik A., (2005), *Enz. Microb. Technol.*, 36, 455-460.
64. Muhsin T. M., Aubaid A. H., (2000), *Mycopathol.*, 150, 121-125.
65. Brouta F., Descamps F., Monod M., Vermout S., Losson B., Mignon B., (2002), *Infect. Immun.*, 70 (10), 5676-5683.
66. Descamps F., Brouta F., Vermout S., Monod M., Losson B., Mignon B., (2003), *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, 38, 29-34.
67. Weitzman I., Summerbell R. C., (1995), *Clin. Microbiol. Rev.*, 8 (2), 240-259.

68. Kunert J., Novotný R., (2001), *Czech Mycol.*, 53 (3), 189-201.
69. Samdani A. J., Al-Bitar Y., (2003), *Pak. J. Med. Sci.*, 19 (4), 264-267.
70. Mikx F. H. M., de Jong M. H., (1987), *Infect. Immun.*, 55 (3), 621-625.
71. Ramnani P., Gupta R., (2004), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 40, 191-196.
72. Wawrzekiewicz K., Łobarzewski J., Wolski T., (1987), *J. Med. Vet. Mycol.*, 25, 261-268.
73. Kunert J., (1992), *Mycoses*, 35, 343-348.
74. Kunert J., (1989), *J. Basic. Microbiol.*, 29, 597-604.
75. Rajak R. C., Malviya H. K., Deshpande H., Hasija S. K., (1992), *Mycopathol.*, 118, 109-114.
76. McCormick D. B., (2001), *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, www.els.net
77. Ramnani P., Singh R., Gupta R., (2005), *Can. J. Microbiol.*, 51 (3), 191-196.
78. Yamamura S., Morita Y., Hasan Q., Yokoyama K., Tamiya E., (2002), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 294, 1138-1143.
79. Ku N. O., Omary M. B., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276 (29), 26792-26798.
80. Kramer G., Erdal H., Mertens H. J. M. M., Nap M., Mauermann J., Steiner G., Marberger M., Bivén K., Shoshan M. C., Linder S., (2004), *Cancer Res.*, 64, 1751-1756.
81. Gianfreda L., Rao M. A., (2004), *Enz. Microb. Technol.*, 35, 339-354.
82. Ichida J. M., Krizova L., Le Fevre C. A., Keener H. M., Elwell D. L., Burt Jr. E. H., (2001), *J. Microbiol. Meth.*, 47, 199-208.
83. Rodziewicz A., Anissimo I., Grzelak A., Łaba W., Baranowska K., (2005), *Materiały VIII Sympozjum „Biotechnologia środowiskowa”, Wisła-Jarzębata (w druku).*
84. Williams C. M., Lee C. G., Garlich J. D., Shih J. C. H., (1991), *Poult. Sci.*, 70, 85-94.
85. Odettallah N. H., Wang J. J., Garlich J. D., Shih J. C. H., (2003), *Poult. Sci.*, 82, 664-670.
86. Kim W. K., Patterson P. H., (2000), *Poult. Sci.*, 79, 528-534.
87. Kida K., Morimura S., Noda J., Nishida Y., Imai T., Otagiri M., (1995), *J. Ferm. Bioeng.*, 80 (5), 478-484.
88. Macedo A. J., Beys da Silva W. O., Gava R., Driemeier D., Henriques J. A. P., Termignoni C., (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (1), 594-596.
89. Thanikaivelan P., Rao J. R., Nair B. U., Ramasami T., (2004), *Trends Biotechnol.*, 22 (4), 181-188.
90. Lin X., Shih J. C. H., Swaisgood H. E., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (11), 4273-4275.
91. Langeveld J. P. M., Wang J. J., van de Wiel D. F. M., Shih G. C., Garssen G. J., Bossers A., Shih J. C. H., (2003), *J. Infect. Dis.*, 188, 1782-1789.
92. McLeod A. H., Murdoch H., Dickinson J., Dennis M. J., Hall G. A., Buswell C. M., Carr J., Taylor D. M., Sutton J. M., Raven N. D., (2004), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 317, 1165-1170.
93. Wang J., Borwornpinoy R., Odettallah N., Shih J., (2005), *Enz. Microb. Technol.*, 36, 758-767.