

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи



Тиморшина Светлана Наильевна

**Протеазы микромицетов с кератинолитической активностью:
новые продуценты и свойства**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2024

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель – *Осмоловский Александр Андреевич*, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты – *Садыкова Вера Сергеевна*, доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе» («НИИНА»), заместитель директора по научной работе, отдел микробиологии, лаборатория таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов, заведующая лабораторией

Машенцева Наталья Геннадьевна, доктор технических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Институт прикладной биотехнологии и пищевой инженерии имени академика РАН И.А. Рогова, кафедра биотехнологии и биоорганического синтеза, профессор

Кокаева Людмила Юрьевна, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра микологии и альгологии, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «10» декабря 2024 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3218>.

Автореферат разослан «06» ноября 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы работы и степень ее разработанности

Биодеградация – способ утилизации отходов за счет деятельности живых организмов или их ферментов. Данный подход к переработке трудноразлагаемых материалов позволяет снизить негативное влияние многих отраслей экономики на окружающую среду. Биодеградацию выгодно использовать не только для уменьшения количества захораниваемых отходов, но и в связи с отказом от применения других методов утилизации, как сжигание, кислотный или щелочной гидролиз и физическая обработка перегретым паром. Такие методы могут приводить к появлению дополнительных загрязнителей, например сажи и отработанных гидролизующих агентов, требующих утилизации, и не являются экономически выгодными из-за трат большого количества энергии, а зачастую и из-за отсутствия возможности вторичного использования продуктов переработки (Joutey et al., 2013).

Для деструкции трудноразлагаемых субстратов используют различные классы ферментов, однако наибольшую роль в биодеградации играют гидролазы, в том числе протеазы (КФ 3.4). Их широкое применение обусловлено необходимостью утилизации отходов агропромышленного комплекса, объединяющего различные отрасли промышленности, в том числе пищевую и текстильную, а также важностью перехода к высокоэффективной и экологически чистой переработке отходов и вторичному использованию продуктов данного процесса (аминокислот и олигопептидов) в качестве удобрений, кормовых добавок, компонентов косметических и медицинских препаратов, а также субстратов для производства биотоплива (Хуе et al., 2016).

Одними из наиболее сложных для ферментативного расщепления биополимеров являются фибриллярные белки, выполняющие строительную и защитную функции. Вторичная структура таких белков часто поддерживается большим количеством дисульфидных связей, затрудняющих действие протеаз. К таким белкам относится кератин – основной компонент эпидермиса и его производных, которые являются одними из базовых отходов животноводства. Ферменты, гидролизующие кератин – кератиназы, синтезируют различные группы организмов – бактерии, археи, грибы. Бактериальные кератиназы хорошо изучены, и на их основе разработан ряд коммерческих препаратов разной направленности, однако их применение не удовлетворяет потребностям всех отраслей экономики (Hassan et al., 2020). Микромицеты – известные продуценты комплексов внеклеточных протеаз с широкой субстратной специфичностью. Простота культивирования и способность к расщеплению трудноразлагаемых белковых субстратов делает их перспективным альтернативным источником кератиназ (de Souza et al., 2015).

Данная работа направлена на поиск и изучение новых непатогенных или условно патогенных кератинолитических штаммов микромицетов, применение которых возможно в биодеградации отходов животноводства, а также в качестве продуцентов кератиназ, востребованных в медицине, фармацевтике и других отраслях экономики. Способность микроскопических грибов расти на дешёвых субстратах, в том числе отходах агропромышленного комплекса, и возможность увеличения синтеза целевого продукта за счет применения таких экономически

выгодных и экологичных методов, как твердофазное культивирование, говорят о перспективности данных организмов для биотехнологических и энзиматических исследований.

Таким образом, изучение кератинолитических микромицетов и их протеаз является актуальной задачей современной энзимобиотехнологии и микробиологии, решение которой позволит перейти к рациональному использованию ресурсов, сельскому хозяйству замкнутого типа и расширить представления о возможном применении кератиназ.

Объектами исследования были штаммы микромицетов отдела Ascomycota, выделенные из накопительных культур кератинолитических микроорганизмов, засеянных почвенными образцами, отобранными в курятниках, степной и парковых зонах (Воронежская обл., Республика Крым, г. Москва), а также полученные из коллекций кафедры микробиологии и кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ранее выделенные из различных почв и растительных субстратов (лесных подстилок и листового опада) на территориях средней полосы России, Камчатки и Вьетнама. Всего в работе было использовано 54 культуры микроскопических грибов.

Предметом исследования были способность к секреции кератинолитических ферментов микромицетов, растущих на кератинсодержащих субстратах, а также биохимические и физико-химические свойства этих ферментов. Для расширения рамок научного знания о кератинолитических микромицетах, их протеазах и перспективах их использования в биотехнологической промышленности были применены микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические подходы в изучении кератинолитических культур микроскопических грибов и их протеолитического потенциала.

Целью настоящей работы было отобрать культуры микромицетов, перспективные в качестве источника внеклеточных протеаз с кератинолитической активностью, и изучить некоторые свойства этих культур и их кератинолитических протеаз.

Для выполнения этой цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести скрининг на способность к секреции протеаз с кератинолитической активностью среди коллекционных культур микромицетов путём первичного скрининга на агаризованных средах с белковыми субстратами и вторичного скрининга в глубинных условиях и отобрать наиболее активные штаммы для дальнейших исследований;
2. Выделить чистые культуры микромицетов из накопительных культур кератинолитических микроорганизмов, полученных с использованием в качестве посевного материала почвенных образцов, отобранных в курятниках, степной и парковых зонах (Воронежская обл., Республика Крым, г. Москва), идентифицировать эти культуры по морфолого-культуральным признакам и молекулярно-генетическим методом, а также отобрать среди выделенных культур штаммы с наибольшим кератинолитическим потенциалом;
3. Оптимизировать условия накопления внеклеточных протеаз с кератинолитической активностью отобранных штаммов микромицетов при

- глубинном и твердофазном культивировании продуцентов на различных субстратах – кератин-богатых отходах агропромышленного комплекса;
4. Выделить внеклеточные протеазы с кератинолитической активностью отобранных культур и определить некоторые их биохимические и физико-химические свойства – субстратную специфичность, молекулярную массу и изоэлектрическую точку, рН- и температурный оптимум активности, рН- и температурную стабильность, зависимость уровня активности от некоторых ингибиторов протеаз и наличие углеводного компонента в составе молекул изучаемых ферментов.

Научная новизна работы

В рамках представленной работы проведен обширный скрининг, включивший 54 культуры микромицетов отдела Ascomycota, на способность секретировать протеолитические ферменты, гидролизующие кератин. Среди изучаемых микромицетов были представители 11 родов – *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolypocladium*, *Trichoderma* и *Ulocladium*. 22 штамма микроскопических грибов были выделены в рамках исследования из накопительных культур кератинолитиков, полученных при культивировании почвенных микроорганизмов на куриных перьях. Почвенные образцы для посева были отобраны в курятниках, степной и парковых зонах (Воронежская обл., Республика Крым, г. Москва).

В результате первичного скрининга на агаризованных средах, содержащих целевые белковые субстраты, было отобрано 10 культур с наибольшим кератинолитическим потенциалом (*Aspergillus amstelodami* А6, *A. clavatus* ВКПМ F-1593, *A. ochraceus* ST2, *A. ochraceus* 247, *A. versicolor* C51, *Cladosporium pseudocladosporioides* C66, *C. sphaerospermum* 1779, *Keratinophyton terreum* C106, *Penicillium sizovae* C11 и *Tolypocladium inflatum* ST1). Две культуры, *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1, проявили высокую кератинолитическую активность и при глубинном культивировании. Для этих двух видов грибов впервые была показана способность секретировать кератинолитические протеазы. В том числе впервые была показана способность к синтезу таких ферментов представителем рода *Tolypocladium*.

Впервые показано, что переход с глубинного на твердофазное культивирование штамма *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на отходах животноводства (куриных перьях и свиной щетине) приводит к повышению удельной кератинолитической и казеинолитической активности.

Выделенный новый фермент с кератинолитической активностью микромицета *T. inflatum* ST1 обладал низкой специфичностью к кератину. Впервые показано, что при культивировании *A. clavatus* ВКПМ F-1593 в трёх различающихся условиях (глубинное культивирование на измельченном курином пере, твердофазное культивирование на цельном курином пере и твердофазное культивирование на свиной щетине) образуются 3 протеазы с кератинолитической активностью, рI 9.3 и молекулярной массой 27 кДа, но с разными свойствами. Обе кератиназы, синтезированные на курином пере, были не гликозилированы и показали наибольшую активность с хромогенным пептидным субстратом субтилизиновых протеаз (Z-Ala-Ala-Leu-pNA), не содержащим заряженных аминокислот, что также

характерно для кератина. Кератиназа, полученная при росте продуцента на щетине, была гликозилирована и обладала наибольшим сродством с субстратом H-D-Val-Leu-Lys-pNA, что объясняет её меньшую кератинолитическую активность при высокой казеинолитической активности.

Новые ферменты с кератинолитической активностью штамма *A. clavatus* ВКПМ F-1593 могут быть применены в различных отраслях экономики (медицинской, косметологической, кожевенной) благодаря высокой активности и возможности получения протеаз с различными свойствами при регулировании условий роста продуцента. Данные по культивированию коллекционного штамма *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и нового выделенного нами штамма *T. inflatum* ST1 на кератинсодержащих отходах позволяют считать их перспективными для использования в качестве деструкторов таких отходов, что требует дальнейшего подробного изучения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретический вклад данной работы заключается в изучении новых продуцентов-микросциетов кератинолитических ферментов, в обобщении и систематизации полученных данных. В работе представлен комплексный подход к изучению как продуцентов – микросциетов, так и образуемых ими комплексов протеаз, что дает возможность расширить имеющиеся знания в этой области.

Практическая значимость работы основывается на востребованности кератинолитических микроорганизмов и их целевых ферментов в биодеградациии отходов, медицине, фармацевтике, кожевенной и текстильной промышленности. Полученные данные о микросциетах с кератинолитической активностью и их протеазах являются важной основой для разработки коммерческих препаратов кератиназ и использования самих продуцентов в сфере биодеградациии отходов.

Методология и методы исследования

Автором выполнен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по тематике работы. Проведение экспериментальной части работы проходило с привлечением системного подхода и включало в себя современные методы исследования в области микробиологии, молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способность к росту на кератинсодержащих субстратах широко распространена среди микросциетов родов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* и *Penicillium*;
2. Проявление кератинолитической и казеинолитической активности и их соотношение у изученных микросциетов зависят как от природы кератинсодержащего субстрата (куриные перья или свиная щетина) и наличия дополнительного источника азота, так и от способа культивирования продуцента (глубинное, твердофазное или в иммобилизованном состоянии);
3. Новые кератинолитические протеазы, синтезируемые продуцентами *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1 при оптимальных для них способах и условиях культивирования, различаются своими физико-химическими

- свойствами, оптимумами активности и стабильности, а также специфичностью к субстрату;
4. Различия в активности, субстратной специфичности и строении ферментов изученных продуцентов указывают на высокое разнообразие кератинолитических протеаз, синтезируемых грибами отдела Ascomycota. Возможность контролировать и изменять свойства секретируемых кератиназ за счет регуляции условий культивирования *A. clavatus* ВКПМ F-1593 может способствовать разработке нескольких разнонаправленных коммерческих препаратов.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов основана на проведении достаточного количества повторностей экспериментов и их воспроизводимостью. Использование в работе различных микробиологических, биохимических, молекулярно-биологических, биотехнологических и статистических методов и подходов позволило комплексно подойти к решению поставленных задач. Достоверность результатов также подтверждена публикациями в высокорейтинговых рецензируемых международных журналах.

Структура диссертации

Работа состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Заключение, Список литературы и Приложение. Работа изложена на 129 страницах, содержит 12 таблиц, 43 рисунка, 267 литературных источника (4 - на русском и 263 - на английском языке) и 4 приложения.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы опубликованы в высокорейтинговых журналах, а также запатентованы. Автором были сделаны доклады на российских и зарубежных конференциях: IX Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика», 2021, Ялта (Россия), устный; the 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology, 2021, Берлин (Германия), стендовый; BioTech 2020 & 8th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, 2021, Прага (Чехия), стендовый; Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, 2022, Германия, стендовый; 8th EUROBIOTECH Congress, 2022, Польша, стендовый; FEMS Conference on Microbiology, 2022, Белград (Сербия), стендовый; Всероссийская научной молодежная конференция "Геномика и биотехнология микроорганизмов", 2022, Владивосток (Россия), устный; Исследования молодых ученых в биологии и экологии, 2023, Саратов (Россия), стендовый; XIII Международная научная конференция Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты, 2023, Минск (Беларусь), устный.

Личный вклад автора

Автором были самостоятельно получены и обработаны все изложенные результаты, представленные в работе, также проведен анализ научной литературы в изучаемой области и опубликованы результаты проведенной работы.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, среди которых 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова и один патент РФ на изобретение. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Осмоловскому Александру Андреевичу за помощь, поддержку и чуткое руководство на протяжении всей работы, всему научному коллективу группы по изучению протеолитических ферментов микромицетов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, а также Поповой Елизавете Андреевне, Александровой АLINE Витальевне и Леонтьевой Марии Романовне за помощь в осуществлении работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы состоит из пяти глав. В главе 1 представлен общий обзор белков кератинов, их видов и свойств. Глава 2 посвящена кератинолитическим ферментам, их свойствам и продуцентам. Особое внимание уделяется биохимическим и физико-химическим характеристикам кератиназ, полученных из широкого спектра источников, и перспективам их применения в различных отраслях экономики. В главах 3 и 4 описаны сферы и способы применения кератинов и их гидролизатов соответственно. Подробно разобраны актуальные примеры возможного использования этих белков в биомедицине и биотехнологических процессах. В главе 5 рассмотрены грибы как продуценты кератинолитических ферментов. Особое внимание уделено способам получения протеаз, гидролизующих кератин, и методам увеличения выхода целевого продукта при культивировании микромицетов-кератинолитиков.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были микромицеты отдела Ascomycota, выделенные из различных почв и растительных субстратов (лесных подстилок и листового опада) на территориях средней полосы России, Камчатки и Вьетнама и полученные из коллекций кафедры микробиологии и кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Всего в работе были использованы 32 коллекционных штамма микроскопических грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* и *Chaetomium*.

Также для расширения группы, исследуемых объектов, были выделены и идентифицированы новые штаммы микромицетов из накопительных культур кератинолитических микроорганизмов, засеянных почвенными образцами, отобранными в курятниках, степной и парковых зонах (Воронежская обл., Республика Крым, г. Москва). Всего было выделено 22 штамма грибов, относящихся к 8 родам отдела Ascomycota, а именно *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolyptocladium* и *Trichoderma*.

Поддержание культур осуществляли на скошенном сусло-агаре или агаризованной среде Чапека при хранении в комнатных условиях (25°C).

Выделение чистых культур кератинолитических микромицетов и их идентификация по морфолого-культуральным признакам. Пробы почвы и органического настила отбирали на территориях частных фермерских хозяйств, степной и парковых зонах (Воронежская область, Республика Крым и г. Москва). Пробы использовали в качестве посевного материала для получения накопительных культур кератинолитических микроорганизмов. Основным источником органических углерода и азота служили куриные перья (0.7 г), к которым добавляли 10 мл питательной среды следующего состава, %: NaNO₃ - 0.3, K₂HPO₄ - 0.1, MgSO₄ - 0.05, KCl - 0.05, FeSO₄ - 0.001, пептон - 0.1. Культивирование проводили в статических условиях при 28°C в течение 1 месяца. Затем путём посева последовательных разведений на агаризованную среду Чапека с добавлением смеси антибиотиков (хлортетрациклин и гентамицин) выделяли чистые культуры микромицетов.

Первичную идентификацию выделенных культур осуществляли по морфолого-культуральным признакам. При идентификации работали с культурами, посеянными тремя уколами на агаризованные среды, рекомендованные как стандартные для исследуемых групп грибов. Для идентификации у культур описывали культуральные и микроскопические признаки. Для идентификации по морфологическим признакам использовали определители, а также статьи, содержащие обработки отдельных родов и описания новых видов (Fungal Biodiversity, 2009; Food and Indoor Fungi, 2010; Houbraken et al., 2011; Bensch et al., 2012; Crous et al., 2021; Dong et al., 2022). Наименования видов и систематическое положение дано в соответствии с базой данных The MycoBank Fungal databases (<http://www.mycobank.org>).

Молекулярно-генетическая идентификация микромицетов. Для наиболее активных культур микроскопических грибов была дополнительно проведена молекулярно-генетическая идентификация. Геномную ДНК из штаммов грибов выделяли с помощью набора DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Праймеры для ПЦР подбирали для каждой культуры с учетом особенностей таксономического положения. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе FT3000 (GeneMind Biosciences, Китай). Для анализа сиквенсов использовали специализированную компьютерную программу BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Последовательности для филогенетического анализа из базы данных NCBI Genbank анализировали с помощью программы MEGA ver. 10.0 (Kumar et al., 2018). Филогенетическое дерево на основе генов LSU рРНК и β-тубулина (*benA*) было построено с использованием метода максимального правдоподобия и модели Тамура-Нея.

Первичный скрининг микромицетов. Для отбора штаммов микромицетов, наиболее перспективных в качестве источников внеклеточных протеаз, расщепляющих труднорастворимые белки, определяли энзиматические индексы культур по зонам гидролиза при росте микроскопических грибов на средах, содержащих в качестве основного источника углерода и азота казеин по Хаммерштайну, желатин, или кератина шерсти. Энзиматические индексы (EI) рассчитывали по формуле: $EI = d_2/d_1$, где d_1 – диаметр колонии (мм), а d_2 – диаметр

зоны гидролиза (мм). Измерения проводили на 7 сутки роста культур после проявления зон гидролиза 10% трихлоруксусной кислотой (ТХУ).

Вторичный скрининг коллекционных штаммов микромицетов проводили в глубинных условиях при перемешивании на орбитальных качалках (200 об/мин) и 28°C с использованием модифицированной среды Чапека, содержащих кератин шерсти, NaNO_3 или их смесь как источник азота. На 3 и 7 сутки роста в культуральной жидкости измеряли казеинолитическую и кератинолитическую активность спектрофотометрически. Для оптимизации получения целевых ферментов наиболее активного штамма осуществляли культивирование в тех же условиях, добавляя в среды кератин шерсти, цельное куриное перо или перемолотое куриное перо.

Скрининг микромицетов при глубинном культивировании на отходах сельского хозяйства. Штаммы микромицетов, выделенные из накопительных культур и показавшие наибольшие значения ЕІ, а также коллекционные штаммы микроскопических грибов, отобранные в результате вторичного скрининга, культивировали в жидких средах, содержащих отходы сельского хозяйства, в условиях, описанных выше. Сначала споровую суспензию, полученную смывом культуры гриба с семидневного скошенного сусло-агара или агаризованной среды Чапека, использовали как посевной материал для культивирования в посевной среде, богатой сахарами (в %: сусло – 6.7, глюкоза – 2.0, пептон – 0.1), а на 2 сутки культивирования (в случае микроспоровых грибов – на 3 сутки) 3% биомассы по объему переносили в 7 модифицированных жидких сред Чапека, содержащих помимо стандартного минерального фона источники азота: NaNO_3 (3.0 г/л), перемолотое куриное перо (5 г/л) и измельченную свиную щетину (5 г/л), а также их комбинации. Кератинолитическую и казеинолитическую активность измеряли на 3 и 7 сутки культивирования.

Методы и условия культивирования продуцентов для оптимизации получения целевых ферментов. Изучали влияние твердофазного культивирования (ТФК) и глубинного культивирования в иммобилизованном состоянии на накопления кератиназ наиболее активных штаммов. В качестве иммобилизующего агента использовали 3.5% альгинат кальция и 3% каррагинан, а при твердофазных условиях проводили культивирование на вермикулите, курином пере и свиной щетине.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) была использована для изучения степени гидролиза проб кератинсодержащих субстратов после ТФК. В качестве контроля использовали образцы кератинсодержащих субстратов до и после автоклавирования, не засеянные микромицетом.

Определение протеолитической активности. Кератинолитическую и казеинолитическую активность внеклеточных протеаз определяли с использованием 1% суспензий кератина шерсти и казеина по Хаммерштайну соответственно. Реакции останавливали 10% ТХУ. Количество образовавшихся свободных ароматических аминокислот измеряли спектрофотометрически. Аналогичным способом исследовали активность ферментов по отношению к хромогенным пептидным субстратам (ХПС), гидролиз которых прерывали добавлением к реакционной смеси 50% уксусной кислоты.

Комплексный препарат внеклеточных белков получали из культуральной жидкости или элюата, предварительно отделенных от биомассы путем фильтрования, за счет осаждения белков сульфатом аммония при 85% насыщении (608 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 1 л культуральной жидкости). Осадок формировался не менее 48 часов при 4°C, затем его отделяли центрифугированием и диализовали в диализных мешочках против 0.005 М Трис-НСl-буфера на холоду в течение 24 часов на магнитной мешалке. Отдиализованный раствор центрифугировали для удаления нерастворимой части осадка. Супернатант замораживали жидким азотом в круглодонной колбе и лиофильно высушивали под вакуумом. Лиофилизированный препарат хранили при -20°C.

Изоэлектрофокусирование комплексного препарата внеклеточных белков. Для разделения белков комплексного препарата и их дальнейшего изучения проводили изоэлектрофокусирование (ИЭФ) по методу Вестерберга при 4°C в градиенте рН амфолинов и градиенте плотности сахарозы 0-40% в колонке объемом 110 мл при напряжении 800 В в течение 36 часов. После ИЭФ содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1.5 мл при 4°C с помощью коллектора фракций. Во фракциях измеряли рН, количество белка спектрофотометрически при длине волны 280 нм и ферментативную активность. Фракции хранили при -20°C.

Ступенчатый денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле. Для определения чистоты ферментов во фракциях после ИЭФ проводили ступенчатый денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия по методу Лэммли (Laemmly, 1970).

Проведение ингибиторного анализа. Для изучения влияния ингибиторов на активность кератинолитических ферментов использовали фенолметилсульфонилфторид (PMSF; 1.5 мМ), этилендиаминтетраацетат натрия (EDTA; 1.0 мМ), п-хлормеркурийбензоат (PCMB; 1.0 мМ), N-р-тозил-L-фенилаланин хлорметилкетон (TPCK; 0.5 мМ), тозил-L-лизин хлорометил-N-альфа кетон гидрохлорид (TLCK; 0.5 мМ), соевый ингибитор трипсина (SBTI; 0.5 мг/мл). Начальную и остаточную активность фермента определяли при проведении реакции с ХПС.

Определение гликозилирования белков методом дот-блоттинга. Для выявления наличия углеводного компонента изучаемых кератиназ проводили анализ на определение гликозилирования белков с реактивом Шиффа на нитроцеллюлозной бумаге. В качестве положительного контроля использовали инвертазу дрожжей, в качестве отрицательного контроля – бычий сывороточный альбумин.

Оптимальную температуру активности выделенных кератиназ анализировали в диапазоне температур 25–65°C при проведении реакций с ХПС и кератином. Полученные результаты выражали в процентах от максимального значения.

Термостабильность фермента оценивали путем предварительной инкубации образца в течение 2 часов при различных температурах перед проведением реакции. Остаточную активность выражали в процентах от активности фермента в тех же условиях без предварительной инкубации.

Оптимальный рН для активности изучаемых кератиназ определяли путем проведения ферментативных реакций со смесью (1:1, по объему) протеазы и 0.4 М универсального буфера (натрий-ацетатный/фосфатно-боратный буфер, рН 3.0–11.0) с соответствующим значением рН. Оставшуюся протеолитическую активность анализировали, как упоминалось ранее, с ХПС и кератином. Полученные результаты выражали в процентах от максимального значения.

Для **определения рН-стабильности** кератиназ смесь фермента и буфера предварительно инкубировали в течение 2 часов при 37°C и 600 об/мин перед анализом протеолитической активности. Остаточную активность выражали в процентах от активности фермента в тех же условиях без предварительной инкубации.

Статистический анализ. Эксперименты проводили в трех повторностях, погрешность не превышала 5-7%. Данные были статистически обработаны с использованием MS Excel 2019 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовался U-критерий Манна-Уитни; различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Основные результаты и обсуждение

Первичный и вторичный скрининги коллекционных штаммов микромицетов. Для оценки потенциала изучаемых штаммов в качестве продуцентов внеклеточных протеаз, перспективных для биodeградации, были рассчитаны их энзиматические индексы при росте на трёх агаризованных средах, содержащих казеин ($EI_{каз.}$), кератин ($EI_{кер.}$) и желатин ($EI_{жел.}$). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, некоторые представители родов *Aspergillus*, *Cladosporium* и *Penicillium* являются активными продуцентами внеклеточных протеаз, что согласуется с данными литературы и делает их интересными объектами для исследований в области биотехнологии, однако лишь 10 культур микромицетов из 32 показали возможность к гидролизу кератина. Для следующего этапа исследования были отобраны штаммы с высокими значениями энзиматических индексов на всех трёх средах, а именно *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* А6, *A. ochraceus* 247 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779.

Вторичный скрининг проводили в глубинных условиях с четырьмя отобранными культурами. Для культивирования микромицетов использовали три среды, различающиеся источниками азота. Среда №1 содержала кератин, среда №2 – кератин и нитрат натрия, а в среде №3 был только источник неорганического азота – нитрат натрия. В культуральной жидкости измеряли казеинолитическую (общую протеолитическую) и кератинолитическую активность на третьи и седьмые сутки культивирования (рис. 1).

Таблица 1.

Энзиматические индексы коллекционных штаммов микромицетов на средах с различными белковыми субстратами

Культура	ЕI _{каз.}	ЕI _{кер.}	ЕI _{жел.}
<i>Aspergillus aculeatus</i> A2	1.00	1.00	1.00
<i>A. alliaceus</i> 7dN1	1.06	1.00	1.09
<i>A. amstelodami</i> A6	1.59	2.00	1.48
<i>A. candidus</i> A4	1.55	1.00	1.54
<i>A. chevalieri</i> 1197	1.09	1.13	1.14
<i>A. chevalieri</i> 1205	1.10	1.13	1.15
<i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593	1.95	1.39	2.21
<i>A. crustosus</i> A29	1.44	1.00	1.66
<i>A. fischeri</i> A11	1.03	1.06	1.00
<i>A. flavus</i> 4059	1.30	1.00	1.49
<i>A. janus</i> A17	1.33	1.00	1.55
<i>A. niger</i> 443	1.00	1.00	1.00
<i>A. niger</i> 3640	1.00	1.00	1.00
<i>A. niger</i> GS	1.00	1.00	1.00
<i>A. ochraceus</i> 247	1.29	1.25	1.77
<i>A. raperi</i> A13	1.20	1.00	1.43
<i>A. sydowii</i> 1	1.15	1.12	1.37
<i>A. sydowii</i> 21	1.18	1.08	2.29
<i>A. unguis</i> 16	1.89	1.00	1.90
<i>A. unguis</i> 2167	1.64	1.00	1.73
<i>A. ustus</i> 1	1.13	1.00	1.43
<i>A. ustus</i> A9	1.11	1.00	1.56
<i>Chaetomium globosum</i> 2382	1.00	1.00	1.00
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> 1779	2.18	1.33	2.57
<i>C. sphaerospermum</i> 3118	1.94	1.10	2.80
<i>Paecilomyces varoitii</i> 444	1.00	1.00	1.00
<i>P. varoitii</i> 2228	1.00	1.00	1.00
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> 20	1.66	1.00	1.77
<i>P. chrysogenum</i> 1	1.31	1.00	1.49
<i>P. chrysogenum</i> 24	1.40	1.00	1.70
<i>P. expansum</i> 31	1.50	1.00	1.00
<i>Ulocladium botrytis</i> 4037	1.09	1.00	1.11

Было показано, что состав использованных сред не подходит для накопления внеклеточных ферментов с кератинолитической и казеинолитической активностью штаммом *C. sphaerospermum* 1779. Максимальная активность экзопротеаз микромицета *A. ochraceus* 247 (кератинолитическая – 22.7 Е, казеинолитическая – 32.4 Е) наблюдалась при культивировании микроорганизма на среде с единственным источником азота – нитратом натрия. Добавление в среду кератина снижало синтез кератиназ незначительно, тогда как выход ферментов, гидролизующих казеин, на седьмые сутки уменьшался на 40%, что может свидетельствовать об увеличении

специфичности внеклеточных протеаз при культивировании штамма в присутствии индуктора. Наибольшая активность протеолитических ферментов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *A. amstelodami* А6 достигалась при культивировании микромицетов на среде с двумя источниками азота – кератином и нитратом натрия, при этом на седьмые сутки культивирования активность кератиназ *A. clavatus* ВКПМ F-1593 (42.5 Е) превышала активность кератиназ *A. amstelodami* А6 (26.1 Е), а казеинолитическая активность на те же сутки *A. amstelodami* А6 (34.2 Е) превосходила значения внеклеточных протеаз *A. clavatus* ВКПМ F-1593 (29.5 Е), что может говорить о большей специфичности кератинолитических ферментов культуры *A. clavatus* ВКПМ F-1593.

Наибольшие значения кератинолитической активности, как на третьи, так и на седьмые сутки, показал штамм *A. clavatus* ВКПМ F-1593 при культивировании на среде №2. Именно эта культура была отобрана для дальнейших исследований. Определение динамики накопления целевых ферментов при двухстадийном глубинном культивировании на различных кератиновых субстратах показало, что максимум активности протеаз *A. clavatus* ВКПМ F-1593 достигается на 4 сутки культивирования на среде с перемолотым куриным пером.

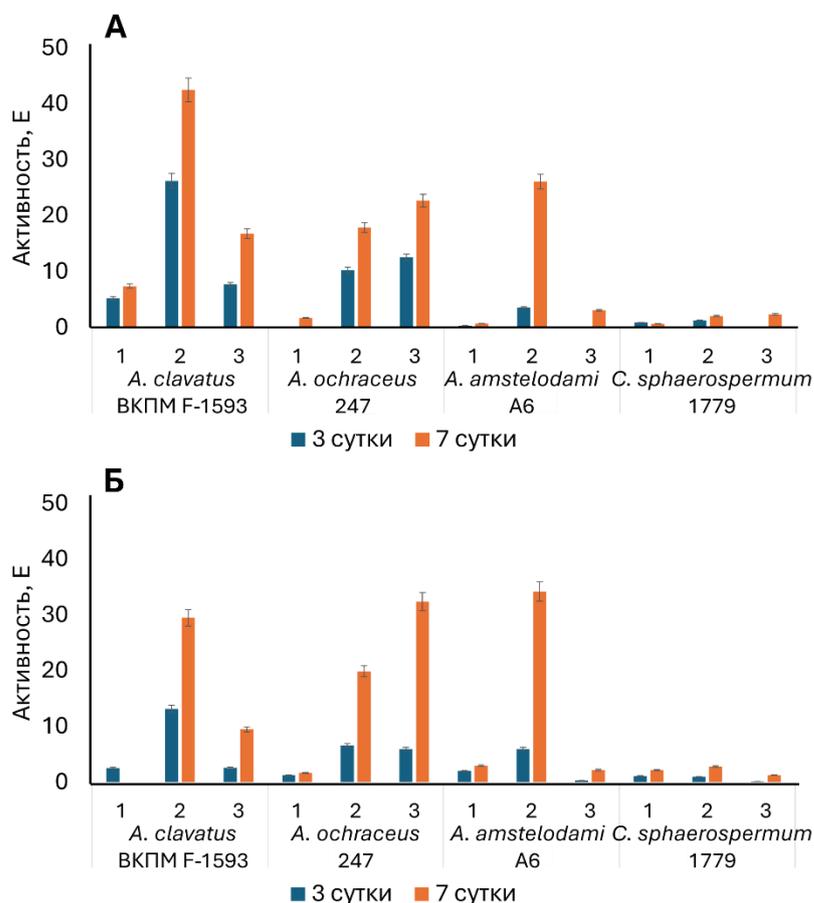


Рис. 1. Протеолитическая активность микромицетов *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. ochraceus* 247, *A. amstelodami* А6 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779 при культивировании на средах с различными источниками азота: 1 – среда с кератином, 2 – среда с кератином и нитратом натрия, 3 – среда с нитратом натрия: А – кератинолитическая активность, Б – казеинолитическая активность.

Выделение чистых культур кератинолитических микромицетов из накопительных культур и их первичный скрининг. Были выделены и идентифицированы 22 новых штамма микромицетов из накопительных культур кератинолитических микроорганизмов, засеянных почвенными образцами, отобранными в курятниках, степной и парковых зонах (Воронежская обл., Республика Крым, г. Москва). Выделенные культуры относились к 8 родам отдела Ascomycota, а именно *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolyposcladium* и *Trichoderma*.

Для оценки потенциала выделенных штаммов в качестве продуцентов внеклеточных протеаз были рассчитаны их энзиматические индексы при росте на трёх агаризованных средах, содержащих казеин (EI_{каз.}), кератин (EI_{кер.}) и желатин (EI_{жел.}). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Энзиматические индексы выделенных штаммов микромицетов на средах с различными белковыми субстратами

Место отбора пробы	Культура	EI _{каз.}	EI _{кер.}	EI _{жел.}
Ковыльная степь, Воронежская область	<i>Fusarium solani</i> C1	1.00	1.00	1.10
	<i>Penicillium sizovae</i> C11	2.00	1.32	2.80
	<i>Tolyposcladium inflatum</i> ST1	1.67	1.10	1.37
Пойма реки Тихая Сосна, Воронежская область	<i>Aspergillus ochraceus</i> ST2	1.71	1.29	2.10
	<i>Fusarium oxysporum</i> C2w	1.00	1.00	1.00
	<i>Pseudallescheria boydii</i> C2g	1.00	1.00	1.00
	<i>Trichoderma citrinoviride</i> C2y	1.00	1.00	1.00
Курятник, с. Пшеничное, Нижегородский район, Крым	<i>Aspergillus niger</i> C8A	1.09	1.00	1.00
	<i>Aspergillus sydowii</i> C7A	2.59	1.00	1.00
	<i>Aspergillus versicolor</i> C72L	3.76	1.00	3.75
	<i>Fusarium solani</i> C71	1.00	1.00	1.09
	<i>Keratinophyton terreum</i> C106	1.34	1.43	1.07
Курятник, с. Укромное, Симферопольский район, Крым	<i>Aspergillus sydowii</i> C5	2.04	1.00	2.20
	<i>Aspergillus versicolor</i> C51	2.67	1.24	1.00
	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> C66	2.77	1.42	2.03
	<i>Fusarium solani</i> C41	1.00	1.00	1.07
	<i>Penicillium commune</i> C4	2.75	1.15	1.00
Парковая зона, Москва	<i>Fusarium oxysporum</i> A1	1.00	1.00	1.13
	<i>Fusarium solani</i> A2	1.00	1.00	1.00
	<i>Fusarium solani</i> A3	1.00	1.00	1.12
	<i>Fusarium solani</i> A4	1.13	1.00	1.11
	<i>Penicillium citreonigrum</i> G4	2.62	1.13	1.83

Из всех накопительных культур были выделены представители рода *Fusarium*, однако значения их EI при росте на трёх используемых средах значимо не превышали 1. Скорее всего, это свидетельствует о том, что эти грибы в сообществе

задействованы не на первом этапе кератинолиза, который требует высокой протеолитической активности и способности гидролизовать нативный кератин. Также часто встречающимися среди выделенных грибов оказались микромицеты двух родов – *Aspergillus* и *Penicillium*. Однако лишь 5 культур показали высокую кератинолитическую активность, а именно *Aspergillus ochraceus* ST2 (1.29), *Aspergillus versicolor* C51 (1.24), *Cladosporium pseudocladosporioides* C66 (1.42), *Keratinophyton terreum* C106 (1.43) и *Penicillium sizovae* C11 (1.32). Штамм *Tolypocladium inflatum* ST1 показал умеренную кератинолитическую активность (1.10), однако раньше не было сообщений о способности представителей этого рода гидролизовать кератин. Поэтому *T. inflatum* ST1 и 5 наиболее активных культур были отобраны для дальнейших работ.

Молекулярно-генетическая идентификация микромицетов. Для отобранных культур микромицетов (*A. ochraceus* ST2, *A. versicolor* C51, *C. pseudocladosporioides* C66, *K. terreum* C106, *P. sizovae* C11 и *T. inflatum* ST1) была дополнительно проведена молекулярно-генетическая идентификация и построена филогенетические дендрограммы (рис. 2), которая подтвердила результаты идентификации по морфолого-культуральным признакам.

Скрининг отобранных микромицетов при глубинном культивировании на различных отходах сельского хозяйства. Для оптимизации получения целевых ферментов отобранные штаммы микромицетов (*Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. ochraceus* ST2, *A. versicolor* C51, *C. pseudocladosporioides* C66, *K. terreum* C106, *P. sizovae* C11 и *T. inflatum* ST1) культивировали на 7 модифицированных жидких средах Чапека, содержащих помимо стандартного минерального фона источники азота: нитрат натрия (3.0 г/л) перемолотое куриное перо (5 г/л) и измельченную свиную щетину (5 г/л), а также их комбинации. Кератинолитическую и казеинолитическую активность измеряли на 3 и 7 сутки культивирования.

Было показано, что условия проведения культивирования не подходят для накопления целевых внеклеточных протеаз культурами *C. pseudocladosporioides* C66 и *P. sizovae* C11. Максимум кератинолитической (32.1 Е) и казеинолитической (75.0 Е) активности микромицета *A. ochraceus* ST2 приходился на 7 сутки культивирования на среде, содержащей измельченную щетину в качестве единственного источника азота. А штамм *A. versicolor* C51 проявлял кератинолитическую активность только на 7 сутки на средах с нитратом (30.7 Е), нитратом и перемолотым пером (19.0 Е), а также нитратом и измельченной щетиной (33.2 Е), что говорит о необходимости наличия минерального азота в питательной среде при синтезе внеклеточных кератиназ этой культурой.

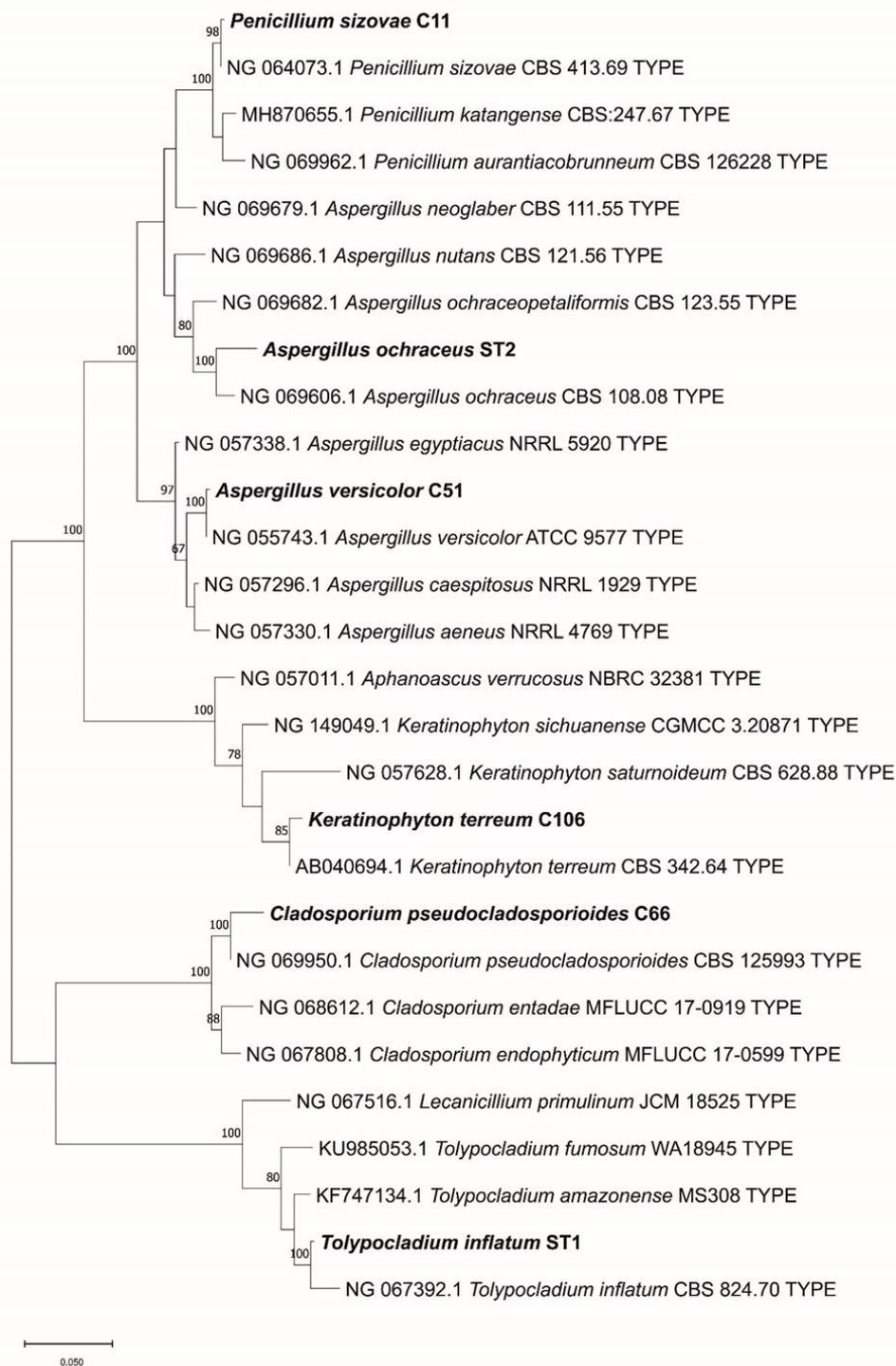


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, основанная на последовательностях D1/D2 доменов большой субъединицы (26S) генов рибосомной РНК. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия в программе MEGA 10.0. Bootstrap-анализ был выполнен с использованием 1000 повторений. Указаны значения выше 70%.

Наибольшие значения целевой активности были получены при культивировании *K. terreum* C106, *T. inflatum* ST1 и *A. clavatus* ВКПМ F-1593. Максимальный уровень кератинолитической (74.2 Е) и казеинолитической (94.4 Е) активности *K. terreum* C106 был получен при росте продуцента на среде с нитратом натрия и перемолотым куриным пером на 3 сутки культивирования. Активность снижалась практически до нуля уже к 7 суткам культивирования. Штамм *T. inflatum* ST1 проявил наибольшую кератинолитическую (87.1 Е) и казеинолитическую (167.1 Е) активность уже на 3 сутки культивирования на среде, содержащей только органические источники азота и углерода - перемолотое куриное перо и измельченную свиную щетину. Помимо того, что именно эта культура показала самые высокие значения целевой активности, уровень её ферментативной активности к 7 суткам культивирования снизился менее, чем на 20%. Максимум накопления кератинолитических ферментов микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 (52.3 Е) наблюдался на 3 сутки культивирования на среде с нитратом, перемолотым пером и измельченной щетиной, что подтверждает ранее полученные результаты о том, что данной культуре для эффективной секреции кератиназ необходим смешанный источник азота (органический и неорганический). При этом казеинолитическая активность *A. clavatus* ВКПМ F-1593 составляла 111.9 Е. На 7 сутки культивирования кератинолитическая активность *A. clavatus* ВКПМ F-1593 составляла 37% от активности на 3 сутки, а казеинолитическая – 47%.

T. inflatum ST1 и *A. clavatus* ВКПМ F-1593 были отобраны для дальнейших исследований.

Изучение динамики накопления целевых протеаз *T. inflatum* ST1 на ферментационной среде с перемолотым куриным пером и измельченной свиной щетиной показало, что максимум кератинолитической активности (78.8 Е) приходится на 4 сутки культивирования. Важно отметить, что уже ко 2 суткам роста продуцента кератинолитическая активность достигает более 50% от максимального уровня, а снижение целевой активности к 8 суткам культивирования незначительно – менее 15%. Профиль динамики накопления секретлируемых казеинолитических ферментов штамма *T. inflatum* ST1 совпадал с таковым для кератинолитической активности.

Для оптимизации получения целевых ферментов изучали синтез кератиназ в условиях твердофазного культивирования продуцентов и глубинного культивирования при иммобилизации микромицетов. Рост культур осуществлялся на подобранных ранее средах. Кератинолитическую и казеинолитическую активность измеряли на 3 и 7 сутки культивирования в культуральной жидкости или элюате в случае ТФК.

При иммобилизации культуры *T. inflatum* ST1, а также при ее твердофазном культивировании активность целевых ферментов снижалась, в связи с этим было принято решение проводить дальнейшие работы с ферментами микромицета *T. inflatum* ST1, полученными при глубинном культивировании.

При иммобилизации *A. clavatus* ВКПМ F-1593 максимум активности достигался на 7 сутки культивирования. При использовании каррагинана кератинолитическая активность составляла 42.1 Е, а казеинолитическая – 48.0 Е. Активность продуцента при иммобилизации в альгинате кальция была еще ниже:

кератинолитическая – 33.8 Е, казеинолитическая – 44.1 Е. В случае использования ТФК для наработки ферментов микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 в качестве наиболее подходящих субстратов для роста продуцента показали себя куриное перо и свиная щетина. При культивировании микромицета на курином пере на 3 сутки роста кератинолитическая активность составляла 55.2 Е, а казеинолитическая – 73.4 Е. Несмотря на падение казеинолитической активности более, чем на 30% в сравнении с глубинным культивированием, кератинолитическая активность осталась на том же уровне. При росте продуцента на свиной щетине на 3 сутки культивирования кератинолитическая активность составляла 78.0 Е, что в 1.5 раза превышает результаты, полученные при глубинном культивировании, а казеинолитическая – 59.1 Е. Очевидно, что обе вариации ТФК приводят к оптимизации получения кератинолитических ферментов микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593. Именно эти условия наработки целевых ферментов были использованы для дальнейшей работы.

Чтобы определить наилучшие условия для получения целевых ферментов микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 при твердофазном культивировании были изучены динамики накопления протеаз. Было показано, что максимум кератинолитической активности приходится на 4 сутки культивирования продуцента на куриных перьях, тогда как при росте на свиной щетине пик кератинолитической активности сдвигается на 2-3 сутки. Удельная кератинолитическая активность, рассчитанная на мл питательной среды, при ТФК на пере почти в 9 раз превышает активность при глубинном культивировании, а при ТФК на щетине – почти в 14 раз. Разложение кератиновых отходов сельского хозяйства было отмечено визуально и подтверждено при помощи СЭМ (рис. 3).

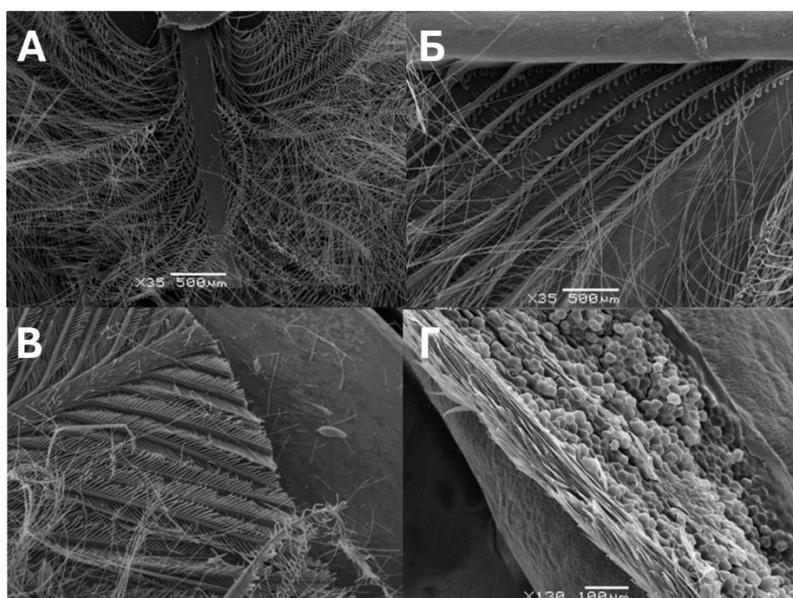


Рис. 3. СЭМ куриного пера после культивирования *A. clavatus* ВКПМ F-1593: А – контроль, Б – 2 сутки, В – 3 сутки, Г – 7 сутки.

Получение ферментных препаратов и выделение кератинолитических протеаз. Для дальнейшего изучения свойств грибных протеаз с кератинолитической активностью получали комплексные препараты внеклеточных белков путем их высаливания из культуральной жидкости (или элюата) сульфатом аммония на 4 сутки

глубинного культивирования *T. inflatum* ST1 на среде с перемолотым куриным пером и измельченной свиной щетиной, а также на 4 сутки глубинного культивирования *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на среде с нитратом, перемолотым куриным пером и гидролизатом рыбной муки, на 4 сутки роста этого продуцента при ТФК на курином пере и 3 сутки роста при ТФК на свиной щетине.

Комплексный препарат внеклеточных белков *T. inflatum* ST1 разделяли методом ИЭФ в градиенте рН амфолинов 3.0-10.0. Наибольшая протеолитическая активность приходилась на фракции с рН 5.6 (казеинолитическая – 114.9 Е; кератинолитическая – 21.1 Е), (рис. 3). Высокие значения казеинолитической активности могут свидетельствовать о неспецифичности изучаемой протеазы *T. inflatum* ST1 по отношению к кератину. Чистоту фермента с молекулярной массой около 31 кДа подтверждали методом денатурирующего электрофореза в ПААГ (рис. 4).

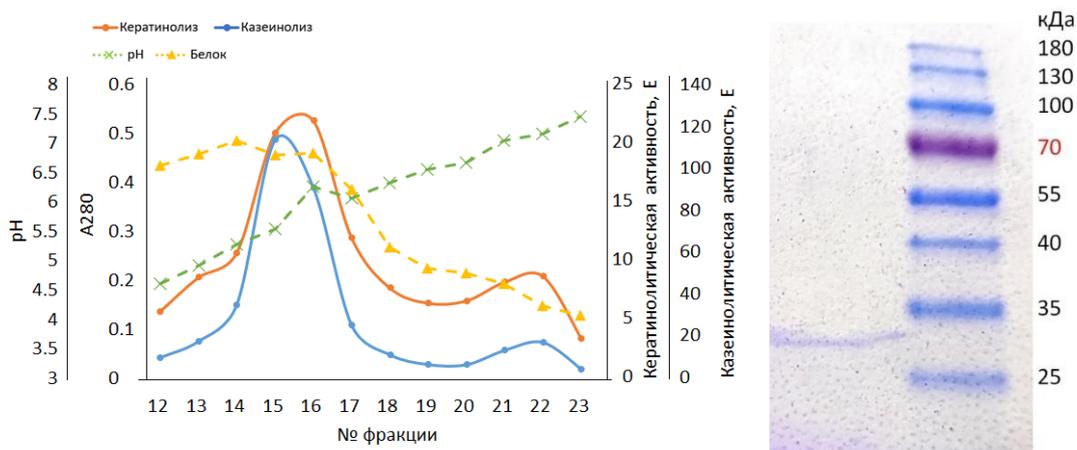


Рис. 4. ИЭФ ферментного препарата *T. inflatum* ST1 в интервале рН амфолинов 3.0-10.0 (слева) и электрофореграмма кератиназы *T. inflatum* ST1 (денатурирующий электрофорез в ПААГ), (справа).

ИЭФ ферментного препарата *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученного при глубинном культивировании, показало наличие протеазы с кератинолитической (36.6 Е) и казеинолитической (30.9 Е) активностью во фракциях с рН 9.3, также являвшимися пробами с максимальным количеством белка (рис. 4). Чистота кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с молекулярной массой около 27 кДа была подтверждена методом денатурирующего электрофореза в ПААГ (рис. 5).

Комплексный препарат внеклеточных белков *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученный при росте продуцента на куриных перьях в условиях ТФК, также разделяли методом ИЭФ. Было показано наличие высокой протеолитической активности во фракциях с рН 9.5 (казеинолитической – 99.0 Е; кератинолитической – 60.5 Е), чистота фермента с молекулярной массой около 27 кДа была подтверждена методом денатурирующего электрофореза (рис. 6).

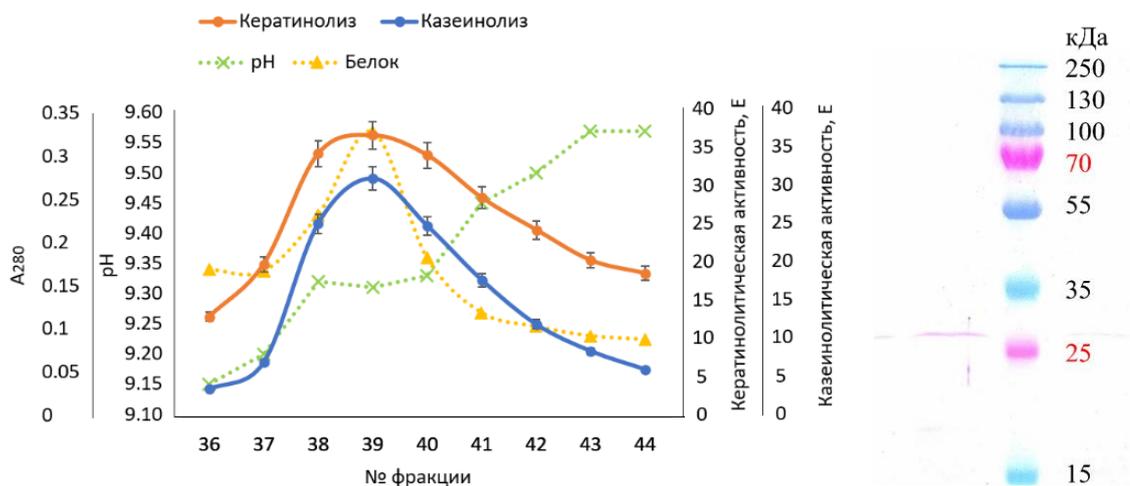


Рис. 5. ИЭФ ферментного препарата *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанного при глубинном культивировании продуцента, в интервале рН амфолинов 8.0-10.5 (слева) и электрофореграмма кератиназы с рI 9.3 (денатурирующий электрофорез в ПААГ), (справа).

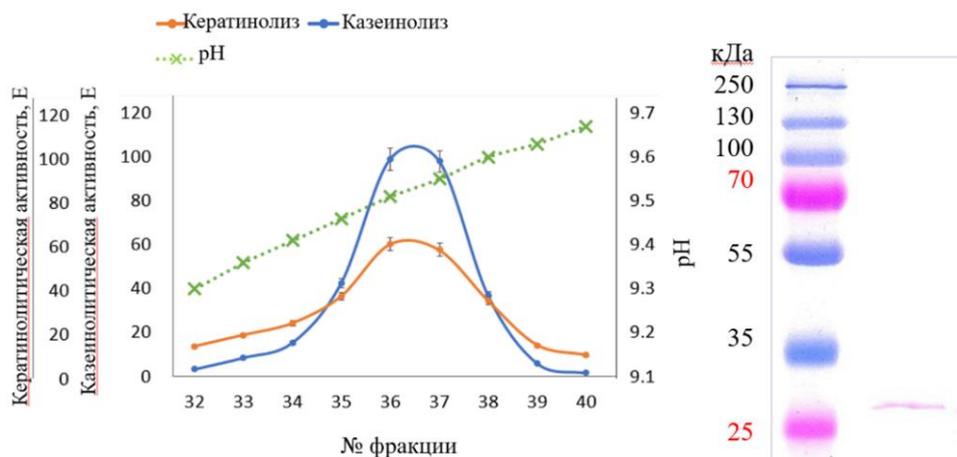


Рис. 6. ИЭФ ферментного препарата *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанного путём ТФК продуцента на куриных перьях, в интервале рН амфолинов 3.0-10.0 (слева) и электрофореграмма кератиназы с рI 9.5 (денатурирующий электрофорез в ПААГ), (справа).

Фракционирование ферментного препарата *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученный при росте продуцента на свиной щетине в условиях ТФК, методом ИЭФ показало наличие пика протеолитической активности во фракции с рН 9.1 (казеинолитической – 147.8 Е; кератинолитической – 76.0 Е).

Биохимические и физико-химические свойства изучаемых кератинолитических протеаз. Изучение субстратной специфичности внеклеточных протеаз микромицетов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1 с использованием ХПС показало, что протеазы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученных при глубинном и твердофазном культивировании продуцента на курином пере, обладают наибольшей специфичностью к субстрату

субтилизиноподобных протеаз (Z-Ala-Ala-Leu-pNA), что подтверждает данные литературы о том, что многие кератиназы гидролизуют белковые субстраты в сайтах, содержащих остатки ароматических или алифатических незаряженных аминокислот в положении P1, и предпочтительно расщепляют более длинные субстраты с остатками аланина в положениях P2 и P3 (Mitsuiki et al., 2004; Rajput et al., 2010; Purchase, 2016).

В то же время протеаза *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанная при ТФК продуцента на свиной щетине, и *T. inflatum* ST1 показали наибольшую активность с хромогенным пептидным субстратом, содержащим остаток положительно заряженной аминокислоты в положении P1 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), что скорее всего указывает на низкий уровень специфичности этих ферментов по отношению к целевому белку – кератину.

При изучении кератинолитических ферментов также важно учитывать отношение кератинолитической активности к казеинолитической (Evans et al., 2000). Для протеаз микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученных при глубинном культивировании и ТФК на курином пере и свиной щетине, эта величина равна 1.18, 0.61 и 0.51 соответственно, что свидетельствует о высокой специфичности этих кератиназ, тогда как отношение кератинолитической активности к казеинолитической протеазы *T. inflatum* ST1 – лишь 0.18. В связи с этим было принято решение дальнейшие исследования сфокусировать на кератинолитических ферментах *A. clavatus* ВКПМ F-1593.

Результаты ингибиторного анализа указывают на то, что кератиназы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 являются сериновыми, так как только два ингибитора уменьшали активность ферментов: PMSF ингибировал активность протеаз на 60-100%, кроме того, применение ЭДТА привело к снижению активности на 20-30%. Другие ингибиторы значительно не влияли на активность протеаз.

Несмотря на близкие значения изоэлектрических точек изучаемых протеаз и некоторых биохимических свойств, различия в субстратной специфичности скорее всего указывают на различие в структуре белков. Для подтверждения этой гипотезы был проведен анализ на определение наличия гликозилирования белков с реактивом Шиффа (рис. 7). Кератиназы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученные при росте продуцента в условиях глубинного и твердофазного культивирования на курином пере и обладающие наибольшей специфичностью к Z-Ala-Ala-Leu-pNA, оказались не гликозилированы, а кератиназа, синтезированная при ТФК на свиной щетине – гликозилирована, что скорее всего влияет на способность фермента расщеплять субстраты с разным соотношением полярных и неполярных аминокислот.

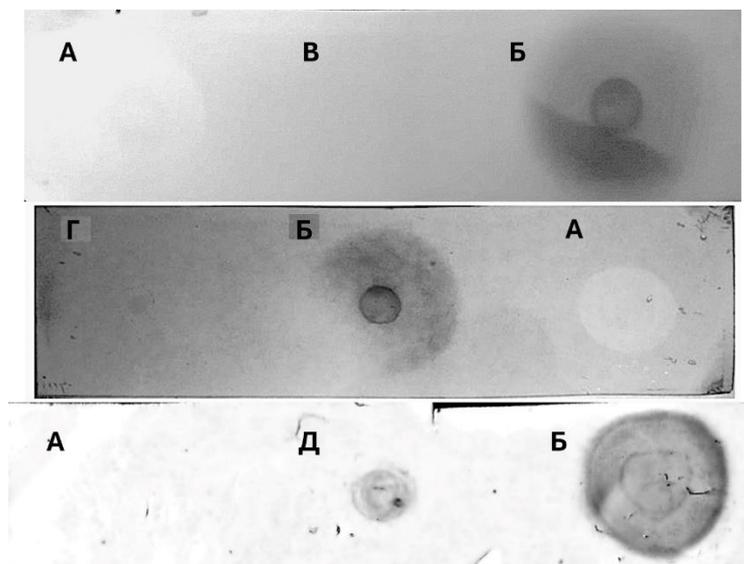


Рис. 7. Определение углеводного компонента в составе протеаз с кератинолитической активностью микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593: А – отрицательный контроль (бычий сывороточный альбумин), Б – положительный контроль (инвертаза дрожжей), В – керatinaза, наработанная при глубинном культивировании, Г – керatinaза, наработанная при ТФК на курином пере, Д – керatinaза, наработанная при ТФК на свиной щетине.

Изучение зависимости активности и стабильности кератиназ *A. clavatus* ВКПМ F-1593 от pH и температуры показало, что температурный оптимум кератинолиза соответствует 50°C, pH-оптимум лежит в слабощелочной области (pH 8.0). Протеазы микромицета стабильны в широком диапазоне условий: 25-45°C и pH 4-11.

Стабильность изучаемых ферментов в совокупности с высокой целевой активностью указывает на перспективность кератиназ *A. clavatus* ВКПМ F-1593 для использования в биотехнологических процессах.

Помимо изученных в рамках этой работы сериновых кератиназ для вида *A. clavatus* показано наличие в геноме гена кератинолитической металлопротеазы, которая была синтезирована путём рекомбинантной экспрессии в *Pichia pastoris* X-33 (Qiu et al., 2022). Наличие в геноме продуцента генов нескольких кератиназ, относящихся к разным семействам протеаз, а также способность самого микромицета расти на кератин-богатых отходах животноводства и гидролизовать их является основой для разработки отечественных препаратов для биodeградации.

Выводы

1. 10 культур микроскопических грибов из 32 штаммов, полученных из коллекций кафедры микробиологии и кафедры альгологии и микологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (*A. clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* А6, *A. ochraceus* 247, и *C. sphaerospermum* 1779), и из 22 штаммов, выделенных нами из накопительных культур (*Aspergillus ochraceus* ST2, *A. versicolor* C51, *Cladosporium pseudocladosporioides* C66, *Keratinophyton terreum* C106, *Penicillium sizovae* C11 и

- Tolypocladium inflatum* ST1), проявляют высокий кератинолитический потенциал при поверхностном культивировании на агаризованных средах;
2. *A. clavatus* ВКПМ F-1593, *K. terreum* C106 и *T. inflatum* ST1 обладают высоким уровнем секреции кератинолитических ферментов при глубинном культивировании, который зависит от источников азота в среде: для штаммов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *K. terreum* C106 необходимо использование кератинового субстрата в смеси с нитратом, а для *T. inflatum* ST1 нужен только кератиновый субстрат;
 3. Для наработки кератинолитических ферментов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 помимо глубинного культивирования эффективно также твердофазное культивирование на отходах животноводства: куриных перьях и свиной щетине;
 4. Кератинолитическая протеаза с рI 5.6 и молекулярной массой около 31 кДа микроциста *T. inflatum* ST1 обладает высокой общей протеолитической активностью, однако неспецифична по отношению к кератину и наиболее активно гидролизует субстрат, содержащий остаток положительно заряженной аминокислоты в положении P1 – H-D-Val-Leu-Lys-pNA;
 5. Кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593, нарабатываемые при глубинном культивировании продуцента, а также ТФК на курином перье и свиной щетине, стабильны в широком диапазоне температуры и pH; кератиназы, секретлируемые продуцентом при росте на перье обладают высокой специфичностью к кератину и ХПС Z-Ala-Ala-Leu-pNA, а кератинолитическая протеаза, синтезируемая микроцистом при росте на свиной щетине, показывает высокую общую протеолитическую активность и с высокой специфичностью расщепляет ХПС H-D-Val-Leu-Lys-pNA;
 6. Кератиназа *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с рI 9.3 и молекулярной массой около 27 кДа обладает наибольшей активностью гидролиза кератина при 50 °С, а pH-оптимум этого процесса соответствует 8;
 7. *A. clavatus* ВКПМ F-1593 является перспективным для использования в качестве первичного деструктора кератинсодержащих отходов.

Заключение

Несмотря на востребованность в различных сферах жизни человека кератинолитических ферментов и микроорганизмов-кератинолитиков остаётся еще много белых пятен в области изучения небактериальных продуцентов кератиназ и их ферментов. Микромицеты как промышленно значимые источники многих веществ, в том числе протеаз, способные расти на отходах сельского хозяйства при низкой активности воды, в настоящее время рассматриваются как потенциальные продуценты кератиназ. Однако до сих пор объём накопленных знаний о грибах-кератинолитиках, не относящихся к группе дерматофитов, мал. В этой работе мы постарались расширить представления о микромицетах отдела Ascomycota, способных к деградации материалов, богатых кератином, проведя исследования с 54 штаммами микроскопических грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolypocladium*, *Trichoderma* и *Ulocladium*.

Видовое и родовое разнообразие 10 культур микромицетов (*Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* A6, *A. ochraceus* 247, *A. ochraceus* ST2,

A. versicolor C51, *Cladosporium pseudocladosporioides* C66, и *C. sphaerospermum* 1779, *Keratinophyton terreum* C106, *Penicillium sizovae* C11 и *Tolyposcladium inflatum* ST1), отобранных для дальнейших работ в результате первичного скрининга с использованием агаризованных сред, содержащих различные белковые субстраты, говорит о широкой распространенности способности к секреции кератинолитических ферментов среди представителей отдела Ascomycota, что подтверждает актуальность и целесообразность исследований по поиску новых продуцентов кератиназ среди мицелиальных грибов. Результаты вторичного скрининга, который проводился при глубинном культивировании отобранных штаммов, позволяют делать выводы о тонкой регуляции процессов синтеза и секреции кератинолитических протеаз в клетках грибов на физиологическом уровне, так как некоторые культуры, показавшие высокую кератинолитическую и казеинолитическую активность при поверхностном культивировании на агаризованных средах, были вовсе не активны при росте в жидких средах (*C. pseudocladosporioides* C66, и *C. sphaerospermum* 1779). Штаммы же с наибольшей целевой активностью при глубинном культивировании оказались зависимы от источников углерода и азота в среде. Так, максимальная ферментативная активность при культивировании *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *K. terreum* C106 достигались на средах с органическим и минеральным источниками азота, а при росте *T. inflatum* ST1 – на питательной среде, содержащей только источник органического азота.

Также особенности физиологии синтеза кератиназ микромицетами ярко иллюстрируется способностью микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 секретировать активные кератиназы не только при глубинном культивировании, но и при твердофазном культивировании как на курином пере, так и на свиной щетине. Важной особенностью этих процессов является то, что при росте продуцента на курином пере при обоих типах культивирования синтезируется негликозилированная кератиназа, специфично расщепляющая ХПС Z-Ala-Ala-Leu-pNA, тогда как при использовании свиной щетины для наработки ферментов образуется гликозилированная кератиназа, специфично гидролизующая ХПС H-D-Val-Leu-Lys-pNA. Полученные результаты позволяют расширить понимание о возможностях кератинолитических грибов к синтезу протеаз с различными свойствами и методах регуляции этих процессов.

Способность микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 расти на кератинсодержащих отходах сельского хозяйства, приводя к их гидролизу, а также высокая активность его кератиназ, стабильных в широком диапазоне температуры и pH (25-45°C и pH 4-11) говорит о перспективности разработки коммерческих препаратов как на основе самой культуры, так и на основе очищенных ферментов. Такие препараты могут найти применение в биодegradации отходов животноводства и во многих отраслях экономики: медицине, косметологии, тканевой и кожевенной промышленности, производстве биопластиков и др. Для реализации этих перспектив необходимы дальнейшие исследования, направленные на оптимизацию и масштабирование процессов получения целевого продукта.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации в рецензируемых
журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI,
рекомендованных для защиты в диссертационном совете
МГУ имени М.В.Ломоносова**

Статьи

1. **Тиморшина С.Н.**, Попова Е.А., Галиакберова А.А., Очнева А.Г., Осмоловский А.А. Протеолитические ферменты микромицетов рода *Aspergillus*, гидролизующие фибриллярные белки, для биомедицины и биотехнологических процессов // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2022. — Т. 77, № 3. — С. 195–200. (ИФ РИНЦ = 0,631). [Timorshina S.N., Popova E.A., Galiakberova A.A., Ochneva A.G., Osmolovskiy A.A. *Aspergillus* proteolytic enzymes hydrolyzing fibrillar proteins for biomedicine and biotechnological processes // Moscow University Biological Sciences Bulletin. — 2022. — Vol. 77, № 3. — P. 178–183. DOI: 10.3103/S0096392522030099 (SJR – 0,183, Q 3)] Вклад автора в печатных листах: (0,66/0,46) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **Timorshina S.**, Popova E., Kreyer V., Baranova N., Osmolovskiy A. Keratinolytic properties of *Aspergillus clavatus* promising for biodegradation // International Journal of Environmental Research and Public Health. — 2022. — Vol. 19, № 21. — P. 13939. DOI: 10.3390/ijerph192113939 (SJR – 0,808, Q 2) (1,19/1,00).
3. **Тиморшина С.Н.**, Попова Е.А., Кулешова К.И., Акьол А.К., Осмоловский А.А. Кератинолитический потенциал микромицета *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 и сравнение его ферментов с коммерческим препаратом кератиназы // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2023. — Т. 78, № 4. — С. 250–257. (ИФ РИНЦ – 0,631) [Timorshina S.N., Popova E.A., Kuleshova K.I., Akyol A.K., Osmolovskiy A.A. Keratinolytic potential of the micromycete *Aspergillus clavatus* VKPM F-1593 and comparison of its enzymes with the commercial keratinase preparation // Moscow University Biological Sciences Bulletin. — 2023. — Vol. 78, № 4. — P. 225–231. DOI: 10.3103/S0096392524600418 (SJR – 0,183, Q 3)] (0,76/0,46).

Патент РФ

Тиморшина С.Н., Осмоловский А.А., Александрова А.В. Штамм *Aspergillus clavatus* – продуцент протеолитических ферментов с кератинолитической активностью // Патент на изобретение RU 2774366 С 1, дата регистрации 17.07.2022. Заявка № 2021133704 от 19.11.2021.