

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

на правах рукописи



Тиморшина Светлана Наильевна

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

Специальности: 1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Осмоловский Александр Андреевич

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Кератин: структура и свойства	11
1.1.1. α -кератин и шерсть	13
1.1.2. β -кератин и перья.....	15
1.2. Кератинолитические ферменты	18
1.2.1. Теория кератинолиза	19
1.2.2. Кератиназы: свойства, продуценты и биотехнологический потенциал.....	22
1.3. Сферы применения кератина	26
1.3.1. Лечение ран и ожогов	27
1.3.2. Тканевая инженерия	28
1.3.3. Системы доставки лекарств	30
1.3.4. Другие сферы применения	30
1.4. Гидролизаты кератина и их применение	31
1.5. Грибы как продуценты кератиназ.....	35
1.5.1. Кератинолитические микромицеты.....	35
1.5.2. Способы увеличения биосинтеза кератиназ микромицетного происхождения.....	39
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Объекты исследования	42
2.2. Общая схема работы.....	42
2.3. Выделение чистых культур кератинолитических микромицетов и их идентификация по морфолого-культуральным признакам	43
2.4. Молекулярно-генетическая идентификация микромицетов.....	44
2.5. Скрининг микромицетов на способность секретировать протеазы	44
2.5.1. Первичный скрининг микромицетов	44
2.5.2. Вторичный скрининг коллекционных штаммов микромицетов.....	45
2.5.3. Скрининг микромицетов при глубинном культивировании на отходах сельского хозяйства.....	46
2.6. Методы и условия культивирования продуцентов для оптимизации получения целевых ферментов.....	47
2.6.1. Глубинное культивирование в иммобилизованном состоянии	47
2.6.2. Твердофазное культивирование.....	47
2.7. Сканирующая электронная микроскопия кератинсодержащих субстратов	48
2.8. Методы определения ферментативной активности.....	48
2.8.1. Определение кератинолитической активности	48
2.8.2. Определение общей протеолитической (казеинолитической) активности	49
2.8.3. Определение ферментативной активности с использованием хромогенных пептидных субстратов (ХПС)	49
2.9. Получение комплексного препарата внеклеточных белков	50

2.10. Изоэлектрофокусирование комплексного препарата внеклеточных белков	51
2.11. Ступенчатый денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	51
2.12. Проведение ингибиторного анализа.....	51
2.13. Определение гликозилирования белков методом дот-блоттинга.....	52
2.14. Определение температурного оптимума и температурной стабильности активности протеазы.....	52
2.15. Определение рН-оптимума и стабильности активности протеазы.....	52
2.16. Статистический анализ.....	53
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
3.1. Первичный скрининг коллекционных штаммов микромицетов	54
3.2. Вторичный скрининг коллекционных штаммов микромицетов.....	58
3.3. Влияние источника кератина на динамику накопления внеклеточных протеолитических ферментов микромицетом <i>Aspergillus clavatus</i> ВКПМ F-1593	60
3.4. Выделение чистых культур кератинолитических микромицетов из накопительных культур и их первичный скрининг	63
3.5. Молекулярно-генетическая идентификация отобранных микромицетов	66
3.6. Скрининг отобранных микромицетов при глубинном культивировании на различных отходах сельского хозяйства	69
3.7. Динамика накопления внеклеточных протеолитических ферментов микромицетом <i>T. inflatum</i> ST1 при глубинном культивировании	73
3.8. Синтез кератинолитических ферментов при твердофазном культивировании и культивировании в иммобилизованном состоянии микромицетами <i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593 и <i>T. inflatum</i> ST1.....	74
3.9. Деградация кератинсодержащих отходов микромицетом <i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593.....	78
3.10. Получение и разделение комплексных препаратов внеклеточных белков <i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593 и <i>T. inflatum</i> ST1.....	80
3.11. Субстратная специфичность внеклеточных протеаз с кератинолитической активностью микромицетов <i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593 и <i>T. inflatum</i> ST1	86
3.12. Свойства внеклеточных протеаз с кератинолитической активностью микромицета <i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593	88
3.12.1. Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на активность протеаз микромицета <i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593	88
3.12.2. Определение гликозилирования протеаз микромицета <i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593	89
3.12.3. Физико-химические свойства протеаз микромицета <i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593	90
ВЫВОДЫ.....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98
ПРИЛОЖЕНИЕ	123

ВВЕДЕНИЕ

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 (Xue 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 труднорастворимых 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 биодegradации 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*, *Tolyposcladium*, *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 *Tolyocladium 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 *Tolyocladium*.

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. Керatinaза, 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 Алине Витальевне и Леонтьевой Марии Романовне за помощь в осуществлении работы.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Кератин: структура и свойства

Кератины – нерастворимые фибриллярные белки, синтезируемые в клетках эпителия позвоночных животных и относящиеся к суперсемейству белков промежуточных филаментов (Herrmann and Aebi, 2004). Кератины выполняют различные функции в организме: от образования межклеточных контактов (десмосом и гемидесмосом) и формирования цитоскелета до образования рогового слоя эпидермиса и его производных (ногтей, волос, перьев, рогов и т.д.), обеспечивая механическую защиту при онтогенетической и филогенетической адаптации животных к условиям внешней среды (Fraser et al., 1972; Schweizer et al., 2006; Vaidya and Kanojia, 2007).

Существует несколько классификаций кератинов, основанных на различных структурных особенностях этих белков.

Одним из наиболее принятых делений кератинов на группы является их классификация на основе дифракции рентгеновских лучей, которая совпадает с особенностями вторичной структуры белков (Astbury and Street, 1932; Astbury and Woods, 1934), (рис. 1). По данной классификации выделяют 3 основных группы кератина: α -кератин, β -кератин и аморфный или неструктурированный γ -кератин.

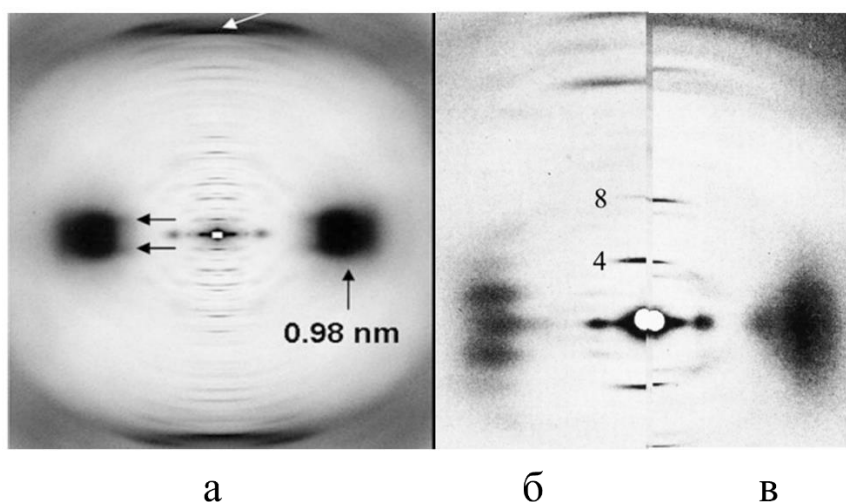


Рис. 1. Рентгенограммы иглы дикобраза (а), кератина пера (б) и когтя варана (в), (а: Parry et al., 2008; б и в: Parry et al., 2019).

α -кератин богат α -спиралями и представлен у млекопитающих. Модельным объектом для изучения данного типа кератина является шерсть (Fraser and MacRae, 1973). γ -кератин в классических работах описывается как белок, не обладающий четко детерминированной

вторичной структурой и образующий аморфный матрикс в тканях, богатых α -кератином. Во вторичной структуре β -кератина преобладают β -листы, данный тип кератина является основным компонентом производных эпидермиса рептилий и птиц. В эпидермисе этих животных присутствует как β -кератин, так и α -кератин. Единственные млекопитающие обладающие α - и β -кератином – панголины (Fraser et al., 1969; Wang et al., 2016).

Данные актуальных исследований ставят под сомнение классическое разделение кератинов на α , β и γ . Молекулярно-генетический анализ показал, что только α -кератины принадлежат к суперсемейству белков промежуточных филаментов (IF), (Jacob et al., 2018). Также открыта способность α -кератинов переходить из α - в β -конформацию при определенных физических воздействиях (нагревании, механическом воздействии), что позволяет называть их « β -кератинами» (Kreplak et al., 2004). Таким образом, в настоящее время к истинным кератинам относят только α - или IF-кератины, а β -кератины предлагается называть роговыми β -белками («corneous beta-proteins») или кератин-ассоциированными β -белками (Alibardi, 2013; Alibardi, 2016; Holthaus et al., 2018). По последним данным, белки, ранее известные как γ -кератин (теперь чаще называемые кератин-ассоциированными белками) относятся к разным группам белков и не образуют однородное стекловидное вещество, а имеют четко выраженную зернистую структуру (Kadir et al., 2017). Роговые β -белки и некоторые кератин-ассоциированные белки (например, филаггрин и трихогиалин) кодируются генами, принадлежащими к комплексу эпидермальной дифференцировки, что также подтверждает отсутствие филогенетической связи с IF-кератинами (Strasser et al., 2015; Holthaus et al., 2018).

Другая общепринятая классификация кератинов основана на прочности белка, которая напрямую зависит от количества дисульфидных связей в молекуле (Mercer, 1961). Кератин с малым содержанием дисульфидных мостиков называется мягким кератином и является основным компонентом эпидермиса. Этот тип кератина включает до 1% серы. Твердый кератин насыщен дисульфидными связями (до 5% серы), более устойчив к негативному воздействию окружающей среды и преобладает в производных эпидермиса (Karthikeyan et al., 2007). Однако, в сравнении с другими белками, любой вид кератина богат серосодержащей аминокислотой – цистеином. Полный аминокислотный состав кератина шерсти и пера представлен в таблице 1.

Аминокислотный состав кератинсодержащих материалов
(Wang et al., 2016; Wang et al., 2021)

Аминокислотный состав шерсти	Количество (%)	Аминокислотный состав пера	Количество (%)
Аланин	5.5	Аланин	8.7
Аргинин	6.6	Аргинин	3.8
Аспаргат ¹	6.5	Аспаргат ¹	5.6
Цистеин	11.4	Цистеин	7.8
Глутамат ²	11.3	Глутамат ²	6.9
Глицин	8.8	Глицин	13.7
Гистидин	0.8	Гистидин	0.2
Изолейцин	3.4	Изолейцин	3.2
Лейцин	7.8	Лейцин	8.3
Лизин	3.0	Лизин	0.6
Метионин	0.5	Метионин	0.1
Фенилаланин	2.5	Фенилаланин	3.1
Пролин	6.0	Пролин	9.8
Серин	9.6	Серин	14.1
Треонин	6.1	Треонин	4.1
Тирозин	4.1	Тирозин	1.4
Валин	5.9	Валин	7.8
		Триптофан	0.7

¹ – в том числе аспарагин; ² – в том числе глутамин

1.1.1. α -кератин и шерсть

α (IF)-кератин подразделяют на две группы: кератин 1-го типа (кислый) и кератин 2-го типа (основной или нейтральный), (Schweizer et al., 2006). Молекулярная масса α -кератина варьирует от 40 до 70 кДа (Alibardi et al., 2006). Полипептидные цепи данного белка содержат малое количество серы и образуют фибриллы промежуточных филаментов, погруженные в матрикс, состоящий из белковых молекул с высоким содержанием серы – γ -кератина. Молекулы α -кератина содержат три домена: центральный, N- и C- концевые. Центральный домен формирует правозакрученную α -спираль, а концевые домены служат

для связи с другими полипептидными цепями α -кератина и с матриксом. Структуру α -спирали поддерживают водородные связи, а сульфидные мостики позволяют образовывать левозакрученный димер из двух правозакрученных α -спиралей. Димер может состоять из полипептидных цепей, относящихся к разным типам кератина (1-ому или 2-ому). Димеры агрегируют в протофиламенты, а они, в свою очередь, объединяясь в пары, формируют протофибриллы. Структура из четырёх протофибрилл называется промежуточным филаментом (рис. 2). Диаметр такого филамента около 7 нм (Parry, 1996; Jones et al., 1997; Fraser and Parry, 2018; Jacob et al., 2018).

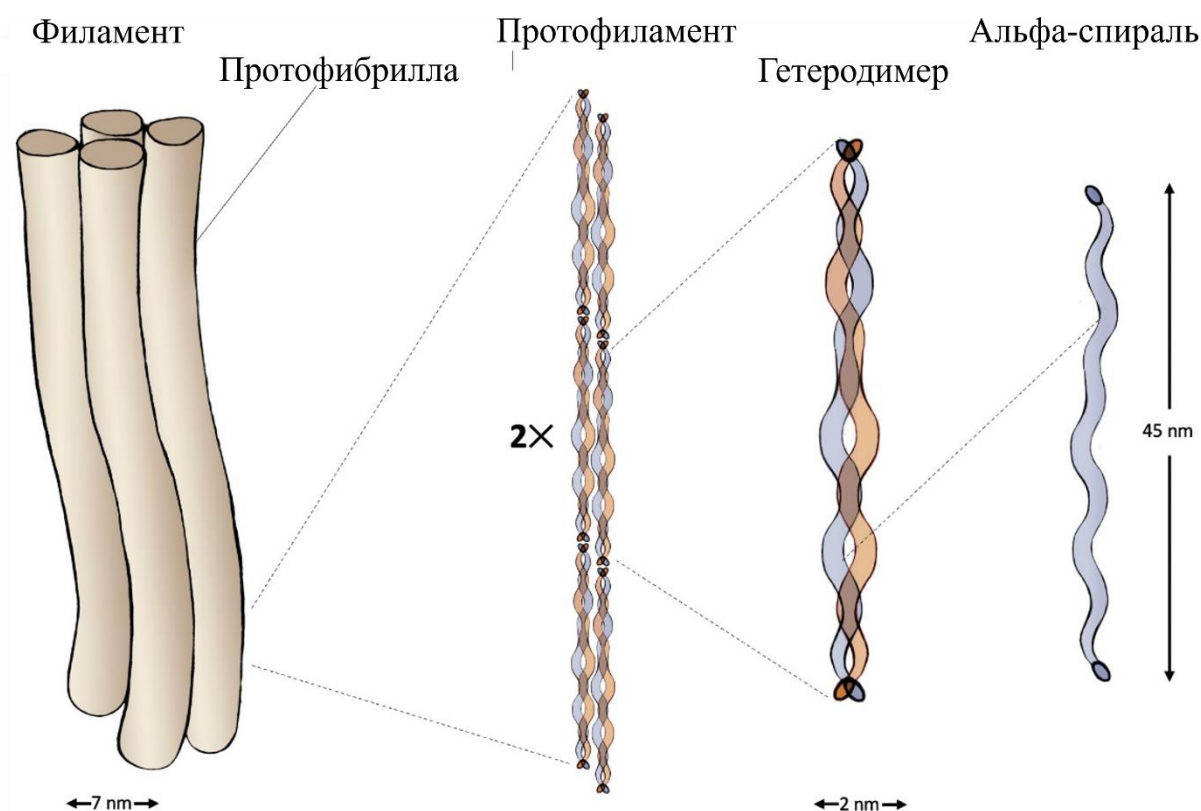


Рис. 2. Структура промежуточного филамента, состоящего из α (IF)-кератина.

Как было отмечено выше, шерсть – наиболее распространенный объект для изучения α -кератина. Она состоит на 99% из белков, из которых 82% представлены богатыми цистеином кератинами, располагающимися в мертвых клетках, образующих наружный (кутикулу) и внутренний (ортокортес и паракортес) слои отдельных шерстяных волокон (рис. 3), (Fan and Yu, 2011; Lewis and Rippon, 2013). Шерсть используют в текстильной промышленности, однако она может являться и отходом агропромышленного комплекса, требующим экологичной и рентабельной утилизации. Также важна переработка текстильных материалов смешанного типа, состоящих как из природных материалов, так и из синтетических. Для вторичного использования искусственных полимерных материалов

требуется их предварительная очистка от шерстяных включений. В связи с этим представляет интерес изучение ферментов, способных к специфическому гидролизу α -кератина (Navone et al., 2020).



Рис. 3. Строение волокон шерсти (Fraser and MacRae, 1973, с изменениями).

1.1.2. β -кератин и перья

β -кератин (роговой β -белок) – белок с молекулярной массой от 8 до 25 кДа (Alibardi et al., 2006), состоящий из трёх основных доменов так же, как и α -кератин: центрального, N- и C- концевых. Центральный домен, содержащий гомологичную для всех архозавров и чешуйчатых последовательность из 34 аминокислотных остатков, образует параллельный или чаще антипараллельный (более стабильный) β -лист из четырёх β -тяжей. Такая структура изгибается, формируя левозакрученную спираль. Димеры левозакрученных β -листов образуют спиральные филаменты за счет поворота на 45° (рис. 4). N- и C- концевые домены молекул β -кератина формируют матрикс, оборачиваясь вокруг центрального домена и обеспечивая взаимосвязь с соседними молекулами. Диаметр филамента β -кератина около 3-4 нм (McMurry and Fay, 2003; Fraser and Parry, 2008; Calvaresi et al., 2016).

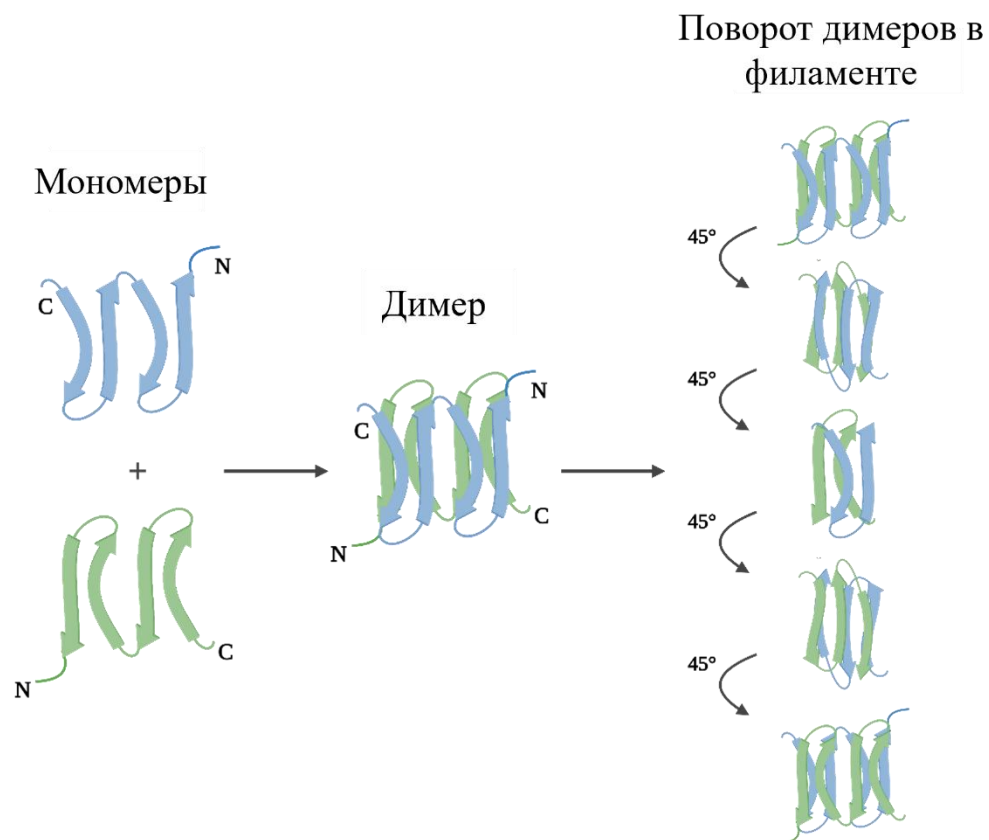


Рис. 4. Структура филамента β -кератина (рогового β -белка).

Именно такая структура лежит в основе строения птичьих перьев, состоящих из стержня и опахала. Стержень – главная ось пера – образована филаментами β -кератина, уложенными в разном направлении. Филаменты наружного слоя лежат поперек стержня, а филаменты внутреннего, более толстого слоя – вдоль, тогда как сердцевина представлена ячеистой структурой, стенки которой образованы сетью разнонаправленных молекул β -кератина (Lingham-Soliar and Murugan, 2013; Liu et al., 2015), (рис. 5).

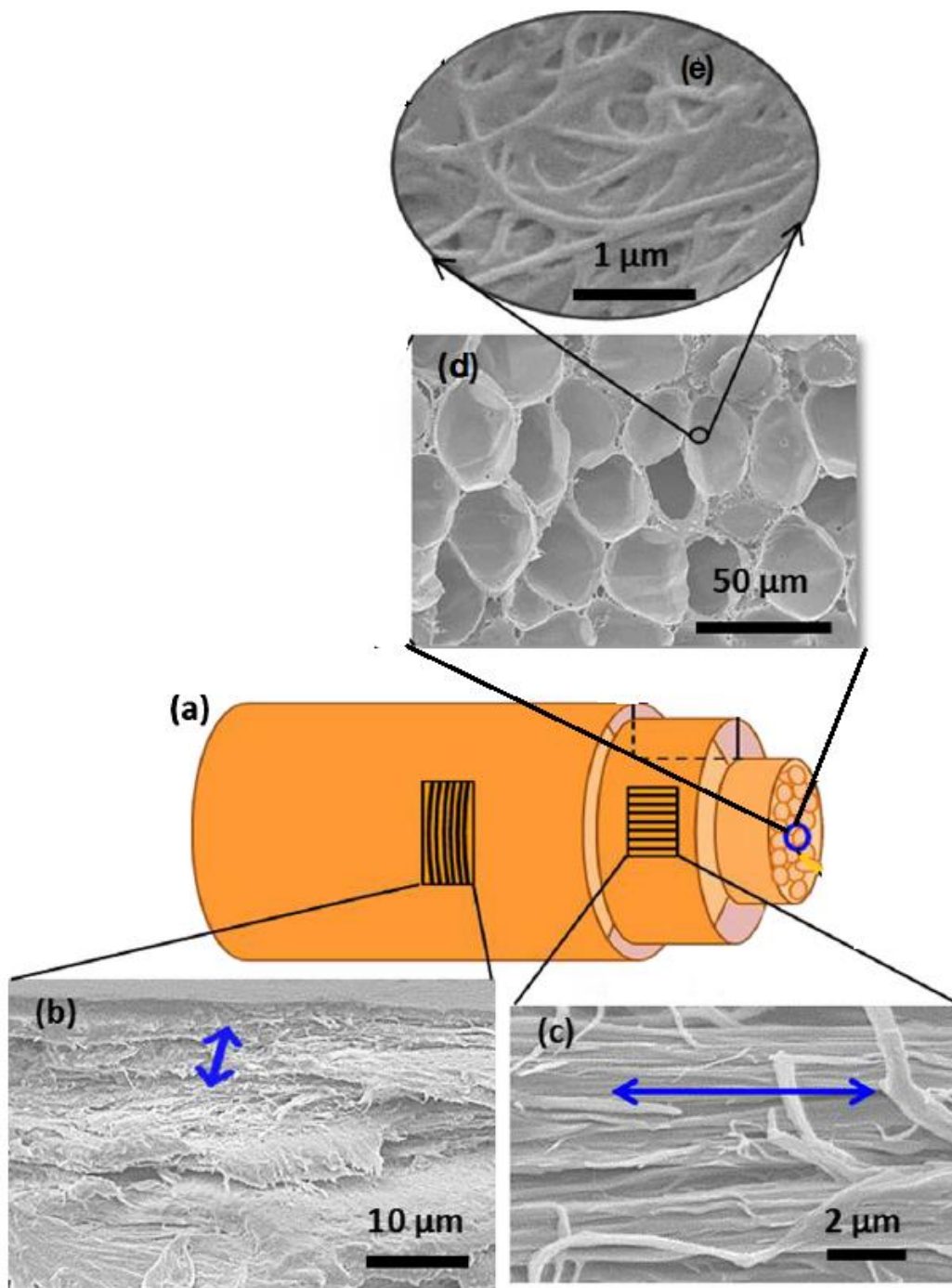


Рис. 5. Структура стержня пера чайки: (a) – схематический рисунок стержня пера; (b) – наружный слой (направление укладки филаментов обозначено стрелкой); (c) – внутренний слой (направление укладки филаментов обозначено стрелкой); (d) – сердцевина стержня пера с ячеистой структурой; (e) – волокна, образующие стенки ячеек сердцевины (Wang and Meyers, 2016, с изменениями).

Особенности строения β -кератина и пера позволяют птицам эффективно ловить воздушный поток при полете, не деформируя наружные покровы, однако эти же свойства

делают перья труднорастворимым субстратом, плохо поддающимся ферментативному гидролизу (Bachmann et al., 2012; Paul et al., 2013).

1.2. Кератинолитические ферменты

Кератиназы – протеолитические ферменты (КФ 3.4), катализирующие расщепление пептидной связи в молекулах кератина, ранее относили к КФ 3.4.4.25, но такая классификация была отменена в 1972 году, и в настоящее время для кератиназ не существует ни трех-, ни четырехзначного номера КФ. Отсутствие подробной классификации КФ кератинолитических ферментов является отражением того, что действие кератиназ не считается специфичным, поскольку эти ферменты фактически просто катализируют деградацию кератина по пути гидролиза пептидных связей без общих для всех кератиназ аминокислотных сайтов распознавания, конкретных механизмов действия или происхождения ферментов (Qiu et al., 2020). В связи с этим в настоящее время кератиназами называют все ферменты с кератинолитической активностью вне зависимости от строения молекулы и механизма действия протеазы. Однако некоторые исследователи предлагают ввести критерий истинности кератиназ, который заключается в величине соотношения кератинолитической активности к казеинолитической активности. Если это соотношение больше 0.5 (в некоторых работах больше 1.0), то фермент стоит признавать истинной кератиназой. Если же соотношение меньше 0.5 (в некоторых работах меньше 1.0), то фермент надо относить к протеазам с кератинолитической активностью (Evans et al., 2000; Gupta et al., 2013). Среди трудностей внедрения такого критерия стоит отметить отсутствие унификации в методиках измерения кератинолитической и казеинолитической активности. В любом случае необходимо учитывать тот факт, что кератиназы действительно могут катализировать гидролиз пептидных связей в широком спектре белковых субстратов, включая многие растворимые и нерастворимые белки, такие как казеин, альбумин, коллаген, желатин, в дополнение к субстратам кератиновой природы, таким как шерсть, перья, волосы и щетина (Brandelli et al., 2010).

Наличие множества дисульфидных связей в кератине является ключевой причиной трудности ферментативного разрушения этого белка. Вследствие этого большинство кератиназ могут катализировать деградацию кератина только после разрыва дисульфидных связей (Gupta and Ramnani, 2006; Wang et al., 2015). Это означает, что процесс кератинолиза может включать два этапа: сульфитолиз и протеолиз (Lange et al., 2016; Peng et al., 2019). Таким образом, на практике многие сообщения о кератинозной активности фактически относятся к протеазам, которые действуют синергически с дисульфидредуктазами или восстановителями (например, DTT (дителиотреитол) и сульфитами), (Lange et al., 2016).

Однако по мнению многих исследователей истинные кератиназы должны определять высокая активность по отношению к кератину, не зависящая от присутствия восстанавливающих агентов или от какой-либо сопутствующей дисульфидредуктазной активности (Navone and Speight, 2018).

Согласно базе данных MEROPS все известные кератинолитические ферменты относятся к группам сериновых и металлопротеаз. Однако иногда сообщается о существовании аспартатных кератиназ (Shestakova et al., 2023). Такая классификация распределяет кератинолитические ферменты по меньшей мере по 14 белковым семействам протеаз: сериновые протеазы включают членов семейств S1, S9, S8, S10 и S16, а металлопротеазы – M3, M4, M14, M16, M28, M32, M36, M38 и M55. Помимо классификации кератиназ по семействам ферментов выделяют экзо-, эндо- и олигопептидазы с кератинолитической активностью (Qiu et al., 2020). Эндопептидазы катализируют расщепление пептидных связей внутри молекулы полипептида. Кератинолитические эндопептидазы относятся к семействам S1, S8, S16, M4, M16, M36. Напротив, кератинолитические протеазы семейств S9, S10, M14, M28, M38 и M55 являются экзопептидазами, что означает, что они атакуют полипептидную цепь на концевом участке (Lange et al., 2016; Mercer and Stewart, 2019). Кератинолитические экзопептидазы разных семейств гидролизуют полипептидную цепь либо с N-конца (семейства S9, M38 и M55), либо с C-конца (семейства S10, M14 и M28). Кроме того, может иметь место синергическое действие, поскольку экзопептидазы действуют на концевые пептиды, высвобождаемые под действием кератинолитических эндопептидаз. Кератиназы, действующие на пептидные связи в олигомерах (олигопептидазы), относятся к семействам M3 и M32. Эти ферменты катализируют гидролиз небольших пептидов с образованием димерных или тримерных молекул или даже отдельных аминокислот (Qiu et al., 2020).

1.2.1. Теория кератинолиза

Кератинолиз – сложный процесс, механизм которого до конца не выяснен. Однако преобладающие исследования показывают, что разрушение кератина подразделяется на две стадии: расщепление дисульфидных связей и гидролиз денатурированного кератина. Кератиназы адсорбируются на поверхности молекулы кератина посредством электростатических и гидрофобных взаимодействий, что, в свою очередь, запускает каталитическую реакцию (Wang et al., 2023). Восстановление дисульфидных связей переводит кератин в растворимую форму и раскрывает больше сайтов для атаки кератиназ. Механизмы разрушения дисульфидных связей и денатурации кератина могут быть различны, к основным теориям данного процесса относят физическое давление

мицелиальных организмов, действие мембранного потенциала, сульфитолиз и активность ферментных комплексов (Wang et al., 2023), (рис. 6).

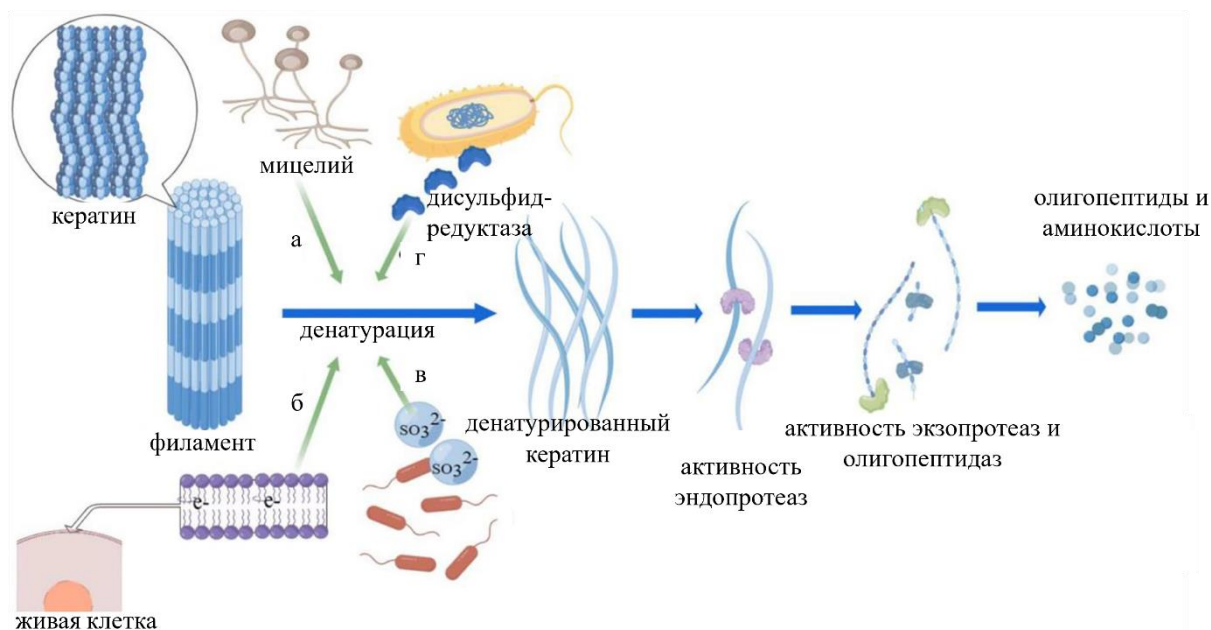


Рис. 6. Механизм деградации кератина на примере кератина перьев (по Фигдрау): (а) теория физического давления, (б) теория мембранного потенциала, (в) теория сульфитолиза, (г) теория ферментных комплексов (Wang et al., 2023, с изменениями).

Теорию физического давления применяют к грибам и бактериям актиномицетной линии, способным образовывать мицелий. Этот процесс обычно разделяется на два этапа. Сначала мицелий соприкасается с поверхностным слоем кератина и растет в продольном направлении вдоль оси кератиновых волокон. Затем происходит инвазия мицелия вглубь кератинового материала, в результате чего давление обнажает пептидные связи, которые способны разрушаться протеазами. Митола и соавт. с помощью электронной микроскопии показали, что мицелий видов *Chrysosporium* способен расти внутри плотной кератиновой структуры волос (Mitola et al., 2002). Ли и соавт. идентифицировали новый штамм *Streptomyces* SCUT-3, демонстрирующий возможность прорастания в перья за счет эффективного удлинения и спутывания мицелия, что способствует деградации субстрата (Li et al., 2020).

Для реализации теории мембранного потенциала, также называемой окислительно-восстановительной теорией поверхности клеточных мембран, необходимо наличие интактных клеток и клеточных мембран для восстановления дисульфидных связей кератина. Некоторые исследователи предполагают, что потенциал клеточной мембраны

играет важную роль в деградации кератина. Например, Бокл и соавт. обнаружили, что фильтрат и гомогенат живой культуры *Streptomyces pactum* обладали незначительной восстанавливающей способностью или вообще не имели ее, в то время как промытые клетки проявляли высокий уровень восстанавливающей активности в отношении дисульфидных связей (Bockle et al., 1997). Рамнани и соавт. при изучении штамма *Bacillus licheniformis* RG1 также показали, что ни кератиназа, ни внутриклеточные растворимые вещества с дисульфидредуцирующей активностью не могут полностью разрушить перья, а наличие живых клеток способствует полному гидролизу (Ramnani et al., 2005). Несмотря на наличие данных, подтверждающих теорию мембранного потенциала, механизм такого пути гидролиза кератина все еще не ясен.

Кофакторы, секретируемые микроорганизмами, способные восстанавливать дисульфидные связи (например, β -меркаптоэтанол, меркаптоацетат, дитиотреитол или сульфит), играют важную роль в утилизации кератина и приводят к реализации пути гипотезы сульфитолиза. Было показано, что активность цистеиндиоксигеназы приводит к образованию сульфитов, восстанавливающих дисульфидные связи кератина и способствующие кератинолизу (Grumbt et al., 2013). Добавление экзогенных сульфитов также может увеличивать эффективность деградации перьев (Cedrola et al., 2012; Peng et al., 2021).

Кроме того, известен механизм восстановления дисульфидных связей за счет активности ферментов-редуктаз дисульфидных связей. Например, Ямамура с соавт. выделили штамм *Stenotrophomonas* sp. D-1, синтезирующий два внеклеточных фермента: сериновую протеазу и редуктазу дисульфидных связей. Синергическое действие этих двух ферментов увеличивало скорость гидролиза кератина в 50 раз по сравнению с обработкой субстрата чистой кератиназой (Yamamura et al., 2002). Ли с соавт. также показали синергическое действие кератиназы и дисульфидредуктазы при росте рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* на среде с куриным пером (Li et al., 2023).

Все предполагаемые пути расщепления дисульфидных связей кератина вызывают дискуссии в научном сообществе, однако данные литературы указывают на то, что, скорее всего, все из гипотез реализуются в жизни, но разными организмами. Дальнейшее углубленное изучение механизма гидролиза кератина способствует рациональному и эффективному использованию ресурсов.

1.2.2. Кератиназы: свойства, продуценты и биотехнологический потенциал

Кератиназы – внутри- или внеклеточные ферменты, чаще с индуцибельным синтезом, продуцируемые разными группами организмов: бактериями, археями, грибами. Диапазон молекулярной массы этих ферментов от 20 до 130 кДа. Две крупнейших кератинолитических протеазы (с молекулярной массой 107 и 130 кДа) принадлежат бактериям рода *Fervidobacterium*, выделенным из горячих источников, хотя многие известные кератинолитики являются мезофилами. Широкий диапазон сред обитания указывает на универсальность организмов, разрушающих кератин, и позволяет предположить, что микробные кератинолитические ферменты могут быть весьма разнообразными по способу действия, биохимическим и биофизическим свойствам (Qiu et al., 2020).

Имеющиеся данные об оптимальных условиях работы кератинолитических ферментов показывают, что большинство кератиназ активны при нейтральных и высокощелочных значениях pH от 7.0 до 12.5 и при температуре 50-80°C. Такой широкий диапазон условий реакции позволяет использовать кератинолитические ферменты в разных сферах экономики (Qiu et al., 2020).

Сериновые кератиназы, принадлежащие к группам трипсиноподобных или субтилизиноподобных протеаз, обычно обладают pH-оптимумом, лежащим в щелочном диапазоне (8-11), (Selvam and Vishnupriya, 2012). Однако некоторые бактериальные сериновые кератинолитические ферменты лучше всего работают в сильнощелочной области (pH>11.5), (Jaouadi et al., 2010; Benkiar et al., 2013), тогда как несколько кератиназ, относящихся к тому же классу, продуцируемые микромицетами, обладают pH-оптимумами, находящимися в кислой или слабокислой областях: *Trichophyton mentagrophytes* – 4.5, *Purpureocillium lilacinum* – 6.0 (Tsuboi et al., 1989; Cavello et al., 2013). Металлопротеазы, расщепляющие кератин, как правило, активны в нейтральной и слабощелочной среде (pH 7-8.5), (Verma et al., 2017), за исключением кератиназ, секретируемых *Bacillus thuringiensis* TS2 и *Penicillium sp. Morsy 1* и pH-оптимум которых лежит в диапазоне 10-11 (El-Gendy, 2010; Sivakumar et al., 2013). Известны протеолитические ферменты смешанного типа (серин-металлопротеазы) с кератинолитической активностью, также работающие в щелочной области pH (9-11) и секретируемые в основном стрептомицетами (Tatineni et al., 2008; Zhang et al., 2009; Fang et al., 2013). Некоторые исследователи отмечают, что кератинолиз сопровождается выделением аммония, появляющегося в среде в результате дезаминирования продуктов разложения кератина. Данное явление может быть направлено

на изменение pH для оптимальной работы щелочных протеаз (Srivastava et al., 2020; Hassan et al., 2020).

Кератиназы активны в широком температурном диапазоне, который обычно зависит от экологической ниши продуцента. Таким образом, большинство кератинолитических протеаз микробного происхождения наиболее эффективны в термофильной области (45-60°C), (Hassan et al., 2020). В то время как ферменты некоторых бактерий, в том числе представителей филума Thermotogae, обладают температурным оптимум в диапазоне 70-100°C (Nam et al., 2002). Мезофильные протеазы, наиболее активно гидролизующие кератин при 20-45°C, часто образуют патогенные микроорганизмы-дерматофиты (Bernal et al., 2006; Bach et al., 2012).

Кератиназы, выделенные из различных источников, отличаются не только оптимальными условиями активности, но и специфичностью. Известны протеазы, способные разрушать как мягкий кератин, содержащийся в эпидермисе, так и твердый, входящий в состав волос, шерсти, перьев и других производных эпидермиса. Зачастую кератинолитические ферменты могут гидролизовать и другие фибриллярные белки: коллаген, эластин, фибрин, а также глобулярные белки, такие как гемоглобин и альбумин. На субстратную специфичность кератиназ сильно влияют химические свойства их субстрата. Поскольку кератин на 50-60% состоит из гидрофобных и ароматических аминокислот, то данные ферменты преимущественно расщепляют белки по остаткам таких аминокислот (фенилаланина, тирозина, валина, лейцина) в положении P1. Исследования с использованием хромогенных пептидных субстратов (ХПС) показывают, что в сайте узнавания кератинолитических протеаз аминокислота в положениях P2 и P3, часто занимаемые аланином, также играют роль в специфичности ферментативной реакции. Стоит отметить, что структура кератина перьев имеет высокую степень сходства со структурой прионных белков, что обуславливает возможный потенциал кератиназ в лечении и диагностике некоторых нейродегенеративных заболеваний. А устойчивость к органическим растворителям, отбеливающим реагентам и поверхностно-активным веществам, распространенная среди протеаз, гидролизующих кератин, делает их перспективными для промышленного производства (Purchase, 2016; Hassan et al., 2020).

Кератиназы образуют микроорганизмы, относящиеся ко всем трём доменам (Кубланов и др., 2009; Биджиева и др., 2014; Nwadiaro et al., 2015). Однако большинство исследований кератинолитических ферментов сфокусированы на бактериальных протеазах. Самой изученной кератиназой на данный момент является внеклеточный фермент, секретлируемый *Bacillus licheniformis* PWD-1 – ker A. Данная протеаза относится к классу

сериновых, обладает молекулярной массой 31.4 кДа и изоэлектрической точкой 8.5. Её рН-оптимум находится в щелочной области (рН 8.5-11.5), а максимум активности достигается при температуре 50-55°C (Cheng et al., 1995; Lin et al., 1995). С биотехнологической точки зрения кер А интересна своей способностью расщеплять твердый кератин, в том числе перья. На основе данного фермента было разработано несколько коммерческих продуктов разной направленности (табл. 2).

Таблица 2.

Коммерческие препараты на основе кератиназы, выделенной из *Bacillus licheniformis* PWD-1 (ker A), (Sharma and Devi, 2018, с изменениями)

Препарат	Применение	Производитель
Versazyme	Повышение пищевой ценности кормов для сельскохозяйственных животных и птиц	Bioresource International Inc.
Valkerase	Повышение пищевой ценности кормов для сельскохозяйственных животных и птиц	Bioresource International Inc.
Prionzyme TM	Гидролиз агентов прионных инфекций	Genencor International and Health Protection Agency
Pure 100 Keratinase	Удаление несовершенств кожи – мозолей	Proteos Biotech

Как видно из таблицы 2, кератиназы обладают биотехнологическим потенциалом в разных отраслях промышленности, фармацевтики и косметологии. Из-за способности расщеплять как твердый, так и мягкий кератин такие ферменты могут быть применены для улучшения ранозаживления, а также в лечении онихомикозов и псориаза. Некоторые кератинолитические ферменты обладают фибринолитической активностью и способны стимулировать заживление ожоговых ран (Xu et al., 2023). Разрушая кератин эпидермиса и ногтевой пластины, препараты на основе кератинолитических протеаз позволяют увеличить эффективность действия лекарств и антибиотиков за счет лучшего проникновения данных веществ в ткани. Кератиназы могут быть применены в косметологии для удаления несовершенств кожи, например, мозолей (Gupta et al., 2013a; Ghaffar et al., 2018).

Существуют препараты, содержащие ферменты с кератинолитической активностью и используемые в ветеринарии для удаления серных пробок из наружного слухового прохода. Была показана эффективность кератиназ для очистки медицинских инструментов от контаминации прионными агентами (Gupta et al., 2013b). Также протеазы, гидролизующие кератин, перспективны в качестве компонентов детергентов благодаря своей субстратной специфичности, позволяющей удалять трудноразлагаемые загрязнения, устойчивости к широким диапазонам pH и температуре, и стабильности в присутствии отбеливающих компонентов и органических растворителей (Bhari et al., 2019). Ценность кератинолитических протеаз высока для текстильной и кожевенной отраслей промышленности. Кератиназы, не способные разлагать коллаген, применяются на ранних этапах обработки кожи для удаления остатков производных эпидермиса, не нарушая структуру материала (Macedo et al., 2008; Zhang et al., 2016). Ферменты же, расщепляющие как кератин, так и коллаген, представляют интерес в качестве агентов для обработки кожи после дубления для придания ей большей мягкости и облегчения процесса окрашивания (Thanikaivelan et al., 2004). Были опубликованы данные о возможности применения кератиназ для дегумирования шёлка. Некоторые исследователи рассматривают кератинолитические протеазы в качестве компонентов фунгицидов и инсектицидов (Razzaq et al., 2019). Однако наибольший интерес кератиназы представляют для переработки трудноразлагаемых отходов агропромышленного комплекса, текстильной и кожевенной отраслей промышленности.

Ежегодно в мире производится более 10 млн тонн лишь куриных перьев, на 80% состоящих из кератина (Tesfaye et al., 2017). Их утилизация обычно осуществляется путем захоронивания, однако большие объемы перьев разлагаются в течение 2-3 лет, что приводит к замусориванию окружающей среды и появлению эконих для распространения патогенных микроорганизмов. Ещё применяемые сейчас методы переработки таких отходов включают использование высоких температур, давления, а также кислот или щелочей, что приводит к увеличению негативного воздействия на окружающую среду, снижению экономической рентабельности данных процессов и невозможности производства продуктов с высокой добавленной стоимостью. Среди основных методов переработки перьев стоит отметить производство перьевой муки – кормовой добавки для животных. Ее получение сопряжено с применением острого пара и высоких давлений, что также делает этот путь утилизации перьев энергоёмким.

Применение кератинолитических ферментов для разложения белковых субстратов, насыщенных трудноразлагаемыми фибриллярными белками, такими как кератин, позволит

проводить переработку отходов в условиях более близких к стандартным и получать аминокислоты и олигопептиды, использование которых возможно в качестве удобрений, кормовых добавок, субстратов для производства биотоплива и витаминов, а также компонентов косметических средств (Espersen et al., 2020; Sypka et al., 2021; Bokveld et al., 2023; Kokwe et al., 2023). Важно отметить существование исследований, направленных на разработку полимерных материалов, в том числе биопластиков, на основе кератина, которые в перспективе могут стать биоразлагаемой и биосовместимой основой для изготовления имплантатов и подложек для формирования тканей, а также упаковочным материалом для пищевой промышленности (Ramakrishnan et al., 2018). Одна из важнейших задач данного направления – разработка методов выделения и растворения кератина. Решение этой задачи может быть найдено благодаря применению кератинолитических ферментов.

Таким образом, изучение кератина является важной областью развития современной биотехнологии. Контролируемый гидролиз кератина отходов сельского хозяйства за счет микроорганизмов и их ферментов, а также поиск новых ферментов и их продуцентов, способствующих экстракции нативного кератина или его гидролизу с образованием олигопептидов и аминокислот, востребованных в различных отраслях экономики – актуальное направление научных исследований, работы в котором позволят расширить сферы применения кератина (Пискаева, 2016; Tamreihao et al., 2019; De Oliveira Martinez et al., 2020).

1.3. Сферы применения кератина

Современные тенденции перехода к использованию экологически чистых материалов во всех сферах жизни человека подталкивают ученых к поиску новых полимеров, которые заменят продукты нефтехимического производства, будут экологичными, но не уступят по прочности, эластичности и износостойкости. Кератин является одной из таких альтернатив. Помимо его биохимических и физических свойств, важна также доступность и дешевизна материала, из которого эти белки получают – отходов животноводства. Фибриллярные белки можно экстрагировать из побочных продуктов сельского хозяйства различными методами, такими как химический, термический и ферментативный гидролиз, паровой взрыв и микроволновый метод (Shavandi et al., 2017; Coppola et al., 2020; Jafari et al., 2020). Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки и обеспечивает выделение белковых фракций с определенными характеристиками, отвечающими потребностям различных областей экономики. Так, кератин находит широкое применение в биомедицине и других сферах экономики благодаря

своим свойствам: пористости, прочности и высокому уровню биосовместимости (Placone et al., 2017; Esparza et al., 2018; Mori et al., 2018; Chen et al., 2021; Wang et al., 2021).

1.3.1. Лечение ран и ожогов

Разработка материалов для лечения ран и ожогов является одной из актуальных задач науки. Полимерные материалы должны поддерживать влажную среду, обладать абсорбционной и газообменной способностью, быть биосовместимыми, стимулировать синтез белков кожи, пролиферацию и миграцию клеток. Эти свойства присущи кератиновым мономатериалам и композитам (Ye et al., 2022; Wang et al., 2023).

Было показано, что кератиновые материалы можно использовать для лечения ожогов и ран, в том числе осложненных сахарным диабетом (Konop et al., 2020; Konop et al., 2021). Способность кератина стимулировать экспрессию коллагена IV и VII типов, пролиферацию и миграцию фибробластов и кератиноцитов в сочетании с возможностью насыщения белкового материала лекарственными и противомикробными веществами является показателем перспективности применения кератина в биомедицине (Tang et al., 2012; Poranki et al., 2014; Roy et al., 2016; Villanueva et al., 2019; Ren et al., 2020; Navarro et al., 2020). Также было показано, что возможна разработка инъекционных кератиновых гидрогелей, образующихся *in situ* и повторяющих форму раны, что повышает качество лечения (Tang et al., 2021; Chen et al., 2021). Помимо нативных кератиновых гидрогелей и губок, при лечении ран эффективны наночастицы рекомбинантного кератина человеческих волос, оказавшиеся нетоксичными (Gao et al., 2019). Имеются также сообщения о преимуществах применения кератиновых гидрогелей при буллезном эпидермолизе (Than et al., 2013; Denyer et al., 2015), но точного подтверждения нет (Yesilova et al., 2015). Улучшение свойств кератиновых гидрогелей и губок (увеличение стабильности, увеличение времени высвобождения лекарств и т. д.) возможно не только за счет изменения условий получения, но и за счет синтеза композиционных материалов, таких как кератин/альгинат и кератин/хитозан (Zhai et al., 2018; Azarniya et al., 2019; Sadeghi et al., 2020; Deng et al., 2021; Han et al., 2021; Moay et al., 2021).

Кератиновые гели и наночастицы также проявляют кровоостанавливающие свойства, сокращая время кровотечения и кровопотерю в моделях ампутации хвоста и пункции печени у крыс (Luo et al., 2016; Wang et al., 2016). Ченг и соавт. показали возможность разработки кератинового гидрогеля для перорального применения для лечения язв желудка. Гель высокой вязкости уменьшал кровотечение, образовывал барьер против желудочного сока и каркас для регенерации тканей на поверхности раны (Cheng et al., 2021).

1.3.2. Тканевая инженерия

Разработка материалов, пригодных для культивирования культур клеток человека и имплантации в организм, является острой проблемой современной тканевой инженерии, направленной на развитие регенеративной медицины. В настоящее время предложено множество каркасов из различных биологических и синтетических материалов. Пористость, смачиваемость, набухание, биосовместимость, биоразлагаемость и механические характеристики кератина позволяют использовать его в регенеративной медицине. Кератин может использоваться в различных областях тканевой инженерии (табл. 3).

Монокомпонентные и композитные кератиновые материалы демонстрируют больший уровень адгезии клеток, чем искусственные материалы, а также большую твердость и стабильность, чем другие природные материалы, например коллаген, что указывает на перспективность использования отходов животного происхождения в качестве источника белков для изготовления каркасов и гидрогелей для тканевой инженерии (Wang et al., 2015; Kakkar and Madhan et al., 2016; Wu et al., 2018; Bajestani et al., 2020; Thompson et al., 2021). Стоит отметить, что имеются доказательства преимуществ гидрогелей на основе перьевого кератина перед шерстяными, на которых сосредоточено большинство современных исследований (Esparza et al., 2018).

Области применения кератиновых биоматериалов в тканевой инженерии

Область тканевой инженерии	Тип биокompозита	Ссылки
Регенерация нервных волокон	Кератиновые гидрогели и губки	(Apel et al., 2008; Sierpinski et al., 2008; Hill et al., 2011; Lin et al., 2012; Pace et al., 2014; Gao et al., 2019)
	Хитозан/кератиновые мембраны	(Carvalho et al., 2019)
Регенерация мышц, в т.ч. сердечной мускулатуры	Кератиновые гидрогели	(Shen et al., 2011; Tomblyn et al., 2016; Passipieri et al., 2017; Baker et al., 2017)
Регенерация суставов и костей, в т.ч. зубная имплантация	Кератиновые гидрогели	(Barati et al., 2017; Ajay Sharma et al., 2017; Duncan et al., 2018; Cohen et al., 2018; Bloise et al., 2020)
	Кератин-поликапролактоновые композиты с покрытием из фосфата кальция	(Zhao et al., 2015)
	Кератиновые/коллагеновые/гидроксиапатитовые каркасы	(Arslan et al., 2017)
	Кератиновый каркас, сшитый гидроксипропил-метилцеллюлозой, содержащий гидроксиапатит	(Feroz and Dias, 2021)
	Boron- and silicon-incorporated collagen/keratin cryogels	(Cal et al., 2021)
Регенерация кожи	Кератиновые материалы	(Lin et al., 2019; Parker et al., 2020)
	Кератин/поливинилпирролидоновый каркас	(Suarato et al., 2020)
	Пленки на основе эфира гуаровой камеди и кератина	(Das et al., 2021)

1.3.3. Системы доставки лекарств

Биосовместимость и биоразлагаемость кератиновых гидрогелей, а также возможность регулировать их микроархитектуру и, следовательно, контролировать время высвобождения лечебных веществ, указывают на возможность использования кератина в системах доставки лекарств (Han et al., 2015; Ramos et al., 2017; Cao et al., 2019). Особое внимание в исследованиях уделяется перспективам применения кератиновых материалов для лечения рака. Так, на основе кератиновых материалов и композитов разработано множество систем доставки доксорубина – антибиотика с противоопухолевой активностью, синтезируемого бактериями рода *Streptomyces* (Sun et al., 2017; Sun et al., 2018; Li et al., 2018; Aluigi et al., 2018; Zhang et al., 2019 (a); Zhang et al., 2019 (b); Zhang et al., 2020). Совместная загрузка доцетаксела (полусинтетический цитостатический препарат растительного происхождения) и хлорина еб (препарат для фотодинамической терапии рака) в наночастицы кератина позволила добиться синергетического эффекта химио- и фотодинамической терапии (Gaio et al., 2019). Использование альгинатно-кератинового композита способствует уменьшению желудочно-кишечной побочной реакции на индометацин (Gong et al., 2020), а мукоадгезивные свойства кератина способствуют разработке систем специфической мукоадгезивной доставки лекарств (Cheng et al., 2018). Кератиновый гель, наполненный галофугиноном, уменьшал количество послеоперационных спаек, образующихся у крыс после лапаротомии (Peyton et al., 2012). Показано, что термочувствительные кератин-поли-N-изопропилакриламидные полимеры можно применять для доставки хелатирующего агента дефероксамин мезилата к очагу внутримозгового кровоизлияния (Zhu et al., 2019).

Кератиновые материалы могут использоваться не только как компоненты систем доставки лекарств, но и как модель для изучения закономерностей проникновения лекарств через ногтевую пластину. Данные ряда исследований указывают на перспективность такой модели, позволяющей отказаться от использования нативных ногтей человека и изучать микозы и действие различных фармпрепаратов за счет кератиновых пленок и биомембран (Lusiana et al., 2011; Lusiana et al., 2013; Valkov et al., 2020).

1.3.4. Другие сферы применения

Кератиновые гели также можно рассматривать как альтернативу гиалуроновой кислоте и использовать в качестве наполнителей для омоложения кожи (Wang et al., 2018). Другой способ применения экстрагированного кератина – восстановление структуры поврежденных волос за счет связывания полимера, модифицированного активацией тиоловых групп, с нативным кератином волос (Leichner et al., 2019; Baus et al., 2020).

Кератин из перьев и шерсти рассматривается как альтернатива материалам на основе нефтепродуктов. Кератиновые биопластики относительно прочны, влагостойки, термически стабильны и способны поглощать ультрафиолет, что является важным качеством для упаковочных материалов (Ramakrishnan et al., 2018; Fernández-d'Arlas, 2019; Dou et al., 2020; Pulidori et al., 2021). Инкапсулирование рыбьего жира низкомолекулярным кератином показало хорошие результаты за счет эмульгирующих способностей белка и защиты целевого продукта от ультрафиолета; в то время как срок хранения капсул увеличивался за счет повышения процентного содержания кератина, белок не изменял своей структуры (Yang и Shan, 2021).

Другой проблемой глобальной продовольственной безопасности является недостаточная площадь земель для выращивания сельскохозяйственных культур. Бреннер и Вейхольд показали возможность роста кресс-салата на кератиновом гидрогеле, защищающем корни растений от высыхания (Brenner and Weichold, 2021).

Для защиты окружающей среды необходимо не только предотвращать выбросы загрязняющих веществ, но и разрабатывать методы их адсорбции. Кератиновые материалы показали способность адсорбировать различные красители и тяжелые металлы, что может быть использовано при очистке сточных вод, однако такой подход затруднен из-за слабых механических свойств кератиновых адсорбентов. Эту проблему можно решить, армировав кератиновые матрицы другими полимерами, например фиброином шелка или целлюлозой. Такие методы показали эффективность улучшения механических и регенеративных свойств биоадсорбента на основе кератина (Song et al., 2017; Song et al., 2019; Zhu et al., 2020; Song et al., 2020).

Еще одной областью применения белков отходов животноводства является разработка тензодатчиков на основе альфа-спиралей кератина шерсти, обладающих высокой эластичностью и способностью к восстановлению, что потенциально может быть использовано для производства датчиков движения и систем распознавания голоса (Zhang et al., 2020).

1.4. Гидролизаты кератина и их применение

Гидролизаты кератина, в состав которых входят олигопептиды и аминокислоты, востребованы в различных сферах экономики. Для их получения используется широкий спектр подходов, например термический, кислотный или щелочной гидролиз (Taskin and Kurbanoglu, 2011; Stiborova et al., 2016; Nurdiawati et al., 2018; Tasaki et al., 2020). Гидролизаты кератина различаются по составу в зависимости от способа их производства.

Для получения кератина с более низкой молекулярной массой возможна дополнительная обработка ультрафиолетовым излучением или ультразвуком (Sionkowska et al., 2011; Holkar et al., 2016). Однако исследователи все чаще прибегают к ферментативному производству гидролизатов, поскольку это зелёный метод, позволяющий лучше контролировать состав получаемых смесей (Syrka et al., 2021). Протеазы с кератинолитической активностью являются возобновляемым и безопасным ресурсом, не требующим больших энергетических затрат и позволяющим точно прогнозировать выход целевого продукта, его количественные и качественные характеристики. К сожалению, ферментативный гидролиз обычно недостаточно эффективен из-за высокой стабильности молекул кератина, в связи с чем разрабатываются комбинированные методы получения гидролизатов с использованием кератиназ, щелочей и восстановителей, таких как сульфиты (Mokrejs et al., 2011; Callegaro et al., 2019; Peng et al., 2020).

Кератиновые гидролизаты обладают обширными сферами применения (табл. 4).

Гидролизаты кератина могут быть востребованы в фармацевтике и косметологии в качестве компонентов средств по уходу за кожей, поскольку способны увлажнять кожу и уменьшать трансэпидермальную потерю воды (Mokrejs et al., 2017 (a); Mokrejs et al., 2017 (b)). Гидролиз кератина может приводить к образованию биоактивных пептидов с антиоксидантными и хелатирующими свойствами (Wan et al., 2016; Cavello et al., 2021). Данные литературы свидетельствуют о наличии у гидролизата кератина способности ингибировать такие ферменты, как ангиотензин-превращающий фермент, дипептидилпептидаза-IV, тирозиназа и матриксные металлопротеиназы, разрушающие коллаген и эластин, что может быть использовано в косметике и фармацевтических препаратах, включая разработку антигипертензивных и противодиабетических веществ (Jin et al., 2018; Callegaro et al., 2018; Kshetri et al., 2020).

Области применения гидролизатов кератина

Источник кератина	Метод экстракции	Заявленные свойства	Область применения	Ссылки
Куриные перья	Щелочно-ферментативный	Увлажнение кожи	Косметология	(Mokrejš et al., 2017)
Перья домашней птицы	Ферментативный	Ингибирование матриксной металлопротеазы-1	Биомедицина, косметология	(Jin et al. 2018)
Куриные перья	Ферментативный	Антиоксидантная, антигиперлипидемическая активность	Биомедицина, косметология, функциональная еда	(Kshetri et al., 2020)
Куриные перья	Ферментативный	Стимуляция прорастания семян и роста растений	Биоудобрения	(Tamreihao et al., 2019)
Овечья шерсть	Щелочно-ферментативный	Антимикробная активность, стимуляция роста растений	Биоудобрения	(Gaidau et al., 2021)
Куриные перья	Ферментативный	Повышение концентрации незаменимых аминокислот и микроэлементов	Биоудобрения, функциональная еда	(Kshetri et al., 2019)
Ослиная шерсть	Ферментативный	Синтез витаминов группы В	Компоненты питательных сред	(Hassan et al., 2020)
Перья домашней птицы	Щелочно-ферментативный	Полноценный, недорогой аналог других питательных сред	Компоненты питательных сред	(Stiborova et al., 2016)

Гидролизаты кератина имеют большое значение для сельского хозяйства. В качестве биоудобрений можно использовать смеси аминокислот и олигопептидов (Tamreihao et al., 2019; Kaur et al., 2021; Chen et al., 2022). Показано, что пептиды, полученные за счет гидролиза кератина, способны подавлять рост микроорганизмов, в том числе фитопатогенов (Gaidau et al., 2021). Гидролизаты кератина имеют высокую пищевую ценность и богаты незаменимыми аминокислотами, особенно при получении ферментативным путем, что позволяет использовать их в качестве кормовых добавок (Kshetri et al., 2019; Callegaro et al., 2019).

Еще одной областью применения гидролизатов кератина является приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов. Аминокислоты и олигопептиды, полученные путем переработки отходов животноводства, могут служить дешевым источником органического углерода и азота. Многие исследования показывают, что такой способ повторного использования отходов может привести к синтезу ценных веществ, в том числе биотоплива и витаминов (Bálint et al., 2005; Serna-Cock et al., 2018; Hassan et al., 2020).

В настоящее время одной из потребностей биотехнологической индустрии для разработки и внедрения кератиновых материалов и гидролизатов в медицину, фармацевтику, сельское хозяйство и т.д. остаётся развитие методов выделения и обработки кератина. Применение кератинолитических микроорганизмов и их ферментов для придания кератиновым материалам целевых свойств и получения гидролизатов является перспективным направлением переработки отходов сельского хозяйства, которое отвечает современным тенденциям зеленой экономики. Микромицеты представляются одними из наиболее перспективных организмов для синтеза промышленно значимых кератинолитических ферментов, так как микроскопические грибы способны секретировать протеазы, гидролизующие труднорастворимые фибриллярные белки, в окружающую среду, что облегчает их выделение и очистку. Известно, что грибные кератиназы активны в широком диапазоне рН и температуры, а увеличить выход целевого продукта можно не только за счет подбора оптимального состава среды и условий культивирования, но и применяя различные виды культивирования, в том числе экономически выгодный и экологичный метод твердофазного культивирования. Также важной особенностью микромицетов является мицелиальное строение, способствующее быстрому разложению труднорастворимых отходов, благодаря прорастанию гиф внутрь субстрата (de Souza et al., 2015).

1.5. Грибы как продуценты кератиназ

Истинные грибы – мицелиальные или дрожжевые формы, относящиеся к таксону Fungi. Грибы играют важную роль в жизни человека как промышленные продуценты многих веществ, в том числе ферментов. Известно, что грибы способны к секреции широкого спектра протеаз, гидролизующих как глобулярные, так и фибриллярные белки (de Souza et al., 2015). Способность синтезировать кератинолитические ферменты или наличие генов, кодирующих эти ферменты, были обнаружены у представителей обеих групп высших грибов: базидио- и аскомицетов (Duffeck et al., 2020; Alwakeel et al., 2021). Существуют данные о кератиназах дрожжей (Hadrich et al., 2022; Abd El-Aziz et al., 2023), но способность расщеплять кератин больше распространена среди мицелиальных форм. Долгое время кератинолитическую активность изучали в основном как фактор патогенности грибов-дерматофитов (Mercer and Stewart, 2019), однако в настоящее время накоплен большой массив знаний о кератиназах непатогенных или условно-патогенных грибов, более перспективных для промышленного применения (Wang et al., 2023).

1.5.1. Кератинолитические микромицеты

Микромицеты способны секретировать комплексы протеолитических ферментов с различной субстратной специфичностью и активных в широком диапазоне условий, в том числе при росте на трудноразлагаемых белковых субстратах, что делает их перспективными продуцентами кератиназ (de Souza et al., 2015). Эффективность микромицетов в гидролизе кератина объясняется не только высокой секреторной активностью, но и мицелиальным строением, способствующим разрушению кератиновых материалов под действием физического давления (Mitola et al., 2002). В таблице 5 приведены сведения о микромицетах и их кератиназах с известными биохимическими свойствами.

Кератиказы микромицетов с известными биохимическими свойствами

Класс	Продуцент	Молек. масса (кДа)	pH-оптимум (диапазон устойчивости)	Температурный оптимум (диапазон устойчивости), °C	Гидролизуемые субстраты	Авторы
Сериновые протеазы	<i>Aspergillus flavus</i>	31	8 (7-10)	45 (30-70)	азокератин, азоказеин	Kim, 2007
	<i>Aspergillus niger</i>	60	5	-	казеин, БСА, перьевая мука, кератин пера, волосы, шерсть	Mazotto et al., 2013
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	36	7	50	кератин	Anitha and Palanivelu, 2013
	<i>Aspergillus tamaritii</i>	-	8 (5-11)	40 (10-40)	азоказеин, азоколлаген, кератин пера	da Silva et al., 2016
	<i>Doratomyces microspores</i>	30	8-9	50	твердый и мягкий кератин	Gradišar et al., 2000
	<i>Myrothecium verrucaria</i>	22	8.3	37	кератин пера	Moreira-Gasparin et al., 2009
	<i>Paecilomyces marquandii</i>	33	8 (6-11)	60-65	кератин ноктей	Gradišar et al., 2005
	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	37	6 (4-9)	60 (20-65)	волосы	Cavello et al., 2012, 2013
	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	36-39	8	40	перья	Anbu et al., 2005
	<i>Trichoderma atroviride</i>	21	8-9 (4-11)	50-60 (26-70)	казеин, желатин, БСА, перья	Cao et al., 2008

Таблица 5 (продолжение).

Класс	Продуцент	Молек. масса (кДа)	рН-оптимум (диапазон устойчивости)	Температурный оптимум (диапазон устойчивости), °С	Гидролизуемые субстраты	Авторы
Металлопротеазы	<i>Aspergillus niger</i>	60	5	-	казеин, БСА, перьевая мука, кератин пера, волосы, шерсть	Mazotto et al., 2013
	<i>Aspergillus oryzae</i>	60	8	50	БСА, казеин, кератин, коллаген, перья, шерсть	Farag and Hassan, 2004
	<i>Penicillium sp.</i>	19	7-8	50	отходы птицеводства	El-Gendy, 2010
	<i>Penicillium sp.</i>	40	10-11	60-65	отходы птицеводства	El-Gendy, 2010
Неопределенного класса	<i>Aspergillus fumigatus</i>	24	6	50	перья	Paul et al., 2014
	<i>Aspergillus stelliformis</i>	-	8	50	кератин пера	Alwakeel et al., 2021
	<i>Aspergillus sulphureus</i>	-	10 (6.5-9)	35 (25-60)	кератин пера	Sousa et al., 2015
	<i>Aspergillus sydowii</i>	-	8	50	кератин пера	Alwakeel et al., 2021
	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	-	8	50	кератин пера	Alwakeel et al., 2021
	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	28	7-7.5 (4-11)	50 (30-80)	растворимый кератин из куриных перьев	Sankar et al., 2014

«-» – данные отсутствуют; БСА – бычий сывороточный альбумин

Многие виды микромицетов образуют кератиназы, однако значительный процент из них являются дерматофитами и не пригодны для промышленного использования. В связи с этим необходимо изучение непатогенных или условно патогенных видов с кератинолитической активностью (Lange et al., 2016). Как видно из таблицы 5, среди известных кератиназ микромицетного происхождения преобладают сериновые протеазы, но некоторые микроскопические грибы синтезируют металлопротеазы с кератинолитической активностью. Оптимум действия протеолитических ферментов, гидролизующих кератин и синтезируемых микроскопическими грибами, может лежать как в кислой области, так и в нейтральной или щелочной, при этом диапазон активности некоторых из этих ферментов достаточно широк, так например, внеклеточные протеазы *Trichoderma atroviride* и *Scopulariopsis brevicaulis* сохраняют способность расщеплять фибриллярные белки в среде с pH от 4 до 11 (Cao et al., 2008; Sankar et al., 2014). Температурный оптимум грибных кератиназ обычно находится в пределах 35-65°C. А субстратная специфичность данных ферментов характерна для всей группы кератинолитических протеаз. Известны кератиназы микромицетов, способные расщеплять как мягкий, так и твердый кератин, а также некоторые другие фибриллярные белки, например коллаген (Purchase, 2016).

С каждым годом объём знаний о грибных кератиназах растёт, однако уровень исследованности бактериальных протеаз остаётся значительно выше. Наиболее изученным кератинолитическим ферментом грибного происхождения по сей день остаётся протеиназа К, синтезируемая *Tritirachium album*. Данная протеаза относится к классу субтилизиноподобных и обладает широкой субстратной специфичностью (Ebeling et al., 1974). Однако её применение ограничено в основном научными исследованиями в области молекулярной биологии. Протеиназу К используют для очистки от контаминации белками, в том числе нуклеазами, проб ДНК и РНК, выделения митохондрий и выявления межбелковых поверхностных взаимодействий (Hilz et al., 1975; La Claire et al., 1997). Также было показано, что данный фермент способен гидролизовать прионы, вызывающие трансмиссивные губчатые энцефалопатии – нейродегенеративные заболевания человека и животных (Kuczius and Groschup, 1999).

В связи с низким уровнем изученности грибных кератиназ в настоящее время остаются актуальными исследования по поиску новых продуцентов-микромицетов кератинолитических ферментов, а также по изучению свойств этих протеаз и способам увеличения их синтеза.

1.5.2. Способы увеличения биосинтеза кератиназ микромицетного происхождения

Микроскопические грибы, способные к разложению кератинсодержащих материалов, выделяют из разных мест обитания: почвы, морей, отходов животноводства (Li, 2019). Очевидно, условия для высокого уровня продукции ферментов данными организмами различны и требуют подбора для каждой культуры.

Одним из самых распространенных способов получения внеклеточных протеаз, как в лабораторных, так и в промышленных условиях, является глубинное культивирование продуцентов. К важным параметрам данного культивирования относятся температура, pH и состав среды. Особое внимание уделяется источникам азота и углерода. Так, кератинолитические штаммы микромицетов *Alternaria tenuissima* K2 и *Aspergillus nidulans* K7 показали протеолитическую активность по отношению к отходам птицеводства при росте в жидкой среде с измельченными перьями в качестве единственного источника углерода и азота. Добавление крахмала или мальтозы незначительно повышали кератинолитическую активность этих грибов, а другие источники углерода, а также минерального и органического азота либо не имели эффекта, либо ингибировали синтез кератиназ (Saber et al., 2010). Было показано, что и секреция внеклеточных протеаз микромицета *Aspergillus flavus* K-03 достигала максимума при культивировании гриба на среде с перьями. Добавление глюкозы увеличивало накопление биомассы, но не кератинолитическую активность, а использование других сахаров снижало синтез ферментов (Kim, 2003). Максимум активности при культивировании микроскопического гриба *Fusarium oxysporum* достигался при внесении в среду не перьев, а свиной щетины (Preczeski et al., 2020). Наибольший выход целевого продукта, секретлируемого микромицетом *Scopulariopsis brevicaulis*, наблюдался при совместном использовании как источника минерального азота (нитрат натрия), так и органического (перья), а также глюкозы (Anbu et al., 2007).

Оптимальный pH ферментационной среды для синтеза внеклеточных протеаз, гидролизующих кератин, микромицетного происхождения обычно лежит в нейтральной или слабощелочной области, а температура, при которой достигается максимум накопления кератинолитической активности, находится в диапазоне 30-40°C. Время культивирования штаммов микроскопических грибов, способных к разложению кератина, также различно и может варьировать от нескольких дней до 5 недель (Anbu et al., 2007; Lopes et al., 2011).

Ещё одним способом наработки внеклеточных протеаз является твердофазное культивирование (ТФК), характеризующийся ростом микроорганизмов на твердых

увлажненных частицах в отсутствие свободной воды. Это гетерогенный процесс, включающий твердую, жидкую и газовую фазы, однако жидкая вода находится исключительно в капельной форме, благодаря чему условия культивирования приближены к почвенным и имитируют рост продуцента в природе (Pandey, 2003). В качестве твердой фазы могут быть использованы как инертные носители, так и субстраты, служащие источником питательных веществ, например, отходы агропромышленного комплекса. Данный подход позволяет не только увеличить выход продукта, но также снизить энергозатраты и стоимость целевого фермента за счет уменьшения объема используемой ферментационной среды, культивирования микроорганизмов на дешевом твердом субстрате и отсутствия необходимости в дополнительной аэрации культуры за счет перемешивания и, как следствие, неостребованности пеногасителей. Также ТФК является более экологичным методом в сравнении с глубинными культивированием благодаря снижению расхода воды и количества образуемых сточных вод (Hölker et al., 2004). При использовании в качестве субстрата кератинсодержащих материалов эффективность их разложения повышается из-за мицелиального строения микроскопических грибов и прорастания гиф внутрь частиц, что приводит к их разрыхлению и проникновению протеаз вглубь субстрата. Так, например, при росте *Trichoderma harzianum* на перьевой муке в качестве субстрата для твердофазного культивирования продукция кератиназ увеличивалась в 7 раз относительно глубинного культивирования (Bagewadi et al., 2018). Эффективность использования перьевой муки для синтеза кератинолитических ферментов в твердофазных условиях была также показана для культуры *Aspergillus niger* (de Oliveira et al., 2019). А культивирование микромицета *Aspergillus tamaris* на различных субстратах растительного происхождения выявило предпочтительность использования пшеничных отрубей для максимального накопления внеклеточных протеаз, гидролизующих кератин (da Silva et al., 2016).

К способам, позволяющим увеличить уровень биосинтеза внеклеточных протеаз, также можно отнести культивирование продуцентов в иммобилизованном состоянии, клонирование гена целевого фермента в вектор под промотор, обеспечивающий гиперэкспрессию, увеличение копийности гена и использование в качестве хозяина гена культуру микроорганизма, более подходящую для промышленного использования (Kothari et al., 2017), однако эффективность данных подходов еще не была изучена для кератиназ микромицетного происхождения.

Таким образом, несмотря на очевидную перспективность микроскопических грибов в биодеградации отходов животноводства, а также в качестве продуцентов кератиназ,

востребованных в медицине, фармацевтике и других отраслях экономики, количество знаний, накопленных о кератинолитических штаммах микромицетов, не относящихся к дерматофитам, и их протеазах, расщепляющих кератин, является недостаточным. Изучение таких протеаз может привести к созданию коммерческих препаратов более дешевых, чем существующие аналоги на основе бактериальных кератиназ, интенсификации переработки отходов агропромышленного комплекса, увеличению уровня рационального использования ресурсов, расширению представлений о возможном применении кератинолитических ферментов и кератина.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты 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 им. М.В. Ломоносова. Всего в работе были использованы 32 коллекционных штамма микроскопических грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* и *Chaetomium* (Приложение 1).

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*, *Tolypocladium* и *Trichoderma* (Приложение 2).

Поддержание культур осуществляли на скошенном сусло-агаре или агаризованной среде Чапека при хранении при комнатной температуре (25°C). Все питательные среды и условия культивирования микромицетов, использованные в этой работе, приведены в приложении 3.

2.2. Общая схема работы

Поэтапный план исследования включал в себя постановку накопительных культур кератинолитических микромицетов, дальнейшее выделение чистых культур и проведение первичного скрининга с новыми и коллекционными штаммами грибов на агаризованных средах. Культуры с наибольшим кератинолитическим потенциалом были также использованы во вторичном скрининге, который проводили с применением жидких сред. Затем оптимизировали получение целевых ферментов путём подбора условий культивирования самых активных штаммов. В выбранных условиях нарабатывали ферментные препараты для очистки кератиназ и изучения их биохимических и физико-химических свойств. Общая схема работы показана на рисунке 7.

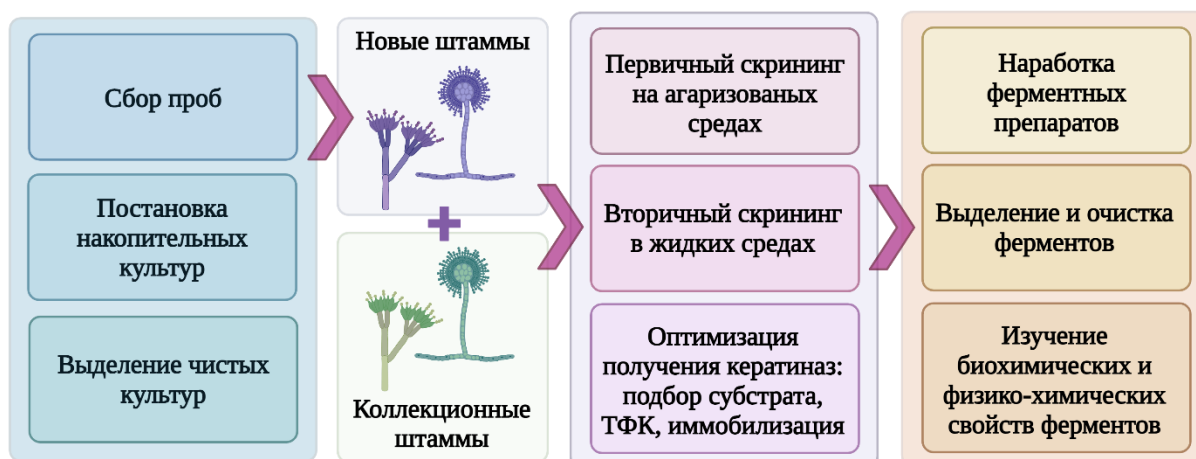


Рис. 7. Общая схема работы.

2.3. Выделение чистых культур кератинолитических микромицетов и их идентификация по морфолого-культуральным признакам

Пробы почвы и органической подстилки птичников 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, %: NaNO_3 - 0.3, K_2HPO_4 - 0.1, MgSO_4 - 0.05, KCl - 0.05, FeSO_4 - 0.001, пептон - 0.1. Культивирование проводили в статических условиях при 28°C в течение 1 месяца. Затем путём рассева 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: среда Чапека с 3% содержанием сахарозы и сусло-агар для *Aspergillus* и *Penicillium* и среда на основе овсяного отвара для *Acremonium-like* и *Fusarium*, и др. Культуры инкубировали в термостате при 28°C в течение 7-10 дней. Если культуры не формировали спороношения, то их выдерживали при дневном освещении и смене температур до образования спор. Для идентификации у культур описывали культуральные признаки: диаметр колоний на 7 сутки роста, цвет мицелия и спороношения, характер поверхности колонии, характер реверса, текстуру мицелия, характер роста, характер края колонии, образование пигмента, образование экссудата, запах и т.д. Для изучения

микроскопических признаков и морфометрии структур, связанных с размножением, готовили препараты в концентрированной молочной кислоте, при необходимости подкрашивали красителем Cotton blue. Использовали модифицированный микроскоп МИКМЕД-6 (ЛОМО, Россия). 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 TheMycoBankFungal databases (<http://www.mycobank.org>).

2.4. Молекулярно-генетическая идентификация микромицетов

Среди изучаемых культур микромицетов проводили скрининг для выявления протеолитического потенциала. 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 (приложение 4). 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 домена D1/D2 большой субъединицы (LSU) рРНК депонировали в базу данных NCBI Genbank под номерами OR018528 (*Cladosporium pseudocladosporioides* C66), OR018407 (*Penicillium sizovae* C11), OR018406 (*Keratinophyton terreum* C106), OR018405 (*Tolyposcladium inflatum* ST1), OR018529 (*Aspergillus versicolor* C51), OR018530 (*Aspergillus ochraceus* ST2) и OK559552 (*Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593). 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.

2.5. Скрининг микромицетов на способность секретировать протеазы

2.5.1. 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 трёх средах следующего состава (%): KH_2PO_4 – 0.05, MgSO_4 – 0.025, пептон – 0.5, агар – 1.5. В качестве основного источника углерода и азота в среды добавляли 1.0% казеина по

Хаммерштайну или желатина, или 0.5% кератина шерсти. Посев проводили уколом в центр чашки Петри (90 мм). После 7 дней культивирования при 28°C негидролизованые белки осаждали 10% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и проводили измерения диаметров колоний и зон гидролиза. Энзиматические индексы (EI) рассчитывали по формуле: $EI = d_2/d_1$, где d_1 – диаметр колонии (мм), а d_2 – диаметр зоны гидролиза (мм).

Для культур микромицетов с наибольшими рассчитанными энзиматическими индексами также были получены данные при культивировании штаммов на аналогичных средах с фибрином и эластином. Эти культуры были отобраны для вторичного скрининга.

2.5.2. Вторичный скрининг коллекционных штаммов микромицетов

Вторичный скрининг микромицетов, взятых из коллекций кафедры микробиологии и кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, проводили в глубинных условиях при перемешивании на орбитальных качалках (200 об/мин) и 28°C. Посев осуществляли споровой суспензией, полученной смывом спор с культуры на 7 сутки культивирования на скошенном сусло-агаре в колбы Эрленмейера (750 мл) в 100 мл сред следующего состава:

- Среда №1 (%): K_2HPO_4 – 0.1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.05, KCl – 0.025, NaCl – 0.025, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0.001, глюкоза – 3.0, кератин шерсти – 0.5; pH 5.5
- Среда №2 (%): K_2HPO_4 – 0.1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.05, KCl – 0.025, NaCl – 0.025, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0.001, глюкоза – 3.0, кератин шерсти – 0.5, $NaNO_3$ – 0.3; pH 5.5
- Среда №3 (%): K_2HPO_4 – 0.1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.05, KCl – 0.025, NaCl – 0.025, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0.001, глюкоза – 3.0, $NaNO_3$ – 0.3; pH 5.5

На 3 и 7 сутки культивирования производили стерильный отбор проб, отфильтровывали культуральную жидкость от биомассы через бумажные фильтры, далее использовали фильтрат для определения ферментативной активности.

Культура, показавшая наибольшую ферментативную активность с целевыми субстратами, (*Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593) была отобрана для дальнейших исследований по влиянию источника кератина на профиль накопления кератинолитических ферментов.

Для изучения синтеза внеклеточных протеаз отобранной культурой *A. clavatus* ВКПМ F-1593 проводили её двухстадийное глубинное культивирование. Сначала микроскопический гриб выращивали в 100 мл посевной среды (сусло – 6.7, глюкоза – 2.0,

пептон – 0.1, (%), pH 5.5) в колбах Эрленмейера (750 мл) при 28°C на орбитальных качалках (200 об/мин) в течение двух суток. Далее 3% (по объему) наработанной биомассы переносили в одну из ферментационных сред следующего состава:

- Среда №4 (%): NaNO_3 – 0.3, K_2HPO_4 – 0.1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, KCl – 0.05, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.001, глюкоза – 3.0, гидролизат рыбной муки (ГРМ) – 0.5, кератин – 0.5; pH 6.0
- Среда №5 (%): NaNO_3 – 0.3, K_2HPO_4 – 0.1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, KCl – 0.05, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.001, глюкоза – 3.0, ГРМ – 0.5, перемолотое куриное перо – 0.5; pH 6.0
- Среда №6 (%): NaNO_3 – 0.3, K_2HPO_4 – 0.1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, KCl – 0.05, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.001, глюкоза – 3.0, ГРМ – 0.5, цельные куриные перья – 0.5; pH 6.0

Куриные перья предварительно вымачивали в водном 0.1% растворе Твин-20 при интенсивном перемешивании в течение 20 минут, после промывали дистиллированной водой и инкубировали при 87°C до полного высыхания.

Культивирование проводили в условиях, аналогичных для посевной среды. После выращивания микромицета в ферментационной среде полученную культуральную жидкость отфильтровывали от биомассы через бумажные фильтры и использовали для определения ферментативной активности.

2.5.3. Скрининг микромицетов при глубинном культивировании на отходах сельского хозяйства

Штаммы микромицетов, выделенные из накопительных культур и показавшие наибольшие значения EI, а также коллекционные штаммы микроскопических грибов, отобранные в результате вторичного скрининга, культивировали на отходах сельского хозяйства в глубинных условиях. Двухстадийное культивирование проводили при перемешивании на орбитальных качалках (200 об/мин) и 28°C. Сначала споровую суспензию, полученную смывом споровой массы 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: 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.

2.6. Методы и условия культивирования продуцентов для оптимизации получения целевых ферментов

Для культур с наибольшей целевой ферментативной активностью также были определены динамики накопления протеолитической активности при двухстадийном глубинном культивировании.

Для оптимизации получения целевых ферментов также исследовали влияние условий культивирования на накопление протеаз отобранных культур. Измерение целевых активностей проводили при твердофазном культивировании штаммов изучаемых микромицетов и при их глубинном культивировании в иммобилизованном состоянии.

2.6.1. Глубинное культивирование в иммобилизованном состоянии

Для иммобилизации клеток использовали альгинат натрия и каррагинан. С поверхности культуры микромицета делали смыв спор стерильной водой, содержащей 0.0001% Твин-80, после чего споры смешивали с растворами иммобилизующих агентов. В случае с микроспоровыми грибами в качестве посевного материала использовали трехдневную культуру, выращенную на посевной среде. Смеси суспензии биомассы гриба с растворами альгината (3.5%) и каррагинана (3%) по каплям добавляли к охлажденным растворам 0.3 М CaCl_2 и 2%-ного KCl соответственно, инкубировали не менее 8 ч при 4°C для формирования гранул, после чего промывали стерильной дистиллированной водой. Полученные гранулы иммобилизованной биомассы микромицетов вносили в питательную среду для дальнейшего культивирования. Для стабильности гранул альгината кальция в питательную среду дополнительно вносили 0.05 М CaCl_2 .

2.6.2. Твердофазное культивирование

Твердофазное культивирование (ТФК) микромицетов проводили в конических колбах объемом 250 мл с вермикулитом (5 г), куриными перьями (0.7 г), свиной щетиной (1.7 г), или смесью куриного пера и свиной щетины (0.4 и 0.9 г соответственно). Колбы с инертным носителем (вермикулитом) стерилизовали и добавляли стерильную ферментационную среду (20 мл), состав которой был аналогичен оптимальному составу для глубинного культивирования штамма. В колбы с субстратом (куриными перьями и свиной щетиной) добавляли ту же среду (10 мл), но не содержащую кератин-богатый материал

(отходы животноводства). Засев осуществляли 1 мл споровой суспензии, полученной путем смыва спор с выращенной на сусло-агаре культуры (7 сутки) стерильным водным 0.0001% раствором Твина-80, или 1 мл трехдневной культуры, выращенной на посевной среде, в случае с микроспоровыми грибами. Культивирование проводили в статичных условиях при 28°C.

Для элюции протеолитических ферментов использовали 0.05М Трис-НСl буфер, рН 8.2. В колбы с культурой добавляли по 35 мл буфера, после чего их помещали на орбитальную качалку (200 об/мин) на 60 мин. Элюат отфильтровывали через бумажные фильтры и использовали для определения ферментативной активности.

2.7. Сканирующая электронная микроскопия кератинсодержащих субстратов

Для изучения степени гидролиза кератинсодержащих отходов агропромышленного комплекса проводили сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) образцов после ТФК. Для СЭМ образцы фиксировали 2.5%-ным раствором глутарового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.3) в течение 12 ч и обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации (30–96%). После окончательной дегидратации в абсолютном этаноле образцы выдерживали 12 ч в ацетоне и высушивали на установке НСР-2 (Hitachi, Япония). Далее образцы напыляли смесью металлов Au-Pd Eiko IB-3 Ion Coater (Hitachi, Япония) и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (Jeol, Япония), при ускоряющем напряжении 15 кВ. В качестве контроля использовали образцы кератинсодержащих субстратов до и после автоклавирования, не засеянные микромицетом.

2.8. Методы определения ферментативной активности

2.8.1. Определение кератинолитической активности

Кератинолитическую активность внеклеточных протеаз определяли спектрофотометрически с использованием 1% суспензии кератина шерсти (ТСI, Япония) в 0.05 М Трис-НСl буфере (рН 8.2).

Для проведения реакции к 100 мкл пробы добавляли 200 мкл суспензии кератина. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин в термошейкере при 600 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин, после чего в надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при длине волны 280 нм.

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0.01 ед. в условиях проведения реакции.

2.8.2. Определение общей протеолитической (казеинолитической) активности

Казеинолитическую активность внеклеточных протеаз микромицета определяли модифицированным методом Ансона-Хагихары, суть которого заключается в определении активности фермента как характеристики пропорциональной количеству аминокислоты тирозина, входящей в состав олигопептидов, образующихся во время гидролиза казеина.

Для проведения реакции к 100 мкл пробы добавляли 200 мкл 1% раствора казеина по Хаммерштайну в 0.1 М Трис-НСl буфере (рН 8.2). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин в термошейкере при 600 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10% раствора ТХУ. Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин, после чего в надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при длине волны 275 нм (Осмоловский и др., 2016).

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0.01 ед. в условиях проведения реакции.

2.8.3. Определение ферментативной активности с использованием хромогенных пептидных субстратов (ХПС)

Определение ферментативной активности с использованием хромогенных пептидных субстратов (ХПС) основано на специфичности узнавания последовательностей остатков аминокислот в пептидах эндопептидазами. ХПС являются олигопептидами с концевым п-нитроанилином (pNA). В связанном состоянии pNA бесцветен, а в свободном – окрашивает раствор в желтый цвет. Так, под действием протеаз с активностями, аналогичными активностям ферментов, на механизм действия которых опирались при создании определенного ХПС, происходит гидролиз ХПС с высвобождением pNA. Реакции с использованием хромогенных пептидных субстратов позволяют определить аминокислотные последовательности, в большей или меньшей степени специфично узнаваемые конкретным ферментом.

Для проведения реакции к 200 мкл пробы добавляли 50 мкл буфера (0.05 М Трис-НСl, рН 8.2), после чего в реакционную смесь вносили 100 мкл 0.05% раствора ХПС, приготовленного в том же буфере. Смесь инкубировали при 37°C в течение 5 мин в термошейкере при 600 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50% уксусной

кислоты. Затем в растворе измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм (Осмоловский и др., 2012).

В ходе исследования для определения субстратной специфичности изучаемых внеклеточных протеаз проводили реакции с 17 хромогенными пептидными субстратами (таблица 6).

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0.01 ед. в условиях проведения реакции.

Таблица 6.

Хромогенные пептидные субстраты, использованные в работе

Коммерческое обозначение субстрата	Аминокислотная последовательность
S-2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA
S-2302	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA
-	Z-Ala-Ala-Leu-pNA
-	N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA
-	N-Suc-Ala-Ala-Val-pNA
-	Z-Gly-Gly-Leu-pNA
-	N-Suc-Gly-Gly-Phe-pNA

2.9. Получение комплексного препарата внеклеточных белков

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 при 4000 об/мин в течение 45 мин при 4°C. Полученный осадок растворяли в 0.01 М Трис-НСl-буфере (рН 8.2) и диализовали в диализных мешочках против 0.005 М Трис-НСl-буфера на холоду в течение 24 часов на магнитной мешалке. Отдиализованный раствор центрифугировали в тех же условиях для удаления нерастворимой части осадка. Супернатант замораживали жидким азотом в круглодонной

колбе и лиофильно высушивали под вакуумом. Лиофилизированный препарат хранили при -20°C .

2.10. 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 pH 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. В фракциях измеряли pH, количество белка спектрофотометрически при длине волны 280 нм и ферментативную активность. Фракции хранили при -20°C .

2.11. 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 (Laemmli, 1970) с концентрацией акриламида в концентрирующем геле 5% и в разделяющем геле – 15%. Белки разделяли при силе тока 25 мА. Для определения молекулярной массы фермента использовали набор предокрашенных метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoScientific, США). Фиксацию геля проводили в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 30% изопропанола, в течение 30 минут. Затем гель окрашивали в растворе 0.1% Кумасси R-250 в 1% уксусной кислоте и 5% изопропаноле в течение 35 минут. После гель отмывали в 7% растворе уксусной кислоты.

2.12. Проведение ингибиторного анализа

Для изучения влияния ингибиторов на активность кератинолитических ферментов использовали фенилметилсульфонилфторид (PMSF; 1.5 мМ), этилендиаминтетраацетат натрия (EDTA; 1.0 мМ), п-хлормеркурийбензоат (PCMB; 1.0 мМ), N-p-тозил-L-фенилаланин хлорметилкетон (TPCK; 0.5 мМ), тозил-L-лизин хлорметил-N-альфа кетон гидрохлорид (TLCK; 0.5 мМ), соевый ингибитор трипсина (SBTI; 0.5 мг/мл). Изучаемые ферменты предварительно инкубировали в растворах ингибиторов протеаз (0.05 М Трис-HCl буфер, pH 8.2) в течение 1 ч при 25°C . Начальную и остаточную активность фермента определяли при проведении реакции с ХПС, как описано выше, после прединкубации фермента с ингибитором и выражали в процентах от контроля (реакция без ингибитора).

2.13. Определение гликозилирования белков методом дот-блоттинга

Для выявления наличия углеводного компонента изучаемых кератиназ проводили анализ на определение гликозилирования белков с реактивом Шиффа. В качестве положительного контроля использовали инвертазу дрожжей, в качестве отрицательного контроля – бычий сывороточный альбумин. Нитроцеллюлозную бумагу промывали в дистиллированной воде 5 мин, а затем высушивали на фильтровальной бумаге. После нанесения образцов (5-10 мкл) и их высыхания нитроцеллюлозную бумагу погружали в окисляющий реактив (1% HNO_4 в 3% уксусной кислоте) на 30 минут, затем промывали мембрану дистиллированной водой (2 раза по 5 мин). Далее нитроцеллюлозную бумагу погружали в восстанавливающий реактив (0.1% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ в 10 мМ HCl) 2 раза на 5 минут. После восстанавливающего раствора нитроцеллюлозу инкубировали в реактиве Шиффа до появления розового окрашивания положительного контроля (около 15 мин) и снова промывали в восстанавливающем растворе 2 раза по 5 мин, после чего высушивали мембрану на воздухе.

2.14. Определение температурного оптимума и температурной стабильности активности протеазы

Оптимальную температуру 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.

2.15. Определение pH-оптимума и стабильности активности протеазы

Оптимальный pH 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, pH 3.0–11.0) с соответствующим значением pH. Оставшуюся протеолитическую активность анализировали, как упоминалось ранее, с ХПС и кератином. Полученные результаты выражали в процентах от максимального значения.

Для определения pH-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.

2.16. 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 $p < 0.05$.

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ¹

3.1. Первичный скрининг коллекционных штаммов микромицетов

Для оценки потенциала изучаемых штаммов в качестве продуцентов внеклеточных протеаз, перспективных для биодеградациии, были рассчитаны их энзиматические индексы при росте на трёх агаризованных средах, содержащих казеин (E_{Iказ.}), кератин (E_{Iкер.}) и желатин (E_{Iжел.}). Полученные результаты представлены в таблице 7.

¹Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

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)];
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);
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)].

Таблица 7.

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

Таблица 7 (продолжение).

Культура	ЕI _{каз.}	ЕI _{кер.}	ЕI _{жел.}
<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

Как видно из данных, представленных в таблице 9, 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 (рис. 8). Для данных культур также были рассчитаны энзиматические индексы на средах с фибрином (ЕI_{фибр.}) и эластином (ЕI_{эл.}). Соотношения энзиматических индексов отобранных культур на средах с различными белковыми субстратами к энзиматическим индексам на среде с казеином приведены в таблице 8.

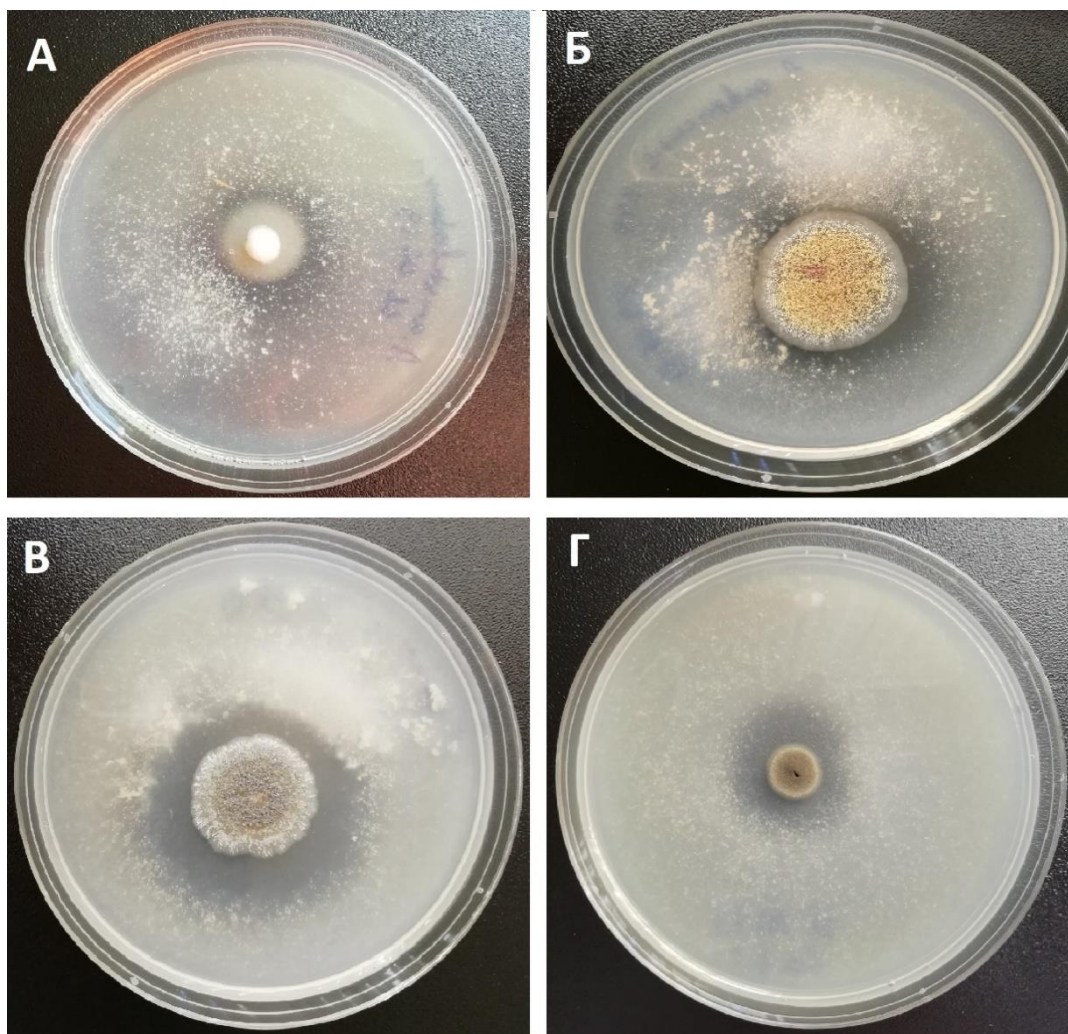


Рис. 8. Микромицеты *Aspergillus amstelodami* А6 (А), *A. ochraceus* 247 (Б), *A. clavatus* ВКПМ F-1593 (В) и *Cladosporium sphaerospermum* 1779 (Г) на среде с казеином.

Таблица 8.

Соотношения энзиматических индексов микромицетов *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* А6, *A. ochraceus* 247 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779

Культура	ЕI _{кер.} / ЕI _{каз.}	ЕI _{жел.} / ЕI _{каз.}	ЕI _{фibr.} / ЕI _{каз.}	ЕI _{эл.} / ЕI _{каз.}
<i>A. amstelodami</i> А6	1.26	0.93	1.28	0.70
<i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593	0.71	1.13	0.75	0.58
<i>A. ochraceus</i> 247	0.97	1.37	1.05	0.90
<i>C. sphaerospermum</i> 1779	0.61	1.18	0.72	0.67

Как видно из таблицы 8, соотношения энзиматических индексов на среде с эластином к энзиматическим индексам на среде с казеином ($EI_{эл.} / EI_{каз.}$) у всех исследуемых микромицетов меньше единицы, что может свидетельствовать о низкой специфичности внеклеточных протеаз данных культур по отношению к эластину. Низкий уровень эластолитической активности обычно указывает на низкую степень патогенности микроорганизмов (Kothary et al., 1984; Tamura et al., 1992; Khosravi et al., 2012), что является необходимым свойством для промышленных продуцентов.

Протеолитические ферменты, секретируемые *A. amstelodami* А6, по-видимому, обладают высоким сродством к кератину (1.26) и фибрину (1.28), но не к желатину (0.93), являющимся частично гидролизованным коллагеном, что может говорить о специфичности этих протеаз по отношению к фибриллярным белкам. Ферменты других отобранных штаммов микромицетов не показали высокой специфичности к фибриллярным белкам, однако абсолютные значения их энзиматических индексов позволяют сделать предположение о существовании у них потенциала в качестве продуцентов кератиназ.

3.2. Вторичный скрининг коллекционных штаммов микромицетов

Вторичный скрининг проводили в глубинных условиях с четырьмя отобранными культурами: *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* А6, *A. ochraceus* 247 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779. 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. 9-10).

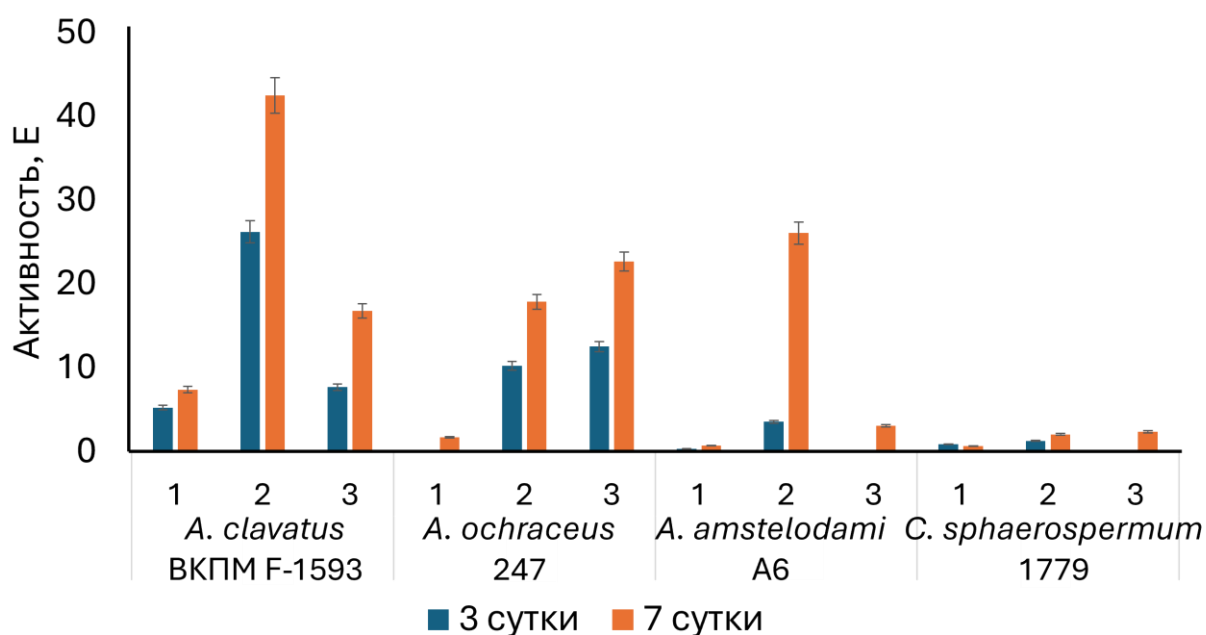


Рис. 9. Кератинолитическая активность микромицетов *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. ochraceus* 247, *A. amstelodami* А6 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779 при культивировании на средах с различными источниками азота: 1 – среда с кератином, 2 – среда с кератином и нитратом натрия, 3 – среда с нитратом натрия.

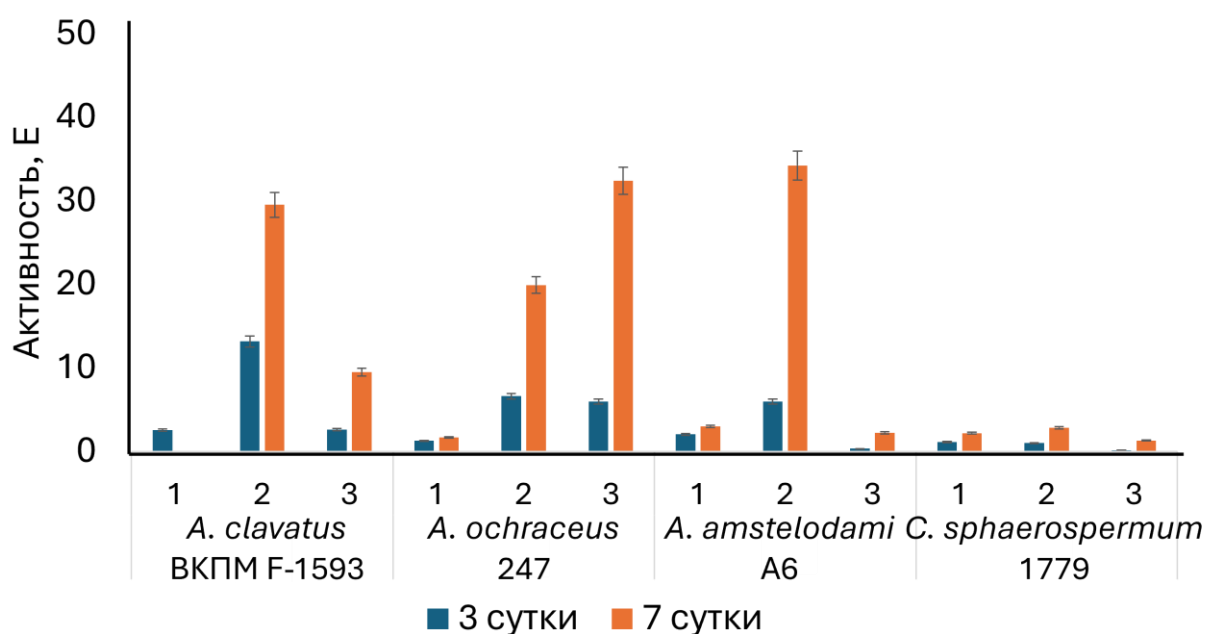


Рис. 10. Казеинолитическая активность микромицетов *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* А6, *A. ochraceus* 247 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779 при культивировании на средах с различными источниками азота: 1 – среда с кератином, 2 – среда с кератином и нитратом натрия, 3 – среда с нитратом натрия.

Как видно из результатов вторичного скрининга, 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.

3.3. Влияние источника кератина на динамику накопления внеклеточных протеолитических ферментов микромицетом *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593

Изучение динамики накопления внеклеточных протеолитических ферментов микромицетом *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 проводили в условиях глубинного культивирования на трёх ферментационных средах, различающихся по источнику кератина, в течение 8 суток. Среда №4 содержала кератин шерсти, среда №5 – перемолотое куриное перо, а в состав среды №6 входили куриные перья. Измерения протеолитической активности (кератинолитической и казеинолитической) в культуральной жидкости осуществляли со вторых суток культивирования (рис. 11-13).

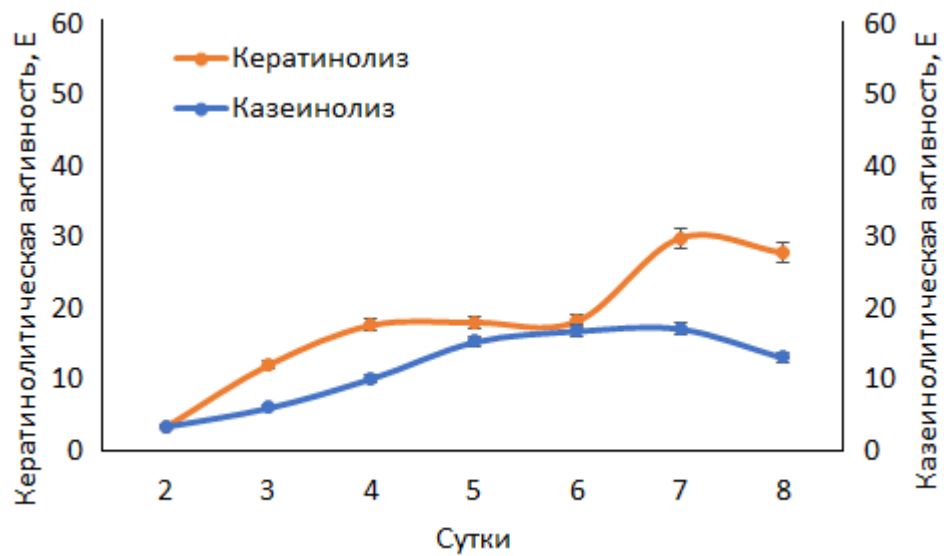


Рис. 11. Динамика накопления экзопротеаз микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на среде №4.

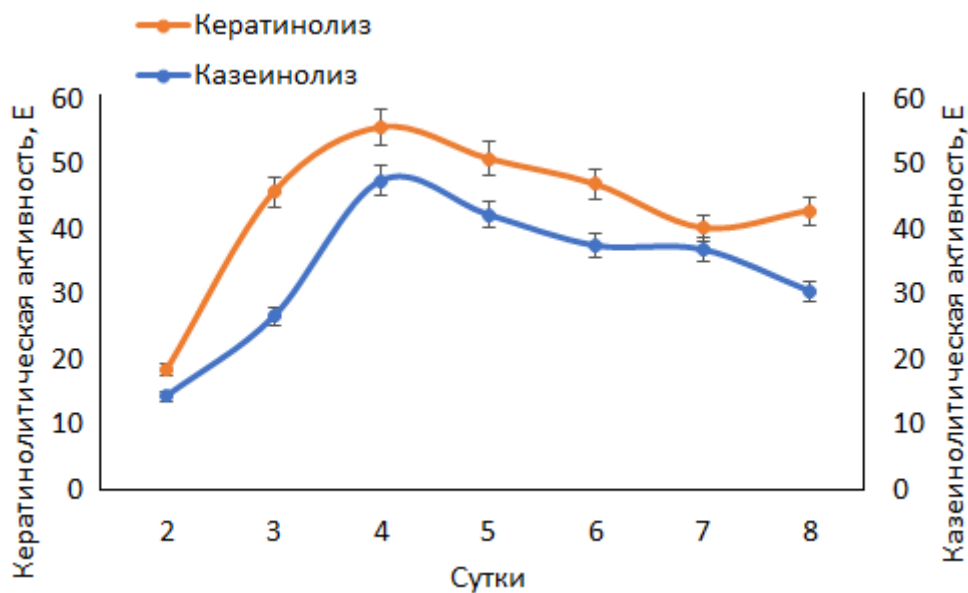


Рис. 12. Динамика накопления экзопротеаз микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на среде №5.

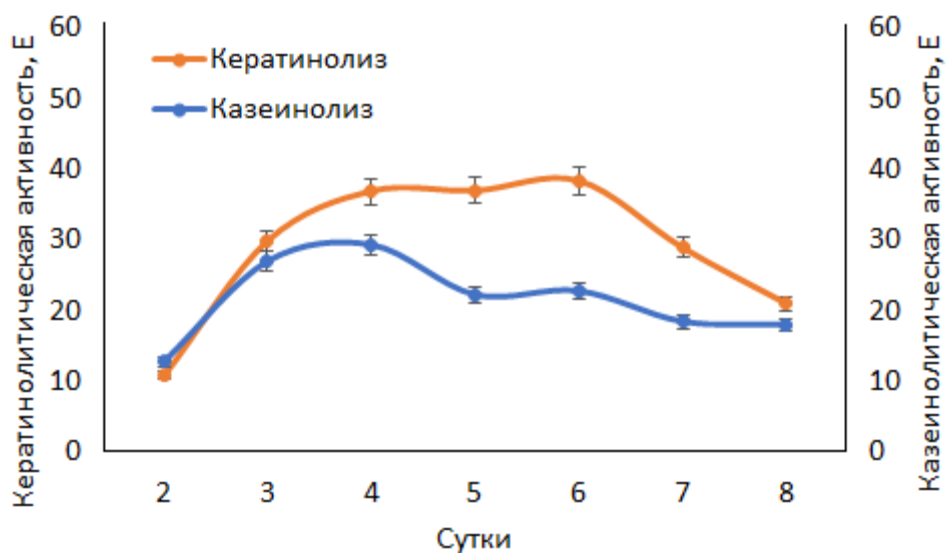


Рис. 13. Динамика накопления экзопротеаз микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на среде №6.

Как видно из результатов, наибольшие абсолютные значения кератинолитической (55.6 Е) и казеинолитической (47.5 Е) активности были получены при культивировании микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на среде №5, содержащей перемолотое куриное перо. Также важно отметить, что пик протеолитической активности на этой среде наступал на четвертые сутки, что является ещё одним преимуществом перед другими использованными средами.

При культивировании продуцента на среде №6 (с цельными куриными перьями) максимум накопления кератиназ (37.4 Е) приходился на временной промежуток с четвертых по шестые сутки, а казеинолитических ферментов (29.3 Е) – на четвёртые сутки. Меньшие значения протеолитической активности, как и выход на плато активности протеаз, расщепляющих кератин, при использовании среды №6 может быть связано с большей труднодоступностью субстрата в составе цельных перьев и возможностью мицелия микромицета обрастать мелкие частицы перьевой муки, что приводит к увеличению площади гиф, секретирующих ферменты.

При культивировании *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на среде №4 (с кератином шерсти) максимум активности кератиназ (29.9 Е) приходился на 7 сутки, а наибольшая казеинолитическая активность (16.5 Е) вышла на плато с пятых по седьмые сутки. Столь низкие значения протеолитической активности в сравнении с другими средами могут быть объяснены использованием α -, а не β -кератина, входящего в состав перьев. Также, возможно, другие компоненты пера обладают стимулирующим действием на синтез экзопротеаз, в связи с чем использование чистого кератина становится менее эффективным.

При культивировании *A. clavatus* ВКПМ F-1593 в глубинных условиях наблюдалось защелачивание среды. При изначальном pH ферментационных сред 6.0 уже ко вторым суткам культивирования значение достигало pH 7.5, а к седьмым – pH 8.8. Такое явление может быть связано с дезаминированием продуктов гидролиза кератина, которое приводит к образованию ионов аммония, увеличивающих pH среды. Некоторые исследователи уже отмечали возможность защелачивания среды при культивировании кератинолитических микроорганизмов и связывали это с pH-оптимум активности протеаз (Kunert, 2000). В связи с этим можно предположить, что кератиназы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 обладают pH-оптимумом в щелочной области.

Для расширения представлений о существующих кератинолитических микромицетах также проводили работу по получению накопительных культур кератинолитических микроорганизмов для дальнейшего выделения и изучения чистых культур мицелиальных грибов, способных к секреции кератиназ.

3.4. 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). Данные морфолого-культуральной идентификации показали, что выделенные грибы 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 9.

Таблица 9.

Энзиматические индексы выделенных штаммов микромицетов на средах с различными белковыми субстратами

Место отбора пробы	Культура	ЕI _{каз.}	ЕI _{кер.}	ЕI _{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>Tolypocladium 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, Нижегорский 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 (Qiu et al., 2020). Также часто встречающимися среди выделенных грибов оказались микромицеты двух родов - *Aspergillus* и *Penicillium*. EI этих культур на средах с казеином и желатином значительно превышали 1 (максимальные значения EI на казеине (3.76) и желатине (3.75) были получены при росте *Aspergillus versicolor* C72L), что согласуется с данными литературы о перспективности микромицетов родов *Aspergillus* и *Penicillium* в качестве продуцентов протеолитических ферментов (de Souza et al., 2015). 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.

Для отобранных штаммов микромицетов были также определены энзиматические индексы на среде с эластином (EI_{эл.}). Соотношения энзиматических индексов отобранных культур на средах с различными белковыми субстратами к энзиматическим индексам на среде с казеином приведены в таблице 10.

Таблица 10.

Соотношения энзиматических индексов отобранных штаммов микромицетов

Культура	ЕI _{кер.} / ЕI _{каз.}	ЕI _{жел.} / ЕI _{каз.}	ЕI _{эл.} / ЕI _{каз.}
<i>Aspergillus ochraceus</i> ST2	0.75	1.23	0.58
<i>Aspergillus versicolor</i> C51	0.46	0.37	0.19
<i>C. pseudocladosporioides</i> C66	0.51	0.73	0.18
<i>Keratinophyton terreum</i> C106	1.07	0.80	0.75
<i>Penicillium sizovae</i> C11	0.66	1.40	0.50
<i>Tolypocladium inflatum</i> ST1	0.66	0.82	0.60

Соотношения EI на среде с эластином к EI на среде с казеином у всех изучаемых культур ниже 1, что указывает на низкую субстратную специфичность внеклеточных протеаз этих штаммов к эластину. Так как эластолитическая активность обычно рассматривается в качестве фактора патогенности (Kothary et al., 1984; Tamura et al., 1992; Khosravi et al., 2012), то низкое сродство ферментов к эластину можно считать важной

характеристикой для продуцентов биотехнологически значимых веществ. Только у двух культур (*A. ochraceus* ST2 и *P. sizovae* C11) отношение EI на среде с желатином к EI на среде с казеином оказались выше 1. Способность гидролизовать желатин может служить индикатором наличия коллагенолитической активности. Коллагенолитическая активность в совокупности с кератинолитической является большим преимуществом в биодegradации отходов животноводства и кожевенной промышленности при использовании протеаз для придания мягкости ткани и ее лучшему окрашиванию (Kanth et al., 2008), однако при ферментативном обезволаживании кожи коллагенолитическая активность снижает качество конечного продукта (Fang et al., 2017). Именно поэтому поиск и изучение кератинолитических микроорганизмов, синтезирующих протеазы с разной субстратной специфичностью – важная задача современной биотехнологии. Соотношение EI на среде с кератином к EI на среде с казеином оказалось выше 1 только у *K. terreum* C106, что согласуется с данными литературы о том, что представители этого рода являются геофильными грибами, специализирующимися на деградации кератинсодержащих субстратов (Labuda et al., 2021), но несмотря на это, их протеазы слабо изучены на данный момент.

3.5. Молекулярно-генетическая идентификация отобранных микромицетов

Для семи отобранных культур микромицетов (*Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *Aspergillus ochraceus* ST2, *Aspergillus versicolor* C51, *Cladosporium pseudocladosporioides* C66, *Keratinophyton terreum* C106, *Penicillium sizovae* C11 и *Tolyposcladium inflatum* ST1) была дополнительно проведена молекулярно-генетическая идентификация и построены филогенетические дендрограммы (рис. 14-15), которые подтвердили результаты идентификации по морфолого-культуральным признакам.

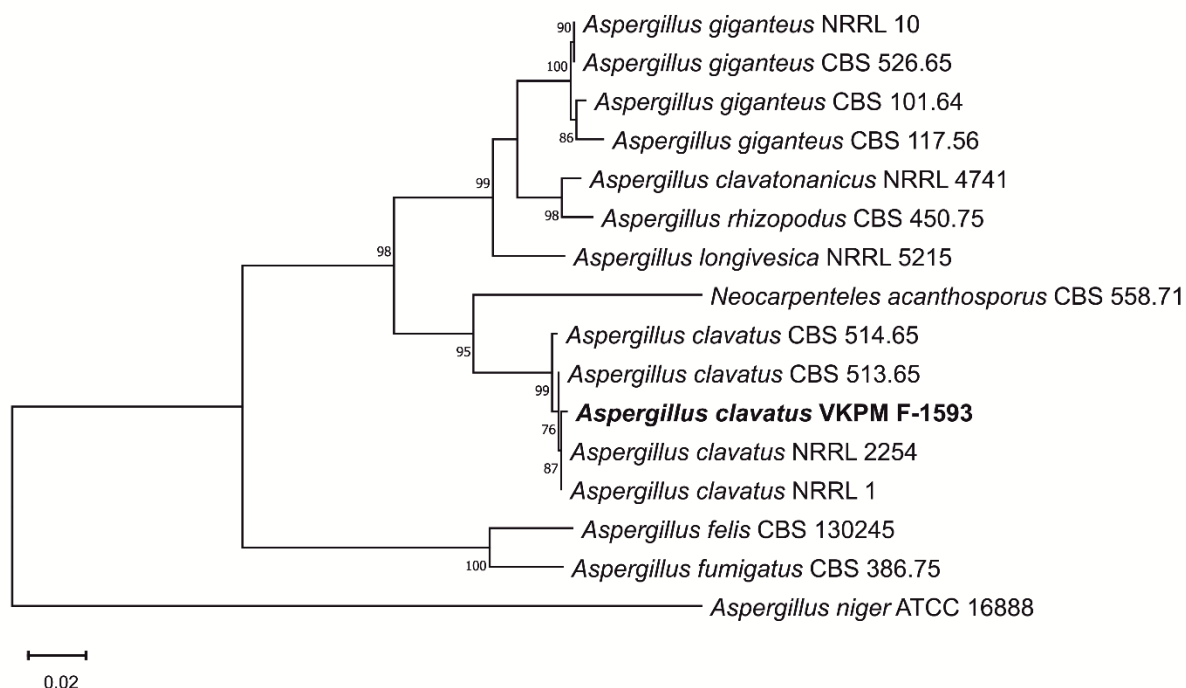


Рис. 14. Филогенетическая дендрограмма, основанная на конкатенированных последовательностях генов β -тубулина (*benA*) и D1/D2 доменов большой субъединицы (26S) генов рибосомной РНК. Последовательности ДНК штамма *A. clavatus* ВКПМ F-1593 сравнивали со штаммами, принадлежащими к секции Clavati рода *Aspergillus* (Varga et al., 2007) и другим близкородственным видам. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия в программе MEGA 10.0. Bootstrap-анализ был выполнен с использованием 1000 повторений. Указаны значения выше 70%.

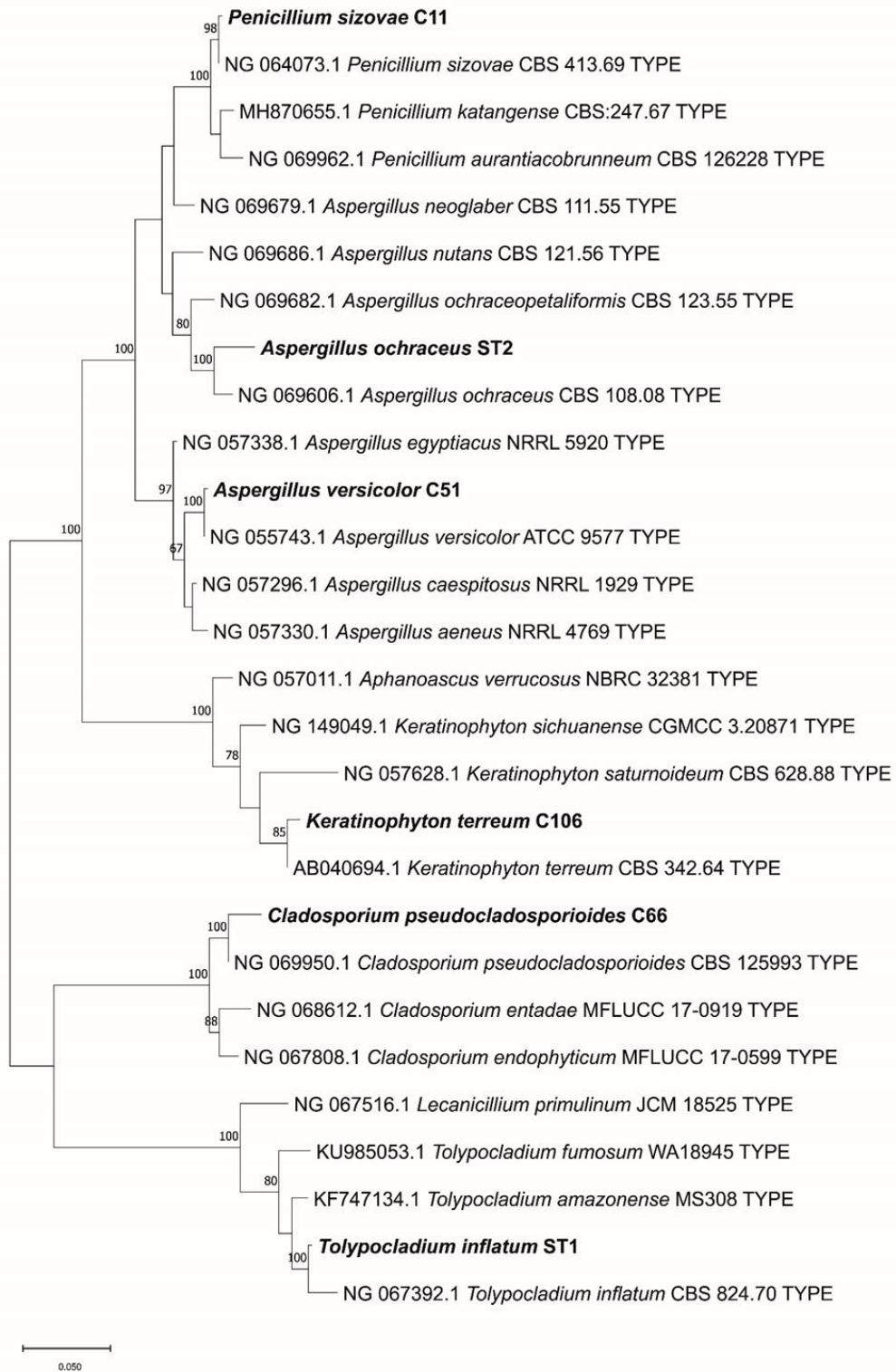


Рис. 15. Филогенетическая дендрограмма, основанная на последовательностях D1/D2 доменов большой субъединицы (26S) генов рибосомной РНК. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия в программе MEGA 10.0. Bootstrap-анализ был выполнен с использованием 1000 повторений. Указаны значения выше 70%.

3.6. Скрининг отобранных микромицетов при глубинном культивировании на различных отходах сельского хозяйства

Для оптимизации получения целевых ферментов отобранные штаммы микромицетов (*Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *Aspergillus ochraceus* ST2, *Aspergillus versicolor* C51, *Cladosporium pseudocladosporioides* C66, *Keratinophyton terreum* C106, *Penicillium sizovae* C11 и *Tolyposcladium 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 (рис. 16-22).

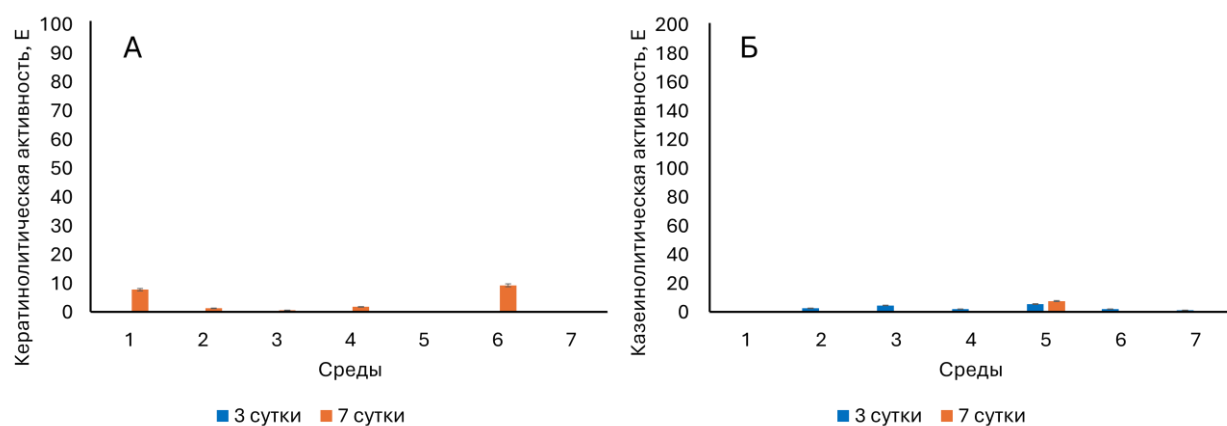


Рис. 16. Протеолитическая активность *Cladosporium pseudocladosporioides* C66: А – кератинолиз, Б – казеинолиз. Источники азота в средах: 1 – нитрат натрия, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – нитрат натрия; 3 – нитрат натрия и перемолотое перо; 4 – нитрат натрия и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо.

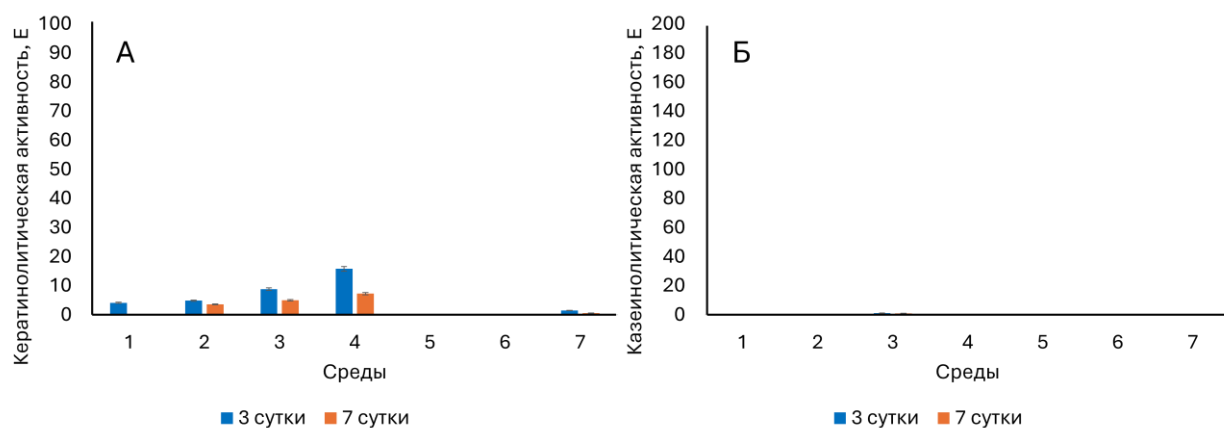


Рис. 17. Протеолитическая активность *Penicillium sizovae* C11: А – кератинолиз, Б – казеинолиз. Источники азота в средах: 1 – нитрат натрия, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – нитрат натрия; 3 – нитрат натрия и перемолотое перо; 4 – нитрат натрия и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо.

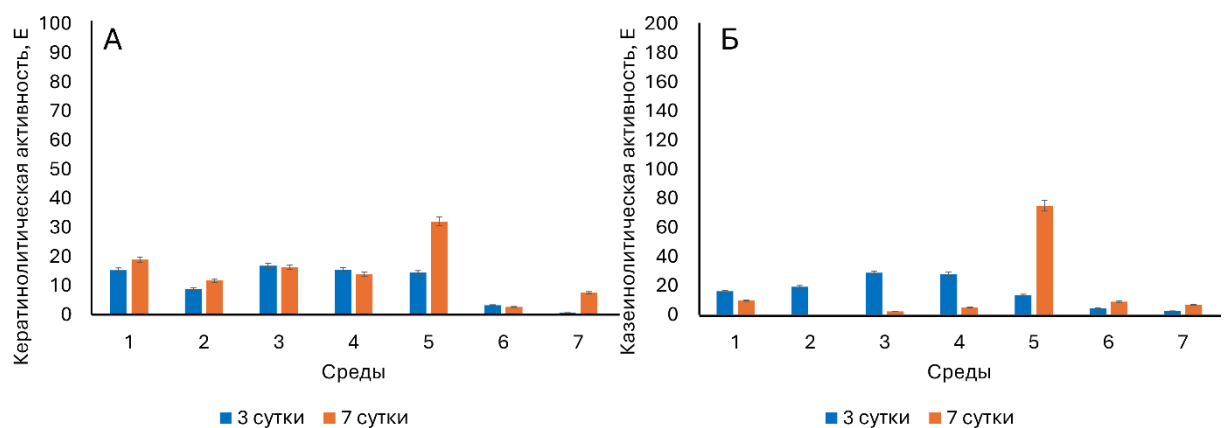


Рис. 18. Протеолитическая активность *Aspergillus ochraceus* ST2: А – кератинолиз, Б – казеинолиз. Источники азота в средах: 1 – нитрат натрия, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – нитрат натрия; 3 – нитрат натрия и перемолотое перо; 4 – нитрат натрия и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо.

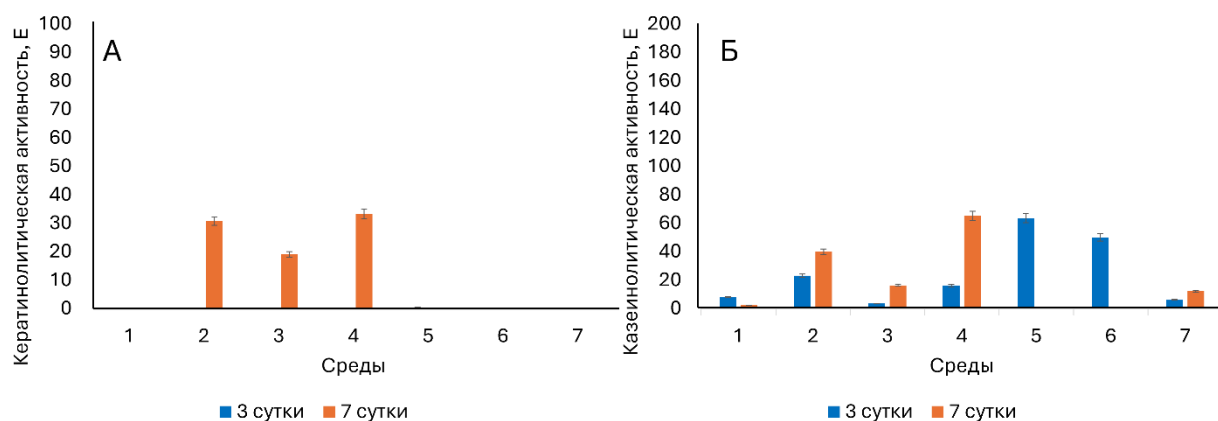


Рис. 19. Протеолитическая активность *Aspergillus versicolor* C51: А – кератинолиз, Б – казеинолиз. Источники азота в средах: 1 – нитрат натрия, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – нитрат натрия; 3 – нитрат натрия и перемолотое перо; 4 – нитрат натрия и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо.

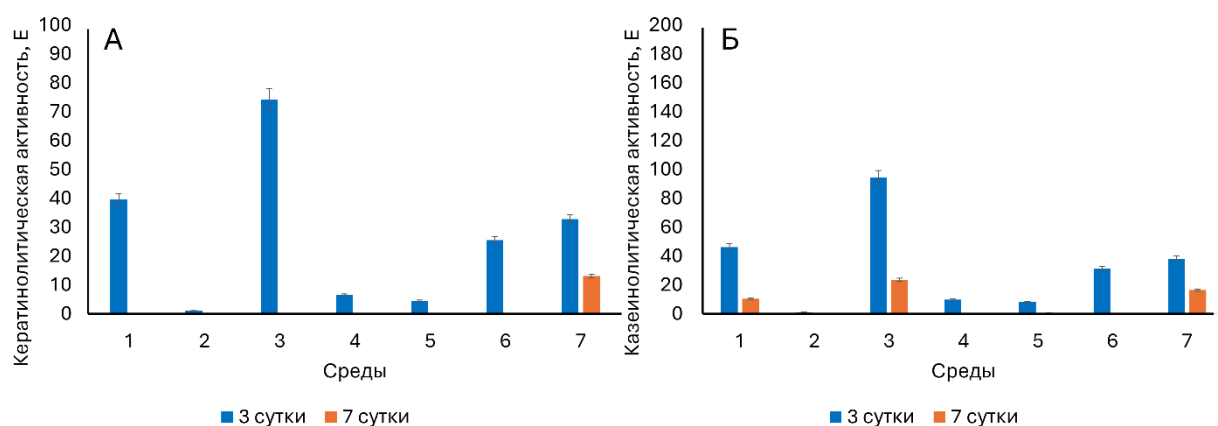


Рис. 20. Протеолитическая активность *Keratinophyton terreum* C106: А – кератинолиз, Б – казеинолиз. Источники азота в средах: 1 – нитрат натрия, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – нитрат натрия; 3 – нитрат натрия и перемолотое перо; 4 – нитрат натрия и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо.

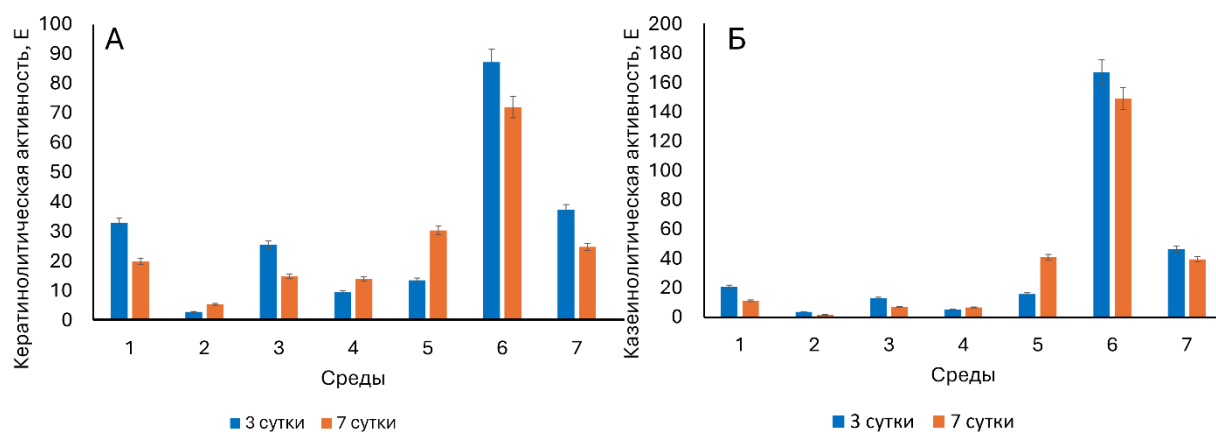


Рис. 21. Протеолитическая активность *Tolypocladium inflatum* ST1: А – кератинолиз, Б – казеинолиз. Источники азота в средах: 1 – нитрат натрия, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – нитрат натрия; 3 – нитрат натрия и перемолотое перо; 4 – нитрат натрия и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо.

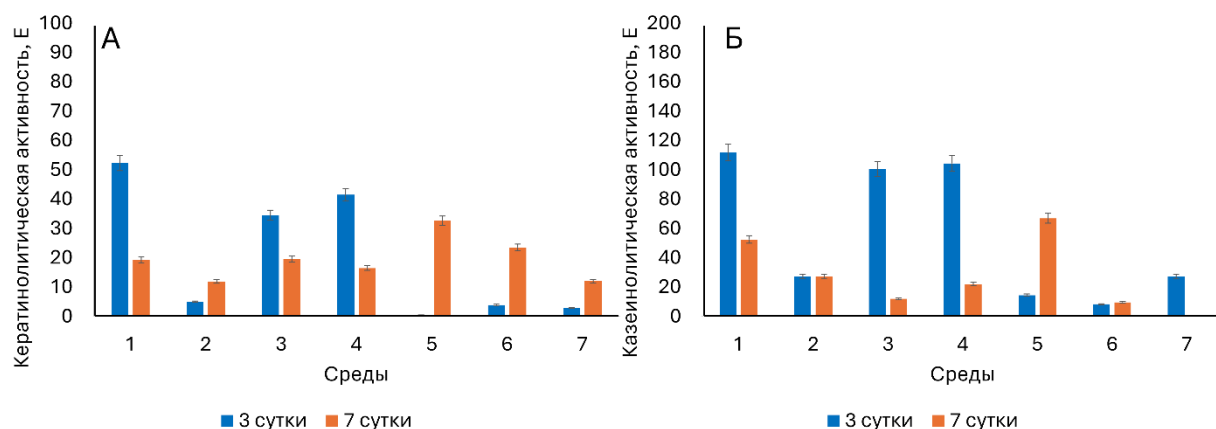


Рис. 22. Протеолитическая активность *Aspergillus clavatus* VKPM F-1593: А – кератинолиз, Б – казеинолиз. Источники азота в средах: 1 – нитрат натрия, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – нитрат натрия; 3 – нитрат натрия и перемолотое перо; 4 – нитрат натрия и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо.

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.

Наибольшие значения целевой активности были получены при культивировании *Keratinophyton terreum* С106, *Tolypocladium inflatum* ST1 и *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593. Максимальный уровень кератинолитической (74.2 Е) и казеинолитической (94.4 Е) активности *K. terreum* С106 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.

3.7. Динамика накопления внеклеточных протеолитических ферментов микромицетом *T. inflatum* ST1 при глубинном культивировании

Для изучения динамики накопления целевых протеаз *T. inflatum* ST1 продуцент культивировали в глубинных условиях на оптимальной среде, подобранной ранее. Кератинолитическая и казеинолитическая активность была измерена со 2 по 8 сутки культивирования (рис. 23).

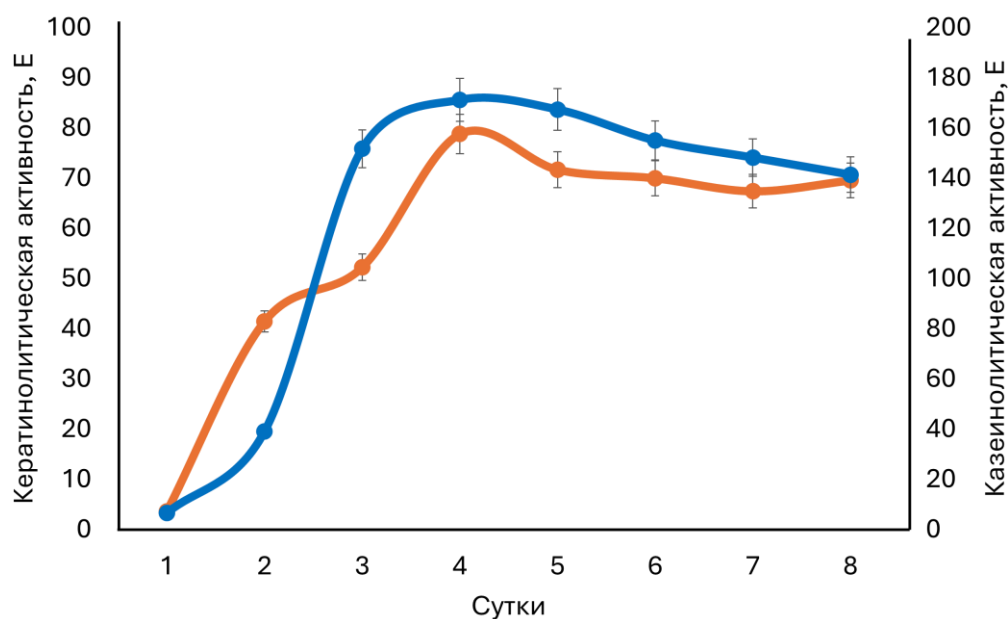


Рис. 23. Динамика накопления внеклеточных протеаз культурой *T. inflatum* ST1 при глубинном культивировании: оранжевая линия – кератинолиз; синяя линия – казеинолиз.

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 секретируемых казеинолитических ферментов штамма *T. inflatum* ST1 совпадал с таковым для кератинолитической активности.

3.8. Синтез кератинолитических ферментов при твердофазном культивировании и культивировании в иммобилизованном состоянии микромицетами *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1

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. Результаты измерения целевой активности представлены на рисунках 24-25.

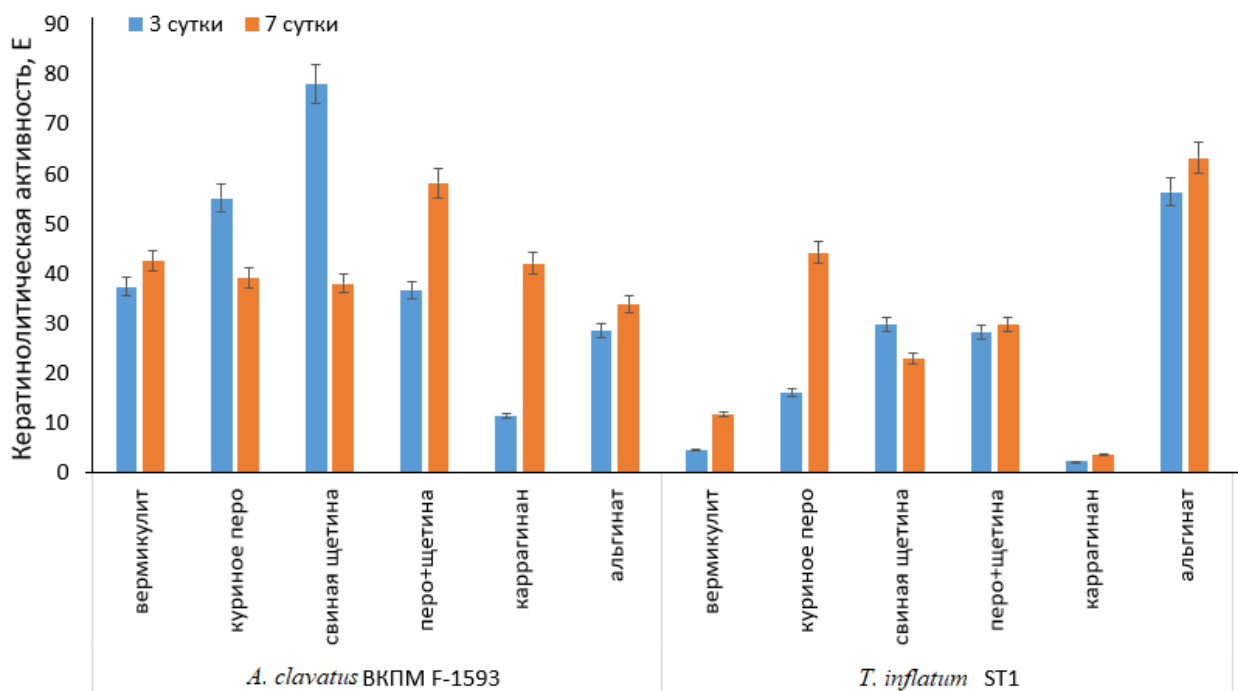


Рис. 24. Кератинолитическая активность микромицетов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1 при твердофазном культивировании и глубинном культивировании в иммобилизованном состоянии.

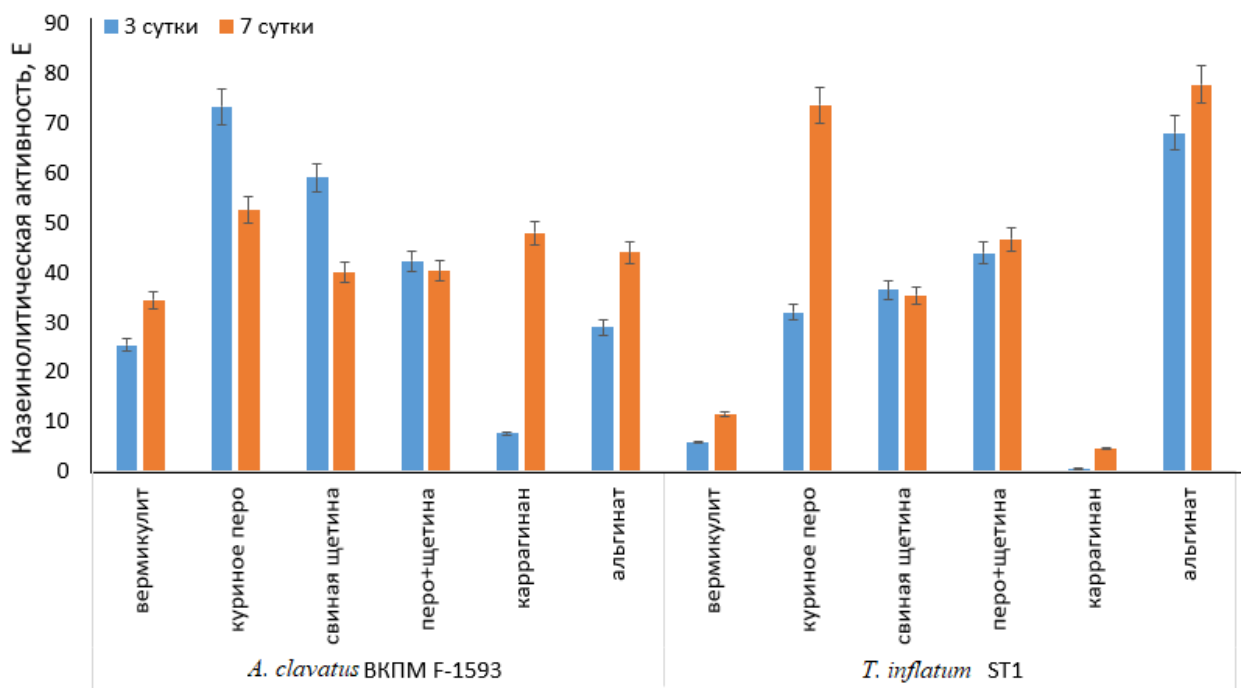


Рис. 25. Казеинолитическая активность микромицетов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1 при твердофазном культивировании и глубинном культивировании в иммобилизованном состоянии.

При иммобилизации культуры *T. inflatum* ST1 в каррагинане целевая активность значимо не отличалась от нуля ни на 3, ни на 7 сутки культивирования. А при попытке иммобилизации штамма в альгинате кальция гранулы растворялись во время роста продуцента. Такие результаты позволяют сделать вывод о том, что классическое глубинное культивирование является оптимальным методом для наработки кератиназ *T. inflatum* ST1.

При создании твердофазных условий для выращивания микромицета *T. inflatum* ST1 максимальный уровень целевой активности достигался на 7 сутки культивирования: казеинолитическая активность – 73.7 Е, кератинолитическая активность – 44.3 Е, что значительно ниже активности, проявленной продуцентом при глубинном культивировании (рис. 23). В связи с этим было принято решение проводить дальнейшие работы с ферментами микромицета *T. inflatum* ST1, полученными при глубинном культивировании этого гриба.

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 (рис. 26-27).

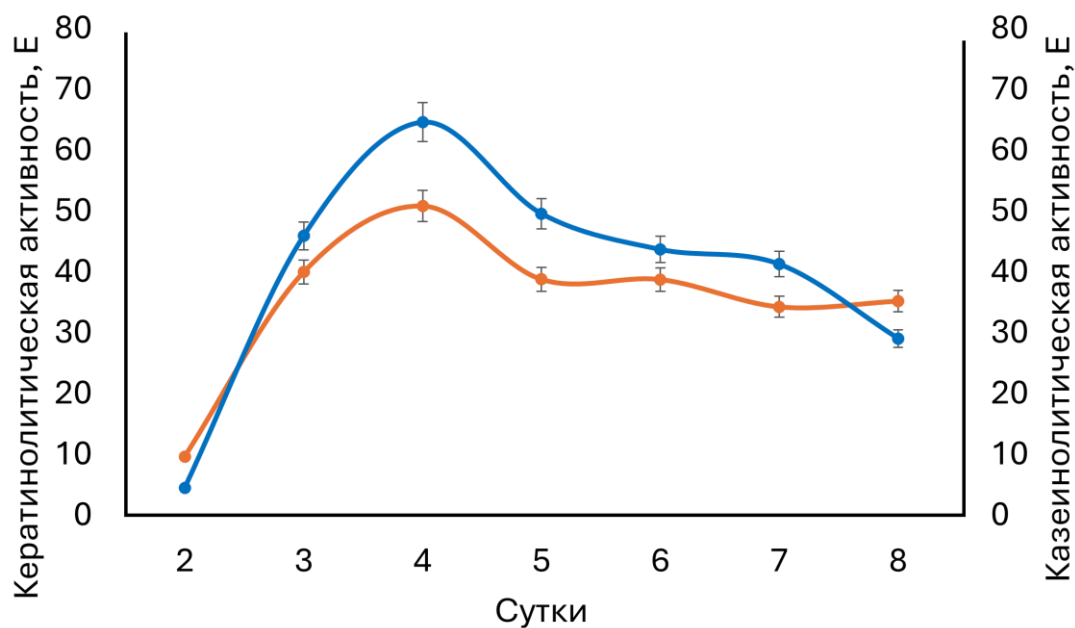


Рис. 26. Динамика накопления внеклеточных протеаз микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 при твердофазном культивировании на курином пере: оранжевая линия – кератинолиз; синяя линия – казеинолиз.

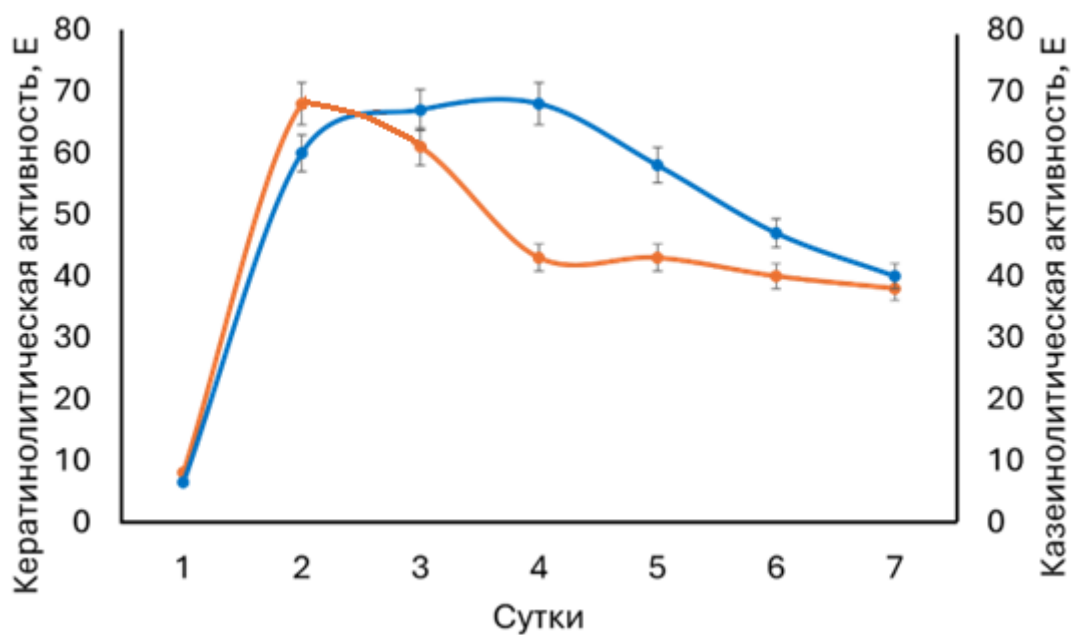


Рис. 27. Динамика накопления внеклеточных протеаз микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 при твердофазном культивировании на свиной щетине: оранжевая линия – кератинолиз; синяя линия – казеинолиз.

Определение динамики накопления целевых протеаз штаммом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 показало, 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 перьях почти в 9 раз превышает активность при глубинном культивировании, а при ТФК на щетине – почти в 14 раз (табл. 11).

Таблица 11.

Удельная ферментативная активность кератиназ *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593

Условия культивирования	Кератинолитическая активность, Е/мл	Казеинолитическая активность, Е/мл
Глубинное культивирование	0.56	0.47
ТФК на свиной щетине	7.80	5.91
ТФК на цельных перьях	4.91	4.54

Высокая удельная ферментативная активность продуцента при ТФК указывает на перспективность этого метода культивирования для переработки отходов сельского хозяйства и наработки кератинолитических ферментов. Малый объём питательной среды, одностадийность культивирования, отсутствие необходимости в активном перемешивании и использовании пеногасителей и высокая активность *A. clavatus* ВКПМ F-1593 позволяет считать ТФК потенциально одним из наиболее многообещающих подходов к биodeградации кератинсодержащих отходов как с точки зрения воздействия на окружающую среду, так и по энергоёмкости и рентабельности процесса.

3.9. Деградация кератинсодержащих отходов микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593

Для определения степени разрушения отходов, богатых кератином, под воздействием микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 осуществляли визуальную оценку состояния субстрата для ТФК до и после роста продуцента, а также проводили сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) образцов после ТФК. Визуально свиная щетина, покрытая мицелием, остаётся целостной вплоть до 5-6 суток культивирования продуцента, тогда как при засеве куриных перьев микромицетом их гидролиз заметен уже на 3 сутки, а рост продуцента обилён. Цвет культуры, форма и цвет конидий остаются типичными для представителя вида *A. clavatus* при росте продуцента на отходах животноводства в условиях ТФК. В качестве контроля использовали образцы кератинсодержащих субстратов до и после автоклавирования, не засеянные микромицетом. Фотографии, полученные путём СЭМ представлены на рисунках 28-29. Как видно на фотографиях, целостность структуры куриного пера действительно нарушается уже на 3 сутки культивирования *A. clavatus*

ВКПМ F-1593, тогда как к 6-7 суткам, когда перо уже полностью теряет свою нативную форму и распадается на волокна, мы способны увидеть разные слои кератина на фотографиях. Целостность же свиной щетины нарушается на 4 сутки культивирования, что заметно только благодаря СЭМ, но не детектируется визуально.

Измерение кератинолитической активности проводили с кератином шерсти, богатым альфа-кератином, в то время как в кератине пера преобладают бета-складки, и из-за ригидности такой тип кератина плохо поддается выделению и очистке в нативной форме. Несмотря на большие значения кератинолитической и казеинолитической активности при росте *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на свиной щетине, гидролиз пера шёл значительно эффективнее, что может указывать на специфичность ферментов продуцента к кератину пера при росте на соответствующем субстрате.

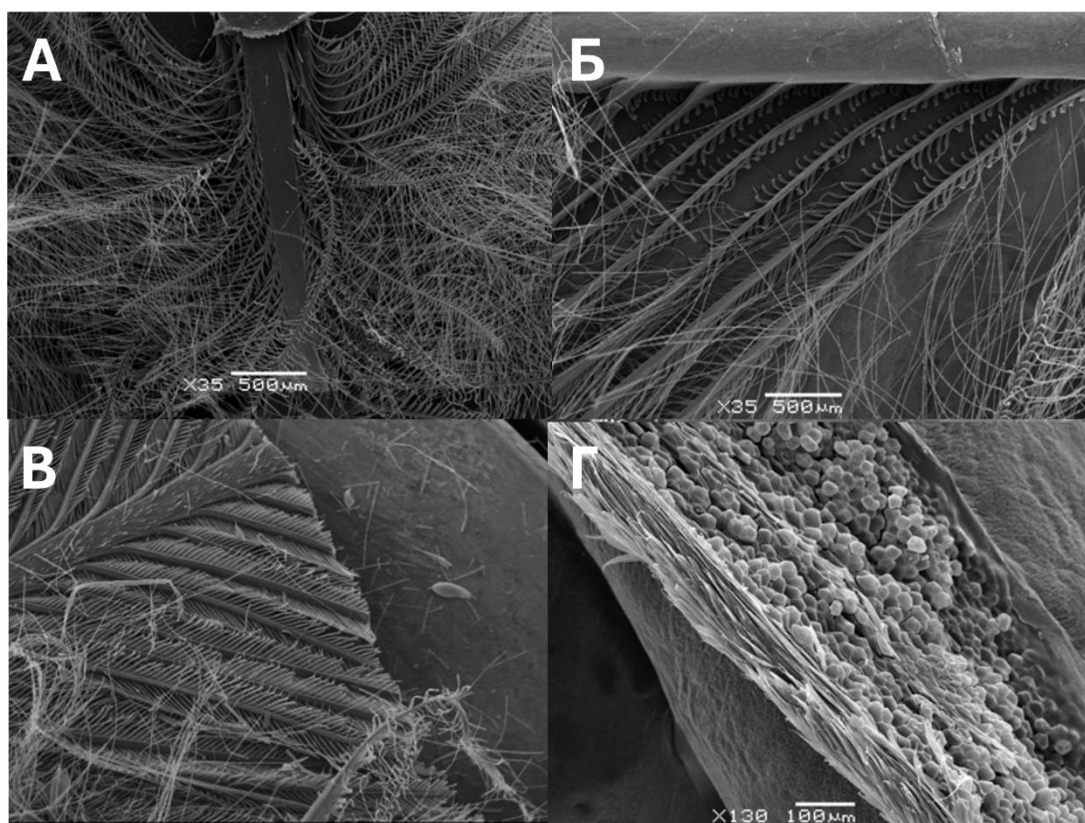


Рис. 28. СЭМ куриного пера после культивирования *A. clavatus* ВКПМ F-1593: А – контроль, Б – 2 сутки, В – 3 сутки, Г – 7 сутки.

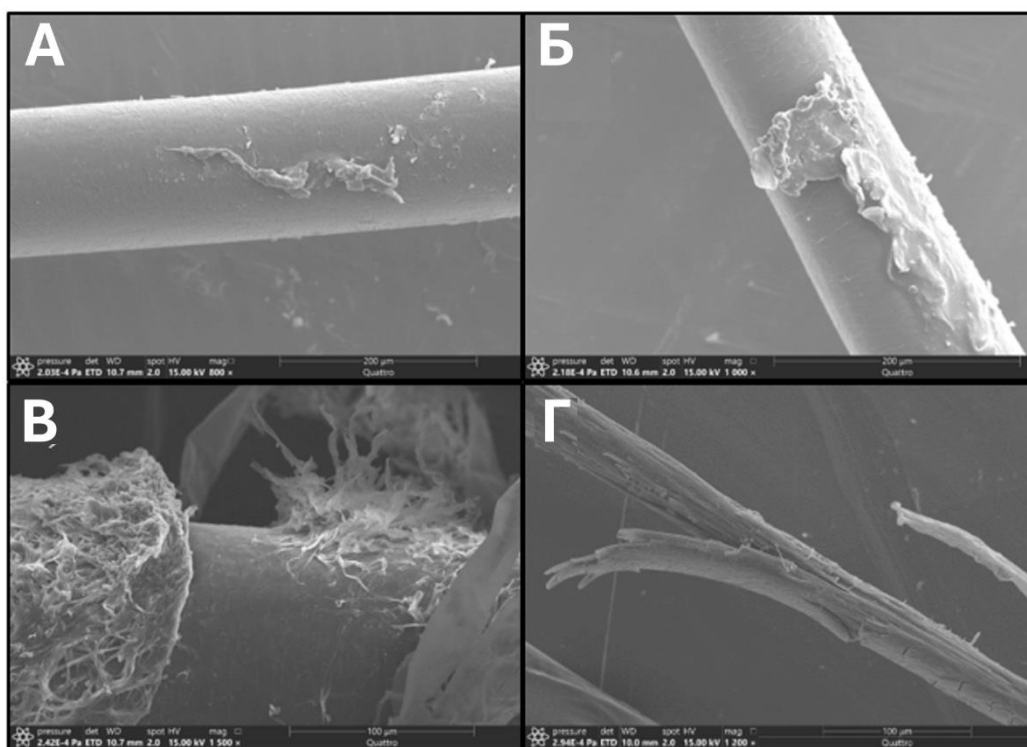


Рис. 29. СЭМ свиной щетины после культивирования *A. clavatus* ВКПМ F-1593: А – 1 сутки, Б – 2 сутки, В – 3 сутки, Г – 4 сутки.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что микромицет *A. clavatus* ВКПМ F-1593 может быть эффективным агентом для биodeградации отходов птицеводства. Однако для разработки технологии и оптимизации этого процесса необходимы дальнейшие исследования.

3.10. Получение и разделение комплексных препаратов внеклеточных белков

A. clavatus ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1

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 ГРМ (гидролизат 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. 30).

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. 31).

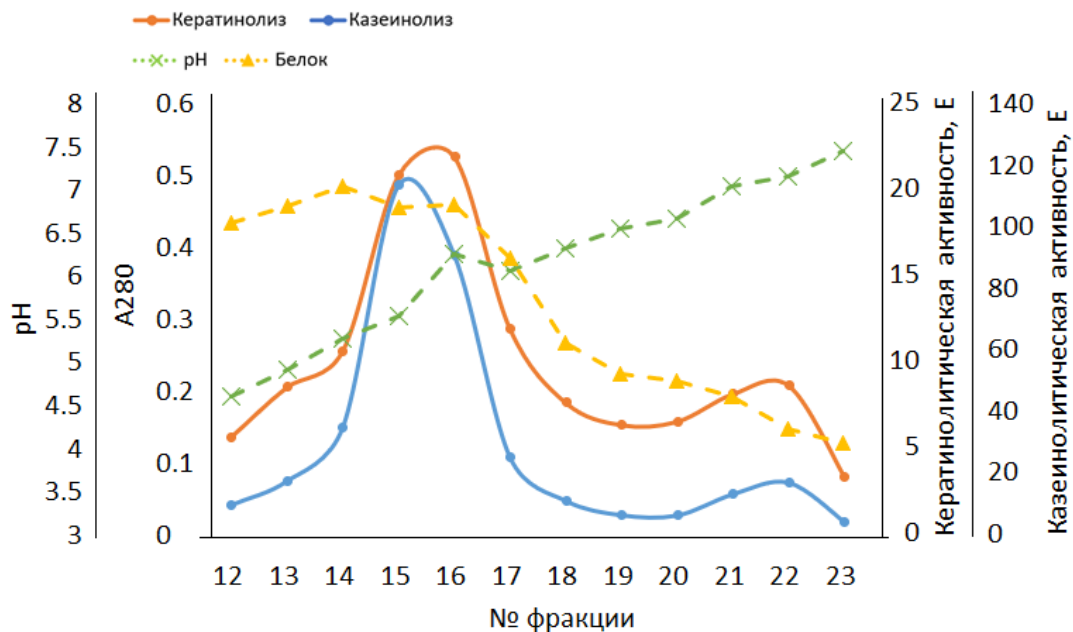


Рис. 30. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков комплексного препарата *T. inflatum* ST1 в интервале рН амфолинов 3.0-10.0.

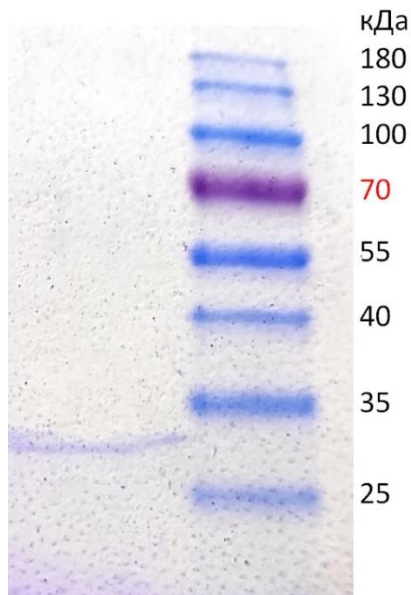


Рис. 31. Электрофореграмма кератиназы *T. inflatum* ST1 (денатурирующий электрофорез в ПААГ).

Комплексный препарат внеклеточных белков *A. clavatus* ВКПМ F-1593 также разделяли методом ИЭФ в градиенте рН амфолинов 3.0-10.0 (рис. 32).

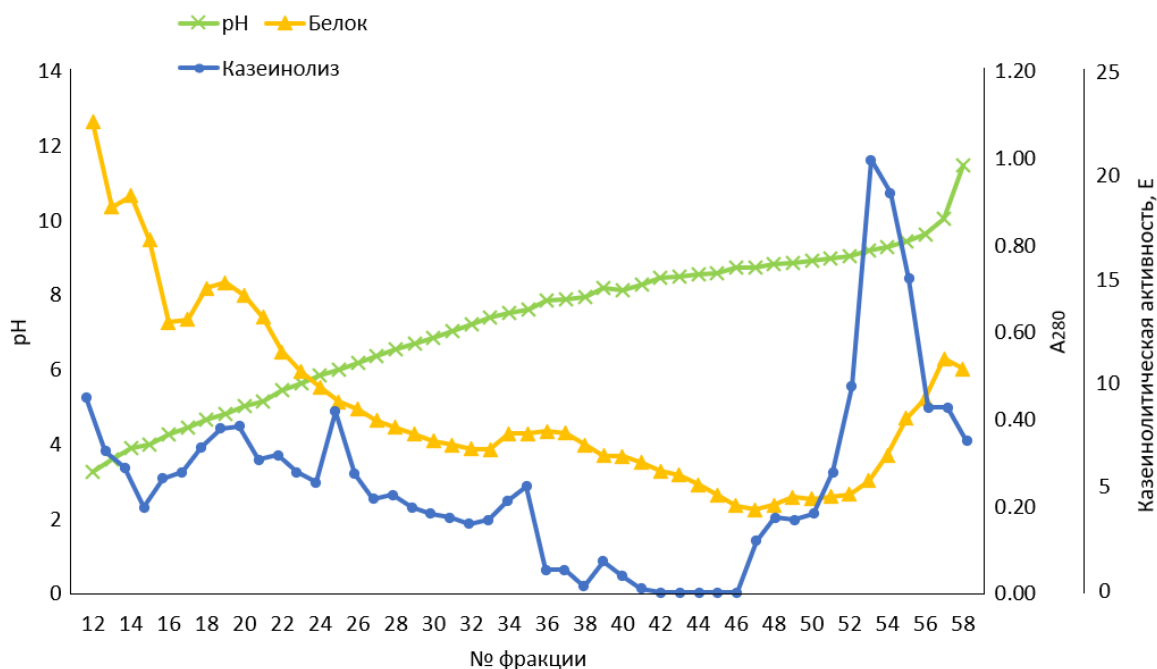


Рис. 32. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков комплексного препарата *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанного при глубинном культивировании продуцента, в интервале рН амфолинов 3.0-10.0.

Во фракциях с наибольшими значениями казеинолитической активности была также измерена кератинолитическая активность (рис. 33).

В результате изучения фракций внеклеточных белков *A. clavatus* ВКПМ F-1593 после ИЭФ в широком диапазоне рН амфолинов было показано наличие кератинолитической активности в пробах с рН 9.0-11.5. Наибольшее значение активности протеаз (кератинолитической – 23.0 Е и казеинолитической – 20.8 Е) соответствовало рН 9.2, что означает возможность секреции микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 кератиназы с рН 9.2. Для подтверждения полученных данных было проведено ИЭФ в узком интервале рН амфолинов 8.0-10.5 (рис. 34).

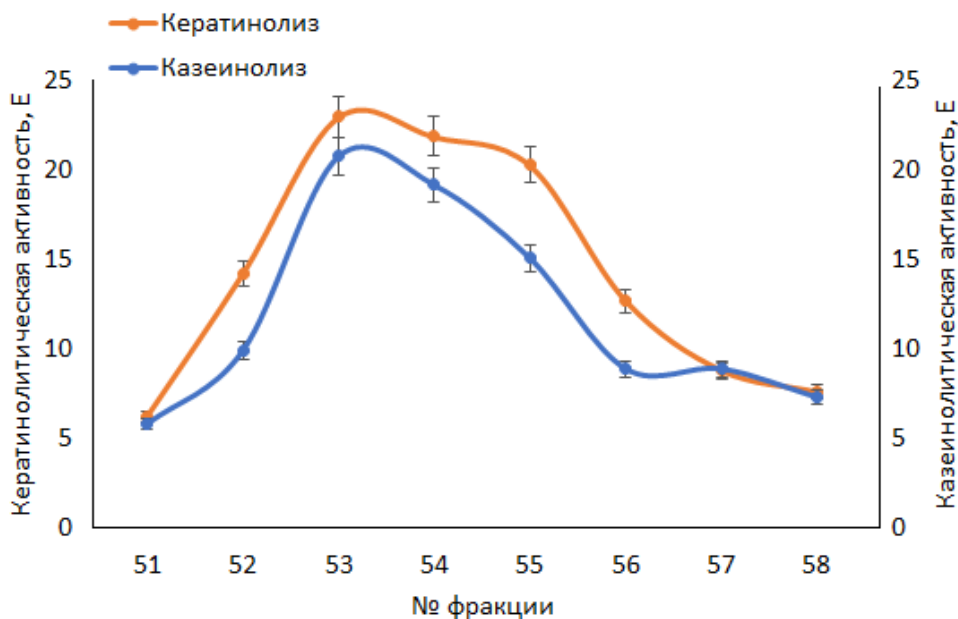


Рис. 33. Кератинолитическая и казеинолитическая активность внеклеточных белков *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанных при глубинном культивировании продуцента, после фракционирования методом ИЭФ.

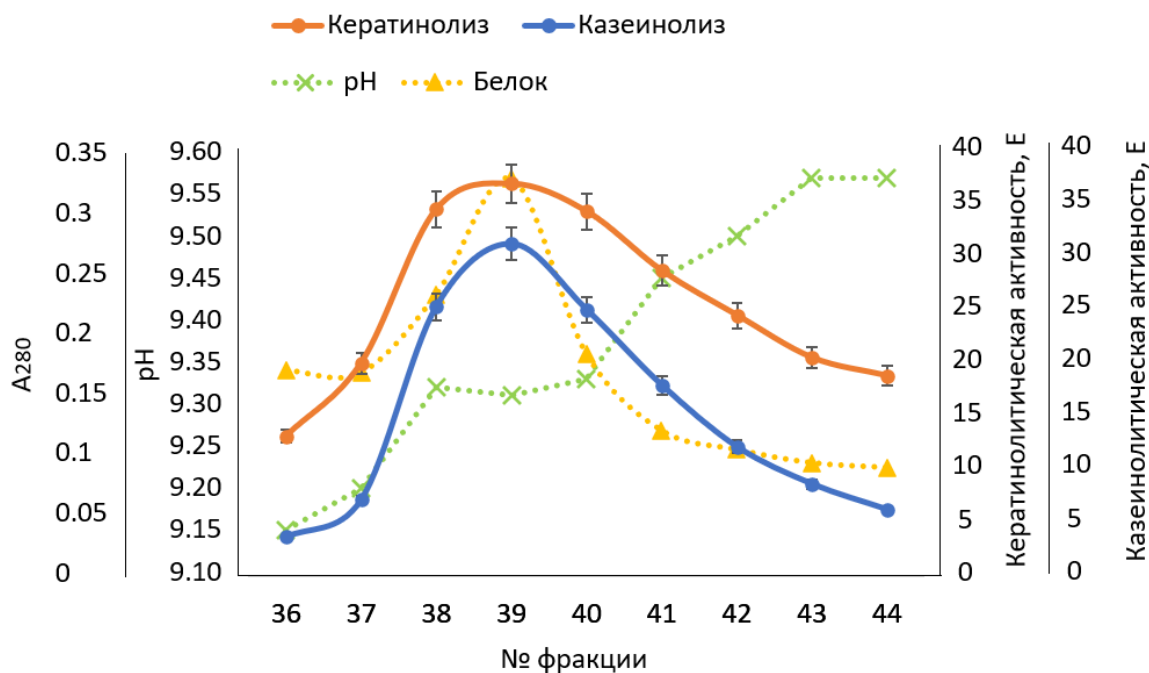


Рис. 34. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков комплексного препарата *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанного при глубинном культивировании продуцента, в интервале рН амфолинов 8.0-10.5.

Полученный профиль ферментативной активности и количества белка указывает на лучшее разделение белков в результате ИЭФ в узком диапазоне рН по сравнению с

предыдущим экспериментом. Пик кератинолитической (36.6 Е) и казеинолитической (30.9 Е) активности соответствовал фракциям с рН 9.3, также являвшихся пробами с максимальным количеством белка, что подтверждает данные о наличии кератиназы с рI 9.2-9.3 в комплексе внеклеточных белков *A. clavatus* ВКПМ F-1593. Более широкий пик кератинолитической активности по сравнению с казеинолитической может говорить о большем сродстве изучаемого фермента к кератину, чем казеину. Однако для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дополнительных экспериментов.

Чистота кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с молекулярной массой около 27 кДа была подтверждена методом денатурирующего электрофореза в ПААГ (рис. 35).

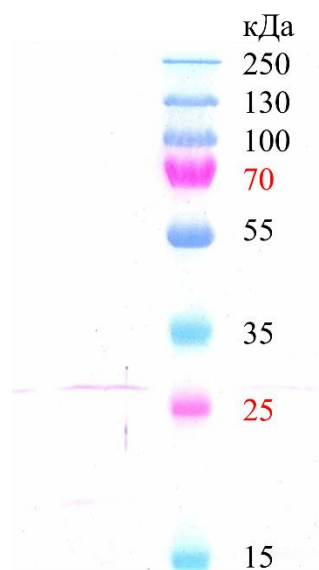


Рис. 35. Электрофореграмма кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанной при глубинном культивировании продуцента (денатурирующий электрофорез в ПААГ).

Комплексный препарат внеклеточных белков *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученный при росте продуцента на куриных перьях в условиях ТФК, разделяли методом ИЭФ в градиенте рН амфолинов 3.0-10.0. Было показано наличие высокой протеолитической активности во фракциях с рН 9.5 (казеинолитической – 99.0 Е; кератинолитической – 60.5 Е), (рис. 36).

Чистота фермента с молекулярной массой около 27 кДа была подтверждена методом денатурирующего электрофореза в ПААГ (рис. 37). Полученные данные позволяют предположить, что кератинолитические протеазы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанные путём глубинного и твердофазного культивирования с кератином пера в качестве субстрата, являются либо одним ферментом, либо изоферментами.

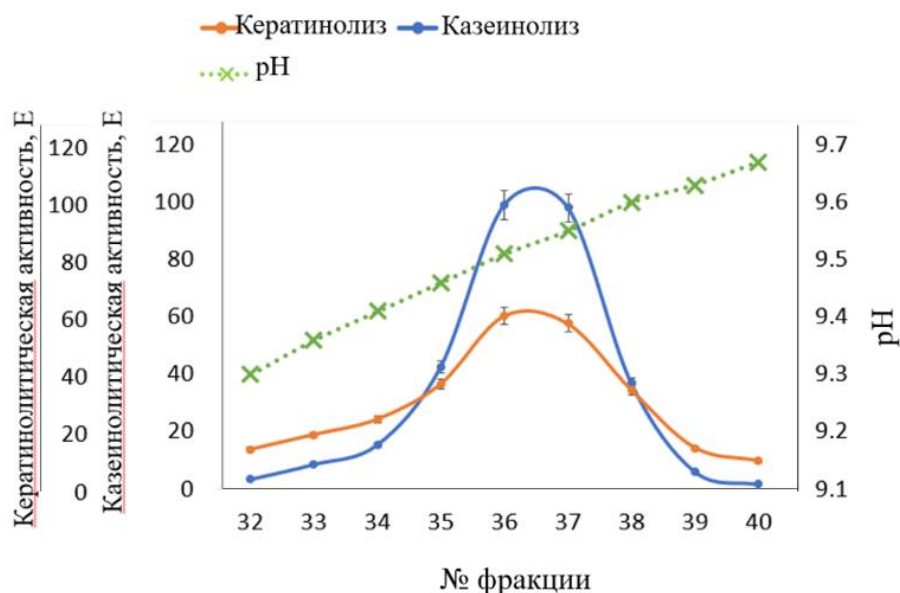


Рис. 36. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков комплексного препарата *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанного путём ТФК продуцента на куриных перьях, в интервале рН амфолинов 3.0-10.0.

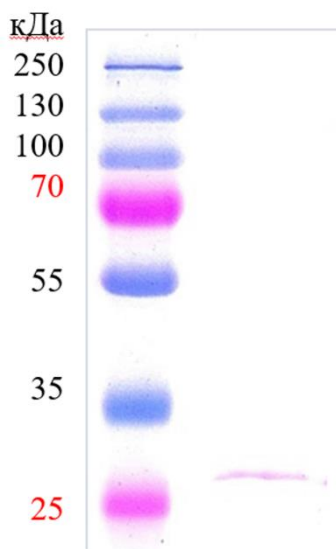


Рис. 37. Электрофореграмма кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанной путём ТФК продуцента на куриных перьях (денатурирующий электрофорез в ПААГ).

Комплексный препарат внеклеточных белков *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученный при росте продуцента на свиной щетине в условиях ТФК, разделяли методом ИЭФ в градиенте рН амфолинов 3.0-10.0. Наибольшая протеолитическая активность приходилась на фракции с рН 9.1 (казеинолитической – 147.8 Е; кератинолитической – 76.0 Е), (рис. 38). Из-за низкой концентрации белка во фракциях получение качественного изображения электрофореграммы оказалось затруднительно.

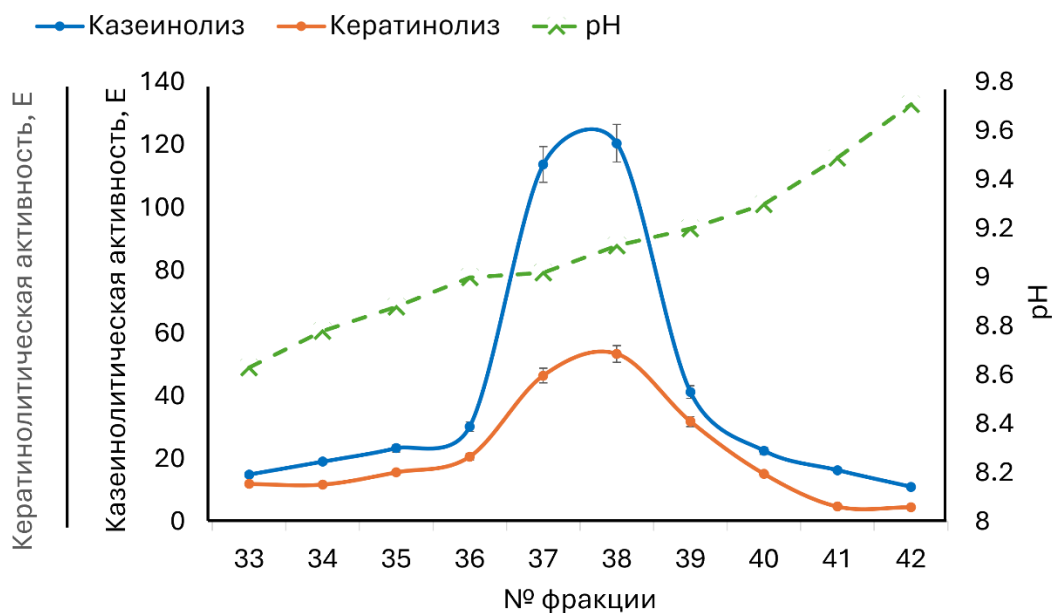


Рис. 38. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков комплексного препарата *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанного путём ТФК продуцента на свиной щетине, в интервале pH амфолинов 3.0-10.0.

3.11. Субстратная специфичность внеклеточных протеаз с кератинолитической активностью микромицетов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1

Изучение субстратной специфичности внеклеточных протеаз микромицетов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1 проводили с использованием хромогенных пептидных субстратов (рис. 39).

По данным литературы 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), что также подтверждается результатами данного исследования на примере двух протеаз микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученных при глубинном и твердофазном культивировании продуцента на курином пере. Эти ферменты проявили наибольшую активность с хромогенным пептидным субстратом, в состав которого входят алифатические незаряженные аминокислотные остатки (Z-Ala-Ala-Leu-pNA), являющимся субстратом субтилизиноподобных протеаз.

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. Эта величина может рассматриваться как критерий истинности кератиназ (Evans et al., 2000). Для протеаз микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученных при глубинном культивировании и ТФК на курином пере и свиной щетине, отношение кератинолитической активности к казеинолитической равно 1.18, 0.61 и 0.51 соответственно, что свидетельствует о высокой специфичности этих кератиназ, тогда как та же величина для протеазы *T. inflatum* ST1 составляет лишь 0.18. В связи с этим было принято решение дальнейшие исследования сфокусировать на кератинолитических ферментах *A. clavatus* ВКПМ F-1593.

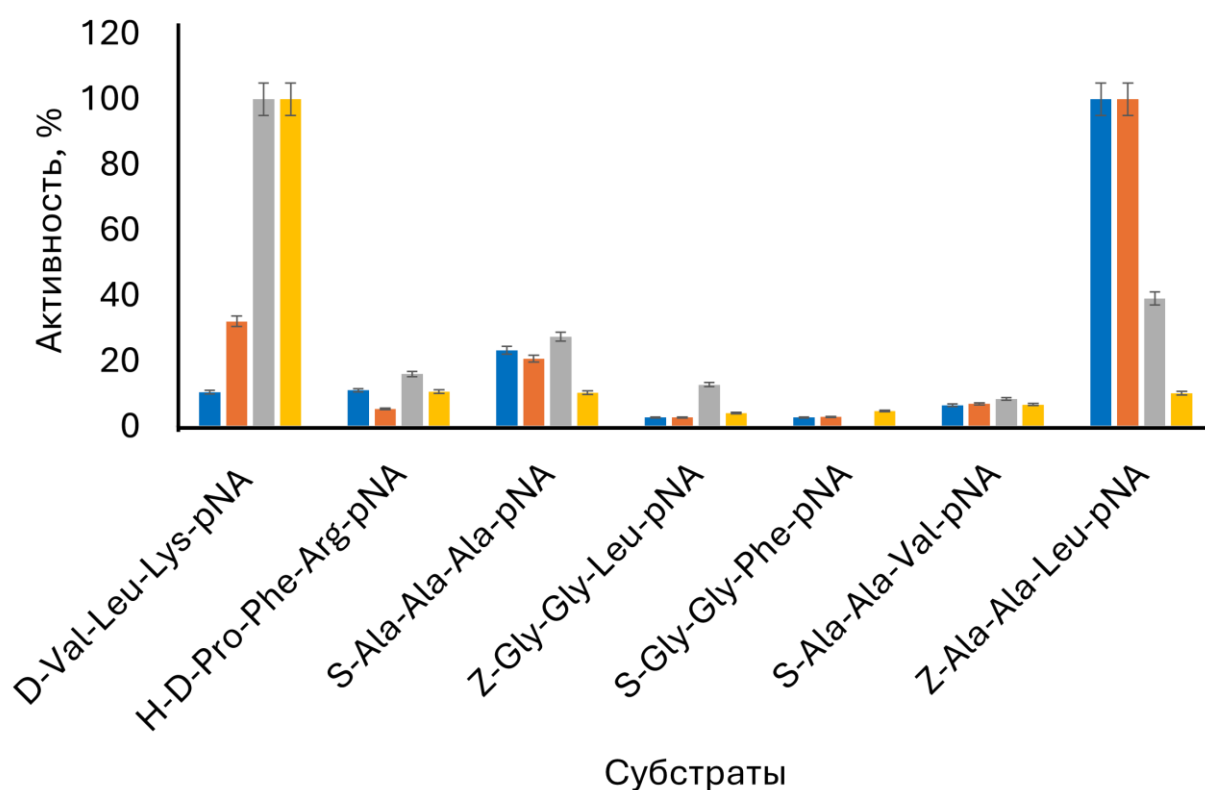


Рис. 39. Субстратная специфичность внеклеточных протеаз с кератинолитической активностью микромицетов *T. inflatum* ST1 (жёлтый) и *A. clavatus* ВКПМ F-1593, синтезированных при глубинном культивировании продуцента (синий), при ТФК на куриных перьях (оранжевый) и ТФК продуцента на свиной щетине (серый).

3.12. Свойства внеклеточных протеаз с кератинолитической активностью

микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593

3.12.1. Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на активность протеаз

микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593

Для изучения свойств трёх протеаз *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученных при глубинном и твердофазном культивировании продуцента, проводили ингибиторный анализ. По данным литературы, кератинолитические ферменты в основном относятся к сериновым и металлопротеазам (Wang et al., 2023), поэтому в эксперименте были использованы ингибиторы металлопротеаз (ЭДТА, п-ХМБ), ингибитор сериновых протеаз (PMSF), а также ингибиторы химотрипсиноподобных (TPCK) и трипсиноподобных (TLCK и соевый ингибитор трипсина) протеаз. Активность ферментов без прединкубации с ингибитором принимали за 100%. Реакции проводили с ХПС. Результаты ингибиторного анализа представлены на рисунке 40.

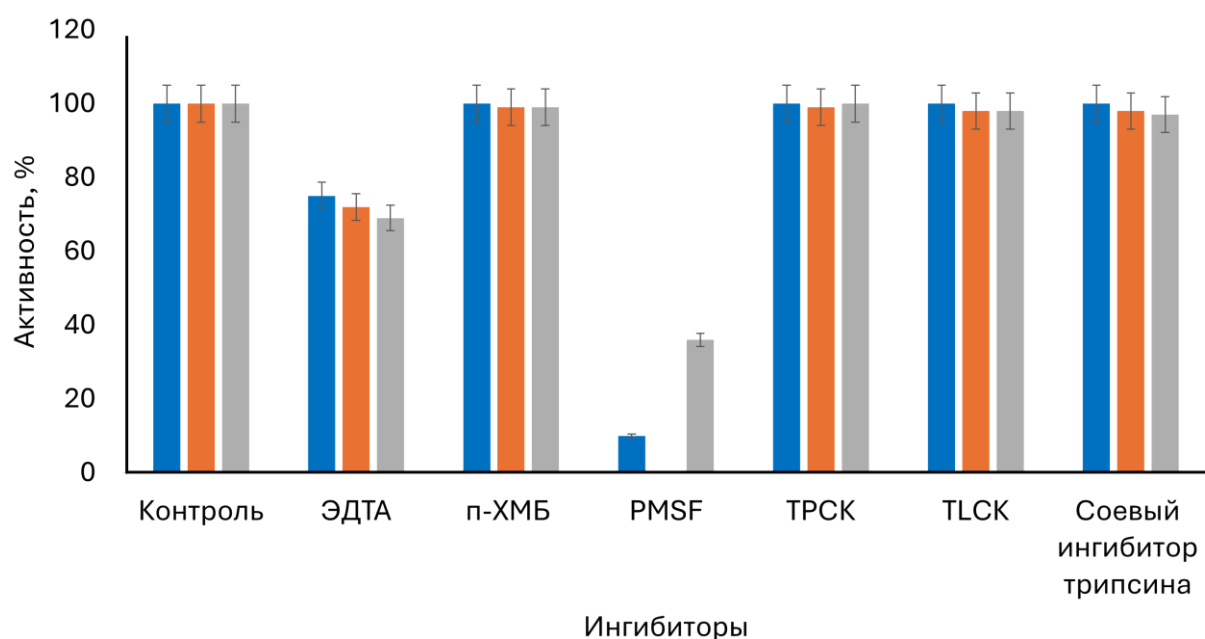


Рис. 40. Ингибиторный анализ протеаз с кератинолитической активностью микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, синтезированных при глубинном культивировании продуцента (синий), при ТФК на куриных перьях (оранжевый) и ТФК продуцента на свиной щетине (серый).

Только два использованных ингибитора оказывали подавляющее действие на протеолитическую активность изучаемых кератиназ: PMSF ингибировао активность ферментов на 60-100%, кроме того, применение ЭДТА привело к снижению активности на 20-30%. Другие ингибиторы значимо не влияли на активность протеаз.

Ингибирование активности изучаемых ферментов PMSF указывает на то, что эти кератиназы скорее всего относятся к классу сериновых протеаз, что согласуется с тем, что ферменты, синтезированные при росте продуцента на куриных перьях, обладают высокой активностью по отношению к хромогенному пептидному субстрату субтилизиноподобных протеаз. Влияние ЭДТА на работу ферментов позволяет предположить, что ионы металлов играют важную роль в стабильности молекул этих протеаз. Однако остаётся не понятна природа различий в субстратной специфичности изучаемых ферментов.

3.12.2. Определение гликозилирования протеаз микромицета

A. clavatus ВКПМ F-1593

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. В качестве положительного контроля использовали инвертазу дрожжей, в качестве отрицательного контроля – бычий сывороточный альбумин. Результаты определения углеводного компонента представлены на рисунке 41.

Кератиназы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, полученные при культивировании продуцента способами глубинного культивирования и ТФК на курином пере и обладающие наибольшей специфичностью к Z-Ala-Ala-Leu-pNA, оказались не гликозилированы, а кератиназа, синтезированная при росте микромицета в условиях твердофазного культивирования на свиной щетине – гликозилирована, что скорее всего влияет на способность фермента расщеплять субстраты с разным соотношением полярных и неполярных аминокислот.

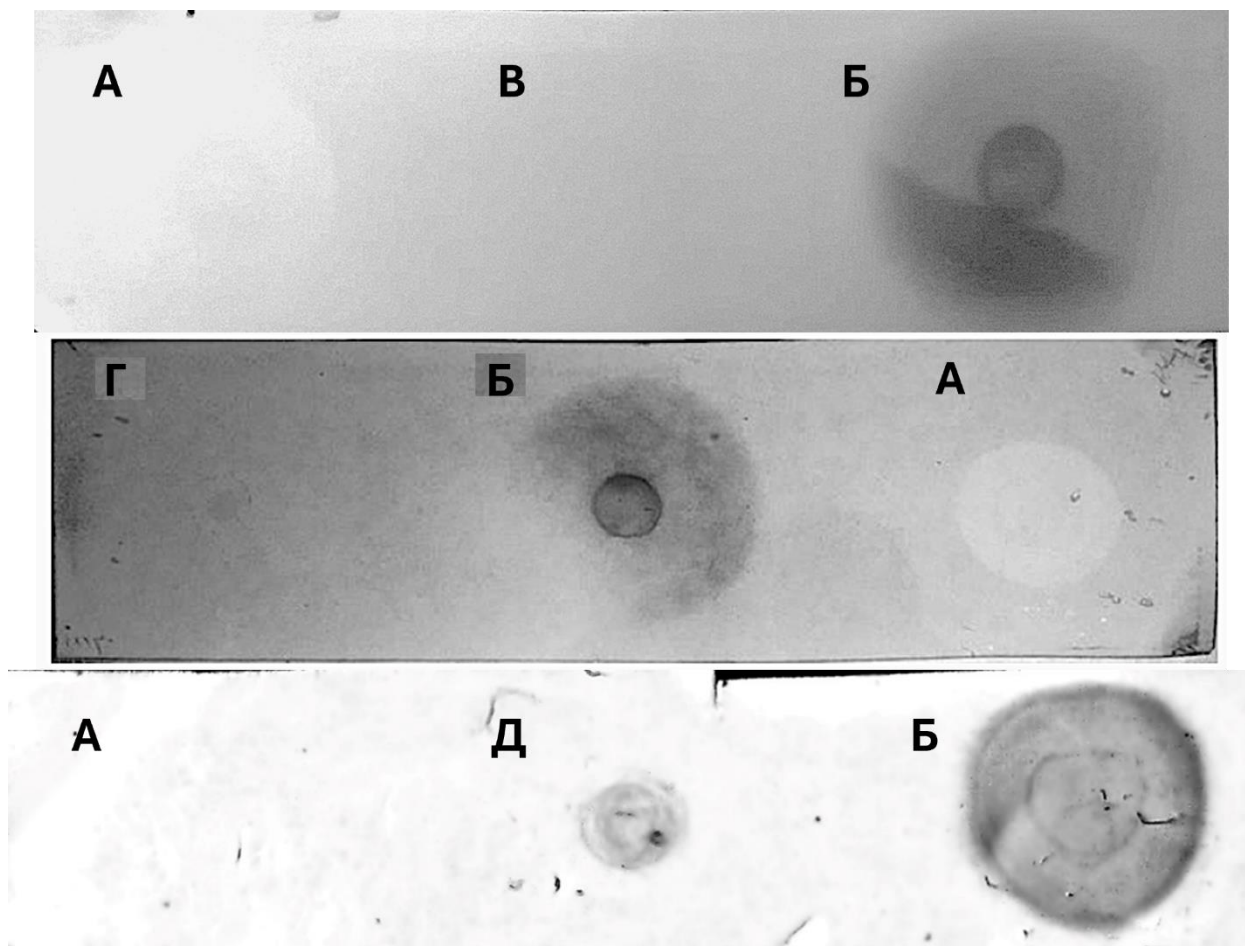


Рис. 41. Определение углеводного компонента в составе протеаз с кератинолитической активностью микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593: А – отрицательный контроль (бычий сывороточный альбумин), Б – положительный контроль (инвертаза дрожжей), В – кератиназа, наработанная при глубинном культивировании, Г – кератиназа, наработанная при ТФК на курином пере, Д – кератиназа, наработанная при ТФК на свиной щетине.

3.12.3. Физико-химические свойства протеаз микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593

Была изучена зависимость протеолитической активности и стабильности изучаемых кератиназ от pH и температуры. Результаты измерения оптимумов активности и стабильности для кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593, синтезированной при глубинном культивировании, представлены на рисунках 42-43.

При определении зависимости ферментативной активности от температуры реакции наибольший уровень активности в отношении Z-Ala-Ala-Leu-pNA соответствовал 37°C, тогда как пик кератинолитической активности регистрировался при 50°C. В изученном диапазоне температур не менее 50% активности сохранялось в интервале 25-55°C как при кератинолизе, так и при гидролизе ХПС. Фермент сохранял 50% и более своей стабильности

при 25-40°C и практически полностью терял стабильность при 50°C. Высокая кератинолитическая активность протеазы, но отсутствие её стабильности при 50°C указывает на весомый вклад свойств самого субстрата в процесс гидролиза. При повышении температуры происходит денатурация третичной структуры молекулы кератина, благодаря чему видимо полипептидная цепь становится более доступной для активного центра фермента. Из-за этого за малое количество времени до полной потери активности протеаза успевает гидролизовать множество пептидных связей в молекуле кератина.

Максимальная протеолитическая активность изучаемой кератиназы соответствовала рН 8.0 как для реакций с кератином, так и с ХПС. Протеолитическая активность оставалась выше 60% в диапазоне рН от 7 до 10. А в интервале рН 4-10 стабильность фермента сохранялась выше 70% в процессе кератинолиза, тогда как при гидролизе Z-Ala-Ala-Leu-pNA фермент был менее стабилен и при инкубации фермента при рН 10 остаточная активность составляла лишь 45%, а при рН 4 активность падала до 0.

Различия в профилях зависимости активности кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 по отношению к разным субстратам от температуры и рН скорее всего связаны с трудной доступностью для фермента аминокислотных сайтов распознавания в молекулах кератина, филаменты которого могут разворачиваться при повышении температуры и становиться более доступными для гидролиза.

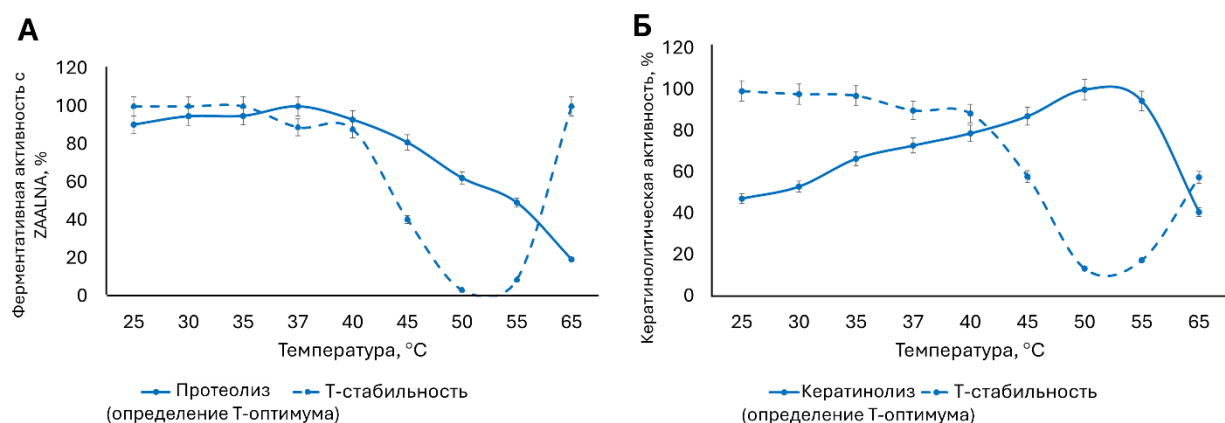


Рис. 42. Зависимость активности кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанной при глубинном культивировании, от температуры: А – протеолитическая активность с Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Б – кератинолиз.

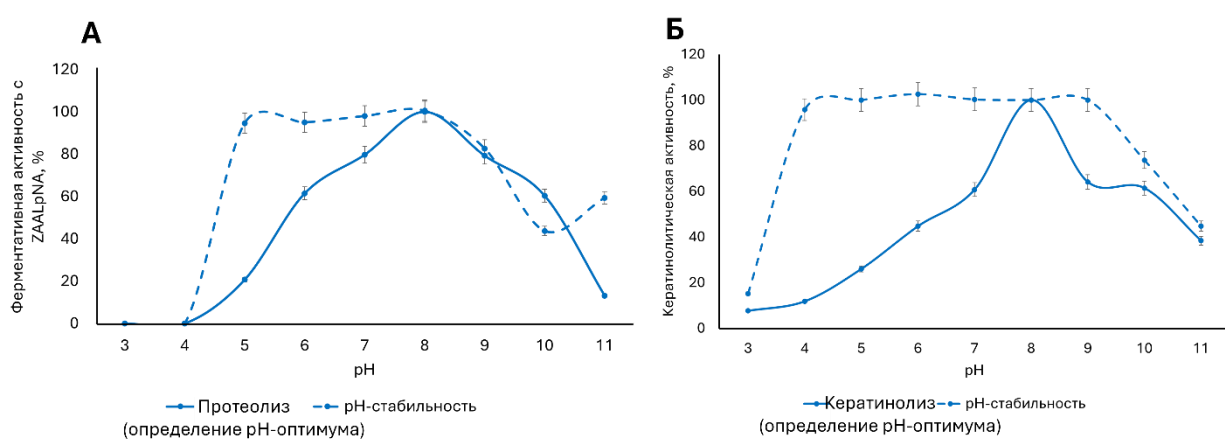


Рис. 43. Зависимость активности кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593, наработанной при глубинном культивировании, от pH: А – протеолитическая активность с Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Б – кератинолиз.

Физико-химические свойства кератиназ микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, а также кератиназ других представителей рода *Aspergillus* представлены в таблице 12.

Сравнение физико-химических свойств кератиназ *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с другими известными кератиназами микромицетов рода *Aspergillus*

Продуцент	Оптimum pH кератинолиза (стабильность)	Температурный optimum кератинолиза (стабильность), °C	Источник
<i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593 (глубинное культивирование)	8 (4-11)	50 (25-40)	Результаты данной работы
<i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593 (ТФК на пере)	8 (5-11)	50 (25-55)	Результаты данной работы
<i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593 (ТФК на щетине)	8 (4-11)	50 (25-45)	Результаты данной работы
<i>A. flavus</i>	8 (7-10)	45 (30-70)	Kim, 2007
<i>A. fumigatus</i>	6	50	Paul et al., 2014
<i>A. oryzae</i>	8	50	Mazotto et al., 2013
<i>A. parasiticus</i>	7	50	Anitha and Palanivelu, 2013
<i>A. stelliformis</i>	8	50	Alwakeel et al., 2021
<i>A. sulphureus</i>	10 (6.5-9)	35 (25-60)	Sousa et al., 2015
<i>A. sydowii</i>	8	50	Alwakeel et al., 2021
<i>A. tamarii</i>	8 (5-11)	40 (10-40)	da Silva et al., 2016

Как видно из данных таблицы, физико-химические свойства кератиназ *A. clavatus* ВКПМ F-1593 близки к свойствам ранее изученных кератинолитических ферментов микромицетов рода *Aspergillus*. Эти протеазы по большей части обладают optimumом гидролиза кератина на уровне 50°C и pH 8, а кератинолитические ферменты *A. clavatus* ВКПМ F-1593 также показали способность сохранять стабильность в широких интервалах pH и температуры. Это в совокупности с высокой целевой активностью указывает на перспективность кератиназ изучаемого продуцента 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 – важные характеристики для возможной разработки отечественных препаратов для биодegradации.

Полученные результаты расширяют область знаний о кератинолитических микромицетах и их ферментах. Не только впервые показана способность микромицета *A. clavatus* секретировать кератиназы, но и проведены пионерные работы в изучение кератинолитической активности представителей рода *Tolyposcladium*. Различия в активности, субстратной специфичности и строении ферментов изучаемых 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. Новые знания о свойствах как самого продуцента, микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593, так и его кератиназах являются важной основой не только для углубления понимания физиологии кератинолитических микромицетов, но также для дальнейших исследований, направленных на разработку биопрепаратов и технологий применения продуцентов кератиназ и их ферментов.

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 микромицета *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, наработанные при глубинном культивировании продуцента, а также ТФК на курином пере и свиной щетине, стабильны в широком диапазоне температуры и pH; кератиназы, секретируемые продуцентом при росте на пере обладают высокой специфичностью к кератину и ХПС Z-Ala-Ala-Leu-pNA, а кератинолитическая протеаза, синтезируемая микромицетом 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-кератинолитах, 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*, *Tolyposcladium*, *Trichoderma* и *Ulocladium*.

Видовое и родовое разнообразие 10 культур микромицетов (*Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* А6, *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 рН (25-45°C и рН 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биджиева С.Х., Дербикова К.С., Кубланов И.В. Бонч-Осмоловская Е.А. Способность гипертермофильных Crenarchaeota к разложению труднодоступных белков (α - и β -кератинов) // Микробиология. 2014. Т. 83. № 6. С. 743-743. doi: 10.7868/S0026365614060032.
2. Кубланов И.В., Цирульников К.Б., Калиберда Е.Н., Румш Л.Д., Эртле Т., Бонч-Осмоловская Е.А. Кератиназа из анаэробной термофильной бактерии *Thermoanaerobacter sp.* штамм 1004-09, выделенной из горячего источника Байкальской рифтовой зоны // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 79-88.
3. Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н. С. Фибринолитическая и коллагенолитическая активность внеклеточных протеиназ штаммов микромицетов *Aspergillus ochraceus* L-1 и *Aspergillus ustus* 1 // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2016. № 1. С. 71-75. doi:10.1134/S0026261717040105.
4. Пискаева А. И. Биотехнологические аспекты утилизации отходов птицеперерабатывающих предприятий // Уникальные исследования XXI века. 2016. № 10. С. 5-25.
5. Abd El-Aziz N.M., Khalil B.E., El-Gamal N.N. Structure prediction, docking studies and molecular cloning of novel *Pichia kudriavzevii* YK46 metalloprotease (MetPr) for improvement of feather waste biodegradation // Sci. Rep. 2023. V. 13. № 1. P. 19989. doi:10.1038/s41598-023-47179-5.
6. Alibardi L., Dalla Valle L., Toffolo V., Toni M. Scale keratin in lizard epidermis reveals amino acid regions homologous with avian and mammalian epidermal proteins // The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists. 2006. V. 288. № 7. P.734–752. doi:10.1002/ar.a.20342.
7. Alibardi L. Cornification in reptilian epidermis occurs through the deposition of keratin-associated beta-proteins (betakeratins) onto a scaffold of intermediate filament keratins // J. Morphol. 2013. V. 274. P. 175–193. doi:10.1002/jmor.20086.
8. Alibardi L. Sauropsids Cornification is Based on Corneous Beta-Proteins, a Special Type of Keratin-Associated Corneous Proteins of the Epidermis // J. Exp. Zoöl. Part B Mol. Dev. Evol. 2016. V. 326. P. 338–351. doi:10.1002/jez.b.22689.
9. Aluigi A., Ballestri M., Guerrini A., Sotgiu G., Ferroni C., Corticelli F., Gariboldi M.B., Monti E., Varchi G. Organic solventfree preparation of keratin nanoparticles as doxorubicin carriers

- for antitumour activity // Mater. Sci. Eng. C. 2018. V. 90. P. 476–484. doi:10.1016/j.msec.2018.04.088.
10. Alwakeel S.S., Ameen F., Al Gwaiz H., Sonbol H., Alghamdi S., Moharram A.M., Al-Bedak O. A. Keratinases Produced by *Aspergillus stelliformis*, *Aspergillus sydowii*, and *Fusarium brachygibbosum* Isolated from Human Hair: Yield and Activity // J. Fungi (Basel). 2021. V. 7. № 6. P. 471. doi:10.3390/jof7060471.
 11. Anbu P., Gopinath S. C., Hilda A., Annadurai G. Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity // Enzyme and Microbial Technology. 2005. V. 36. № 5-6. P. 639-647. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.07.019.
 12. Anbu P., Gopinath S.C., Hilda A., Lakshmipriya T., Annadurai G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* // Bioresource Technology. 2007. V. 98. № 6. P. 1298-1303. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.047.
 13. Anitha T. S., Palanivelu P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus* // Protein expression and purification. 2013. V. 88. № 2. P. 214-220. doi:10.1016/j.pep.2013.01.007.
 14. Apel P.J., Garrett J.P., Sierpinski P., Ma J., Atala A., Smith T.L., Koman L.A., Van Dyke M.E. Peripheral Nerve Regeneration Using a Keratin-Based Scaffold: Long-Term Functional and Histological Outcomes in a Mouse Model // J. Hand Surg. 2008. V. 33. P. 1541–1547. doi:10.1016/j.jhsa.2008.05.034.
 15. Arslan Y.E., Arslan T.S., Derkus B., Emregul E., Emregul K.C. Fabrication of human hair keratin/jellyfish collagen/eggshell derived hydroxyapatite osteoinductive biocomposite scaffolds for bone tissue engineering: From waste to regenerative medicine products // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2017. V. 154. P. 160–170. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.034.
 16. Astbury W.T., Street A. X-ray studies of the structure of hair, wool, and related fibres. I. General. // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character. 1932. V. 230. № 681–693. P. 75–101.
 17. Astbury W.T., Woods H.J. X ray studies of the structure of hair, wool, and related fibres. II. The molecular structure and elastic properties of hair keratin // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character. 1934. V. 114. № 788. P. 314–316.
 18. Azarniya A., Tamjid E., Eslahi N., Simchi A. Modification of bacterial cellulose/keratin nanofibrous mats by a tragacanth gum conjugated hydrogel for wound healing // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 134. P. 280–289. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.023.

19. Bach E., Sant'Anna V., Daroit D., Correa A., Segalin J., Brandelli A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3 // *Process biochemistry*. 2012. V. 47. № 12. P. 2455-2462. doi:10.1016/j.procbio.2012.10.007.
20. Bachmann T., Emmerlich J., Baumgartner W., Schneider J.M., Wagner H. Flexural stiffness of feather shafts: geometry rules over material properties // *Journal of Experimental Biology*. 2012. V. 215. № 3. P. 405-415. doi:10.1242/jeb.059451.
21. Bagewadi Z. K., Mulla S. I., Ninnekar H. Z. Response surface methodology based optimization of keratinase production from *Trichoderma harzianum* isolate HZN12 using chicken feather waste and its application in dehairing of hide // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2018. V. 6. № 4. P. 4828-4839. doi:10.1016/j.jece.2018.07.007.
22. Bajestani M.I., Kader S., Monavarian M., Mousavi S.M., Jabbari E., Jafari A. Material properties and cell compatibility of poly(γ -glutamic acid)-keratin hydrogels // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 142. P. 790–802. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.020.
23. Baker H., Passipieri J., Siriwardane M., Ellenburg M.D., Vadhavkar M., Bergman C.R., Saul J.M., Tomblyn S., Burnett L., Christ G.J. Cell and Growth Factor-Loaded Keratin Hydrogels for Treatment of Volumetric Muscle Loss in a Mouse Model // *Tissue Eng. Part A*. 2017. V. 23. P. 572–584. doi:10.1089/ten.tea.2016.0457.
24. Bálint B., Bagi Z., Tóth A., Rákhely G., Perei K., Kovács K.L. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 69. P. 404–410. doi:10.1007/s00253-005-1993-3.
25. Barati D., Kader S., Shariati S.R.P., Moeinzadeh S., Sawyer R.H., Jabbari E. Synthesis and Characterization of Photo-CrossLinkable Keratin Hydrogels for Stem Cell Encapsulation // *Biomacromolecules*. 2017. V. 18. P. 398–412. doi:10.1021/acs.biomac.6b01493.
26. Baus R.A., Lechner C., Steinbring C., Bernkop-Schnürch A. Strategies for improved hair binding: Keratin fractions and the impact of cationic substructures // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 160. P. 201–211. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.131.
27. Benkiar A., Nadia Z., Badis A., Rebzani F., Soraya B., Rekik H., Naili B., Ferradji F., Bejar S., Jaouadi B. Biochemical and molecular characterization of a thermo-and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process // *Int. J. Biodeterioration & Biodegradation*. 2013. V. 83. P. 129-138. doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.014.
28. Bensch K., Braun U., Groenewald J.Z., Crous P.W. The genus *Cladosporium* // *Studies in Mycology*. 2012. V. 72. P. 1-401.

29. Bernal C., Cairo J., Coello N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea* // *Enzyme and microbial technology*. 2006. V. 38. № 1-2. P. 49-54. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.02.021.
30. Bhari R., Kaur M., Singh R.S. Thermostable and halotolerant keratinase from *Bacillus aerius* NSMk2 with remarkable dehairing and laundry applications // *Journal of basic microbiology*. 2019. V. 59. № 6. P. 555-568. doi:10.1002/jobm.201900001.
31. Bloise N., Patrucco A., Bruni G., Montagna G., Caringella R., Fassina L., Tonin C., Visai L. In Vitro Production of Calcified Bone Matrix onto Wool Keratin Scaffolds via Osteogenic Factors and Electromagnetic Stimulus // *Materials*. 2020. V. 13. P. 3052. doi:10.3390/ma13143052.
32. Bockle B., Muller R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 790.
33. Bokveld A., Nnolim N.E., Digban T.O., Okoh A.I., Nwodo U.U. *Chryseobacterium aquifrigidense* keratinase liberated essential and nonessential amino acids from chicken feather degradation // *Environ. Technol.* 2023. V. 44. № 3. P. 293-303. doi:10.1080/09593330.2021.1969597.
34. Brandelli A., Daroit D.J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications // *Applied microbiology and biotechnology*. 2010. V. 85. № 6. P. 1735-1750. doi:10.1007/s00253-009-2398-5.
35. Brenner M., Weichold O. Autogenous Cross-Linking of Recycled Keratin from Poultry-Feather Waste to Hydrogels for Plant Growth Media // *Polymers*. 2021. V. 13. P. 3581. doi:10.3390/polym13203581.
36. Cal F., Arslan T.S., Derkus B., Kiran F., Cengiz U., Arslan Y.E. Synthesis of Silica-Based Boron-Incorporated Collagen/Human Hair Keratin Hybrid Cryogels with the Potential Bone Formation Capability // *ACS Appl. Bio Mater.* 2021. V. 4. P. 7266–7279. doi:10.1021/acsabm.1c00805.
37. Callegaro K., Welter N., Daroit D.J. Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates // *Process Biochem.* 2018. V. 75. P. 1–9. doi:10.1016/j.procbio.2018.09.002.
38. Callegaro K., Brandelli A., Daroit D.J. Beyond plucking: Feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates // *Waste Manag.* 2019. V. 95. P. 399–415. doi:10.1016/j.wasman.2019.06.040.
39. Calvaresi M., Eckhart L., Alibardi L. The molecular organization of the beta-sheet region in Corneous beta-proteins (betakeratins) of sauropsids explains its stability and polymerization into filaments // *J. Struct. Biol.* 2016. V. 194. P. 282–291. doi:10.1016/j.jsb.2016.03.004.

40. Cao L., Tan H., Liu Y., Xue X., Zhou S. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather // Letters in applied microbiology. 2008. V. 46. № 3. P. 389-394. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02327.x.
41. Cao Y., Yao Y., Li Y., Yang X., Cao Z., Yang G. Tunable keratin hydrogel based on disulfide shuffling strategy for drug delivery and tissue engineering // J. Colloid Interface Sci. 2019. V. 544. P. 121–129. doi:10.1016/j.jcis.2019.02.049.
42. Carvalho C.R., Costa J.B., Costa L., Silva-Correia J., Moay Z.K., Ng K.W., Reis R.L., Oliveira J.M. Enhanced performance of chitosan/keratin membranes with potential application in peripheral nerve repair // Biomater. Sci. 2019. V. 7. P. 5451–5466. doi:10.1039/c9bm01098j.
43. Cavello I., Hours R., Cavalitto S. Bioprocessing of “hair waste” by *Paecilomyces lilacinus* as a source of a bleach-stable, alkaline, and thermostable keratinase with potential application as a laundry detergent additive: characterization and wash performance analysis // Biotechnology research international. 2012. V. 2012. P. 1-12. doi:10.1155/2012/369308.
44. Cavello I., Hours R., Rojas N., Cavalitto S. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS #876 // Process Biochemistry. 2013. V. 48. № 5-6. P. 972-978. doi:10.1016/j.procbio.2013.03.012.
45. Cavello I., Bezus B., Cavalitto S. The keratinolytic bacteria *Bacillus cytotoxicus* as a source of novel proteases and feather protein hydrolysates with antioxidant activities // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2021. V. 19. P. 107. doi:10.1186/s43141-021-00207-1.
46. Cedrola S.M., Melo A.C.N., Mazotto A.M., Lins U., Zingali R.B., Rosado A.S., Peixoto R.S., Vermelho A.B. Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste // World J. Microb. Biot. 2012. V. 28. P. 1259–1269. doi:10.1007/s11274-011-0930-0.
47. Chen H., Gao S., Li Y., Xu H.J., Li W., Wang J., Zhang Y. Valorization of Livestock Keratin Waste: Application in Agricultural Fields // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2022. V. 19. № 11. P. 6681. doi:10.3390/ijerph19116681
48. Chen M., Ren X., Dong L., Li X., Cheng H. Preparation of dynamic covalently crosslinking keratin hydrogels based on thiol/disulfide bonds exchange strategy // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 182. P. 1259–1267. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.057.
49. Chen Y., Li Y., Yang X., Cao Z., Nie H., Bian Y., Yang G. Glucose-triggered in situ forming keratin hydrogel for the treatment of diabetic wounds // Acta Biomater. 2021. V. 125. P. 208–218. doi:10.1016/j.actbio.2021.02.035.
50. Cheng S.W., Hu H.M., Shen S.W., Takagi H., Asano M., Tsai Y.C. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1 // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 1995. V. 59. № 12. P. 2239-2243.

51. Cheng Z., Chen X., Zhai D., Gao F., Guo T., Li W., Hao S., Ji J., Wang B. Development of keratin nanoparticles for controlled gastric mucoadhesion and drug release // *J. Nanobiotechnol.* 2018. V. 16. P. 24. doi:10.1186/s12951-018-0353-2.
52. Cheng Z., Qing R., Hao S., Ding Y., Yin H., Zha G., Chen X., Ji J., Wang B. Fabrication of ulcer-adhesive oral keratin hydrogel for gastric ulcer healing in a rat // *Regen. Biomater.* 2021. V. 8. P. rbab008. doi:10.1093/rb/rbab008.
53. Cohen D.J., Hyzy S.L., Haque S., Olson L.C., Boyan B.D., Saul J.M., Schwartz Z. Effects of Tunable Keratin Hydrogel Erosion on Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 Release, Bioactivity, and Bone Induction // *Tissue Eng. Part A.* 2018. V. 24. P. 1616–1630. doi:10.1089/ten.tea.2017.0471.
54. Coppola D., Oliviero M., Vitale G.A., Lauritano C., D’Ambra I., Iannace S., De Pascale D. Marine Collagen from Alternative and Sustainable Sources: Extraction, Processing and Applications // *Mar. Drugs.* 2020. V. 18. P. 214. doi:10.3390/md18040214.
55. Crous P.W., Lombard L., Sandoval-Denis M., Seifert K.A., Schroers H.J., Chaverri P., Thines M. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell // *Studies in Mycology.* 2021. V. 98. P. 100116. doi:10.1016/j.simyco.2021.100116.
56. da Silva O.S., de Oliveira R.L., Souza-Motta C.M., Porto A.L.F., Porto T.S. Novel protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation // *Advances in Enzyme Research.* 2016. V. 4. № 04. P. 125. doi:10.4236/aer.2016.44012.
57. Das A., Das A., Basu A., Datta P., Gupta M., Mukherjee A. Newer guar gum ester/chicken feather keratin interact films for tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 180. P. 339–354. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.034.
58. Deng X., Gould M., Ali, M.A Fabrication and characterisation of melt-extruded chitosan/keratin/PCL/PEG drug-eluting sutures designed for wound healing // *Mater. Sci. Eng. C.* 2021. V. 120. P. 111696. doi:10.1016/j.msec.2020.111696.
59. Denyer J., Marsh C., Kirsner R.S. Keratin gel in the management of *Epidermolysis bullosa* // *J. Wound Care.* 2015. V. 24. P. 446–450. doi:10.12968/jowc.2015.24.10.446.
60. de Oliveira C.C., de Souza A.K.S., de Castro R.J.S. Bioconversion of chicken feather meal by *Aspergillus niger*: simultaneous enzymes production using a cost-effective feedstock under solid state fermentation // *Indian journal of microbiology.* 2019. V. 59. № 2. P. 209-216. doi:10.1007/s12088-019-00792-3.
61. De Oliveira Martinez J.P., Cai G., Nachtschatt M., Navone L., Zhang Z., Robins K., Speight R. Challenges and opportunities in identifying and characterising keratinases for

- value-added peptide production // *Catalysts*. 2020. V. 10. № 2. P. 184. doi:10.3390/catal10020184.
62. de Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015. V. 46. № 2. P. 337-346. doi:10.1590/S1517-838246220140359.
63. Dong Q.Y., Wang Y., Wang Z.Q., Liu Y.F., Yu H. Phylogeny and Systematics of the Genus *Tolypocladium* (*Ophiocordycipitaceae*, *Hypocreales*) // *Journal of Fungi*. 2022. V. 8. № 11. P. 1158. doi:10.3390/jof8111158.
64. Dou Y., Zhang L., Zhang B., He M., Shi W., Yang S., Cui Y., Yin G. Preparation and Characterization of Edible Dialdehyde Carboxymethyl Cellulose Crosslinked Feather Keratin Films for Food Packaging // *Polymers*. 2020. V. 12. P. 158. doi:10.3390/polym12010158.
65. Duffeck C.E., de Menezes C.L.A., Boscolo M., da Silva R., Gomes E., da Silva R.R. Keratinases from *Corioloropsis byrsina* as an alternative for feather degradation: applications for cloth cleaning based on commercial detergent compatibility and for the production of collagen hydrolysate // *Biotechnol. Lett.* 2020. V. 42. № 11. P. 2403-2412. doi:10.1007/s10529-020-02963-5.
66. Duncan W.J., Greer P.F.C., Lee M.-H., Loch C., Gay J.H.A. Wool-derived keratin hydrogel enhances implant osseointegration in cancellous bone // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2018. V. 106. P. 2447–2454. doi:10.1002/jbm.b.34047.
67. Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D., Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber // *European journal of biochemistry*. 1974. V. 47. P. 91-97.
68. El-Gendy M.M.A. Keratinase production by endophytic *Penicillium spp.* Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010. V. 162. № 3. P. 780-794. doi:10.1007/s12010-009-8802-x.
69. Esparza Y., Ullah A., Wu J. Molecular mechanism and characterization of self-assembly of feather keratin gelation // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 107. P. 290–296. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.168.
70. Espersen R., Falco F.C., Hägglund P., Gernaey K.V., Lantz A.E., Svensson B. Two novel S1 peptidases from *Amycolatopsis keratinophila* subsp. *keratinophila* D2T degrading keratinous slaughterhouse by-products // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020. V. 104. № 6. P. 2513-2522. doi:10.1007/s00253-020-10380-x.
71. Evans K.L., Crowder J., Miller E.S. Subtilisins of *Bacillus spp.* hydrolyze keratin and allow growth on feathers // *Can. J. Microbiol.* 2000. V. 46. № 11. P. 1004-1011. doi:10.1139/w00-085.

72. Fan J., Yu W. D. Fractal analysis of the ortho-cortex and para-cortex of wool fiber // *Advanced Materials Research*. Trans Tech Publications Ltd. 2011. V. 197. P. 86-89. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.197-198.86.
73. Fang Z., Zhang J., Liu B., Du G., Chen J. Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2013. V. 82. P. 166-172. doi:10.1016/j.ibiod.2013.03.008.
74. Fang Z., Yong Y.C., Zhang J., Du G., Chen J. Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 7771–7779. doi: 10.1007/s00253-017-8484-1.
75. Farag A.M., Hassan M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae* // *Enzyme and Microbial Technology*. 2004. V. 34. № 2. P. 85-93.
76. Fernández-D'Arlas B. Tough and Functional Cross-linked Bioplastics from Sheep Wool Keratin // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 14810. doi:10.1038/s41598-019-51393-5.
77. Feroz S., Dias G. Hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) crosslinked keratin/hydroxyapatite (HA) scaffold fabrication, characterization and *in vitro* biocompatibility assessment as a bone graft for alveolar bone regeneration // *Heliyon*. 2021. V. 7. P. e08294. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08294.
78. Food and Indoor Fungi. CBS Laboratory Manual Series 2. Editor(s): Samson R.A., Houbraken J., Thrane U., Frisvad J.C., Andersen B. Utrecht, Netherlands, CBS: 2010. 390 p.
79. Fraser R.D.B., MacRae T.P., Parry D.A.D., Suzuki E. The structure of beta-keratin // *Polymer*. 1969. V.10. P. 810–826.
80. Fraser R.D.B., MacRae T. P., Rogers G. E. Keratins. Their Composition, Structure and Biosynthesis. Ill.: Springfield. 1972. P. 378-379.
81. Fraser R.D.B., MacRae T.P. The structure of a-keratin // *Structure*. 1973. V. 14. P. 61–67.
82. Fraser R.D.B., Parry D.A.D. Molecular packing in the feather keratin filament // *Journal of Structural Biology*. 2008. V. 162. № 1. P. 1-13. doi:10.1016/j.jsb.2008.01.011.
83. Fraser R.D.B., Parry D.A.D. Structural Hierarchy of Trichocyte Keratin Intermediate Filaments. In *The Hair Fibre: Proteins, Structure and Development*. Springer: Berlin/Heidelberg. Germany. 2018. P. 57–70.
84. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series 1 / Editor(s): Crous P.W., Verkley G.J.M., Groenewald J.Z., Samson R.A. Utrecht, Netherlands, CBS: 2009. 270 pp.
85. Gaidau C., Stanca M., Niculescu M.-D., Alexe C.-A., Becheritu M., Horoias R., Cioineag C., Râpă M., Stanculescu I.R. Wool Keratin Hydrolysates for Bioactive Additives Preparation // *Materials*. 2021. V. 14. P. 4696. doi:10.3390/ma14164696.

86. Gaio E., Guerrini A., Ballestri M., Varchi G., Ferroni C., Martella E., Columbaro M., Moret F., Reddi E. Keratin nanoparticles co-delivering Docetaxel and Chlorin e6 promote synergic interaction between chemo- and photo-dynamic therapies // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2019. V. 199. P. 111598. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111598.
87. Gao F., Li W., Deng J., Kan J., Guo T., Wang B., Hao S. Recombinant Human Hair Keratin Nanoparticles Accelerate Dermal Wound Healing // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019. V. 11. P. 18681–18690. doi:10.1021/acsami.9b01725.
88. Gao J., Zhang L., Wei Y., Chen T., Ji X., Ye K., Yu J., Tang B., Sun X., Hu J. Human hair keratins promote the regeneration of peripheral nerves in a rat sciatic nerve crush model // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2019. V. 30. P. 1–13. doi:10.1007/s10856-019-6283-1.
89. Ghaffar I., Imtiaz A., Hussain A., Javid A., Jabeen F., Akmal M., Qazi, J.I. Microbial production and industrial applications of keratinases: an overview // *International Microbiology.* 2018. V. 21. № 4. P. 163-174. doi:10.1007/s10123-018-0022-1.
90. Gong X., Dang G., Guo J., Liu Y., Gong Y. A sodium alginate/feather keratin composite fiber with skin-core structure as the carrier for sustained drug release // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 155. P. 386–392. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.224.
91. Gradisar H., Kern S., Friedrich J. Keratinase of *Doratomyces microspores* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 53. № 2. P. 196-200. doi:10.1007/s002530050008.
92. Gradisar H., Friedrich J., Krizaj I., Jerala R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 7. P. 3420-3426. doi:10.1128/AEM.71.7.3420-3426.2005.
93. Grumbt M., Monod M., Yamada T., Hertweck C., Kunert J., Staib P. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump // *J. Invest. Dermatol.* 2013. V. 133. P. 1550–1555. doi:10.1038/jid.2013.41.
94. Gupta R., Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 70. № 1. P. 21-33. doi:10.1007/s00253-005-0239-8.
95. Gupta R., Sharma R., Beg Q.K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2013. V. 33. № 2. P. 216-228. doi:10.3109/07388551.2012.685051.
96. Gupta R., Rajput R., Sharma R., Gupta N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. № 23. P. 9931-9940. doi:10.1007/s00253-013-5292-0.

97. Hadrich I., Khemekhem N., Neji S., Trablesi H., Ilahi A., Sellami H., Makni F., Ayadi A. Production and Quantification of Virulence Factors in *Malassezia* Species // Pol. J. Microbiol. 2022. V. 71. № 4. P. 529-538. doi:10.33073/pjm-2022-047.
98. Han S., Ham T.R., Haque S., Sparks J.L., Saul J.M. Alkylation of human hair keratin for tunable hydrogel erosion and drug delivery in tissue engineering applications // Acta Biomater. 2015. V. 23. P. 201–213. doi:10.1016/j.actbio.2015.05.013.
99. Han X., Yang R., Wan X., Dou J., Yuan J., Chi B., Shen J. Antioxidant and multi-sensitive PNIPAAm/keratin double network gels for self-stripping wound dressing application // J. Mater. Chem. B. 2021. V. 9. P. 6212–6225. doi:10.1039/d1tb00702e.
100. Hassan M.A., Taha T.H., Hamad G.M., Hashem M., Alamri S., Mostafa Y.S. Biochemical characterisation and application of keratinase from *Bacillus thuringiensis* MT1 to enable valorisation of hair wastes through biosynthesis of vitamin B-complex // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 153. P. 561–572. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.032.
101. Hassan M.A., Abol-Fotouh D., Omer A.M., Tamer T.M., Abbas E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. V. 154. P. 567-583. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.116.
102. Herrmann H., Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds // Annual review of biochemistry. 2004. V. 73. № 1. P. 749-789. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073823.
103. Hill P.S., Apel P.J., Barnwell J., Smith T., Koman L.A., Atala A., Van Dyke M. Repair of Peripheral Nerve Defects in Rabbits Using Keratin Hydrogel Scaffolds // Tissue Eng. Part A. 2011. V. 17. P. 1499–1505. doi:10.1089/ten.tea.2010.0184.
104. Hilz H., Wieggers U., Adamietz P. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of “masked” proteins // European Journal of Biochemistry. 1975. V. 56. № 1. P. 103-108.
105. Holkar C.R., Jadhav A.J., Bhavsar P.S., Kannan S., Pinjari D.V., Pandit A.B. Acoustic Cavitation Assisted Alkaline Hydrolysis of Wool Based Keratins To Produce Organic Amendment Fertilizers // ACS Sustain. Chem. Eng. 2016. V. 4. P. 2789–2796. doi:10.1021/acssuschemeng.6b00298.
106. Hölker U., Höfer M., Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi // Applied Microbiology and Biotechnology. 2004. V. 64. № 2. P. 175-186. doi:10.1007/s00253-003-1504-3.

107. Holthaus K.B., Eckhart L., Valle L.D., Alibardi L. Review: Evolution and diversification of corneous beta-proteins, the characteristic epidermal proteins of reptiles and birds // *J. Exp. Zoöl. Part B Mol. Dev. Evol.* 2018. V. 330. P. 438–453. doi:10.1002/jez.b.22840.
108. Houbraken J., Frisvad J.C., Samson R.A. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina // *Studies in Mycology.* 2011. V. 70. P. 53–138. doi:10.3114/sim.2011.70.02.
109. Jacob J.T., Coulombe P.A., Kwan R., Omary B. Types I and II Keratin Intermediate Filaments // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018. V. 10. P. a018275. doi:10.1101/cshperspect.a018275.
110. Jafari H., Lista A., Siekapen M.M., Ghaffari-Bohlouli P., Nie L., Alimoradi H., Shavandi A. Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering // *Polymers.* 2020. V. 12. P. 2230. doi:10.3390/polym12102230.
111. Jaouadi B., Abdelmalek B., Fodil D., Ferradji F.Z., Rekik H., Zaraï N., Bejar S. Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces sp.* strain AB1 with high stability in organic solvents // *Bioresource technology.* 2010. V. 101. № 21. P. 8361–8369. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.066.
112. Jin H.-S., Song K., Baek J.-H., Lee J.-E., Kim D.J., Nam G.-W., Kang N.J., Lee D.-W. Identification of Matrix Metalloproteinase-1-Suppressive Peptides in Feather Keratin Hydrolysate // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. P. 12719–12729. doi:10.1021/acs.jafc.8b05213.
113. Jones L.N., Simon M., Watts N.R., Booy F.P., Steven A.C., Parry D.A.D. Intermediate filament structure: hard a-keratin // *Biophysical chemistry.* 1997. V. 68. № 1-3. P. 83–93.
114. Kadir M., Wang X., Zhu B., Liu J., Harland D., Popescu C. The structure of the “amorphous” matrix of keratins // *J. Struct. Biol.* 2017. V. 198. P. 116–123. doi:10.1016/j.jsb.2017.04.001.
115. Kakkar P., Madhan B. Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications // *Mater. Sci. Eng. C.* 2016. V. 66. P. 178–184. doi:10.1016/j.msec.2016.04.067.
116. Kanth S.V., Venba R., Madhan B., Chandrababu N.K., Sadulla S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing // *Dye Pigment.* 2008. V. 76. P. 338–347. doi:10.1016/j.dyepig.2006.08.043.
117. Karthikeyan R., Balaji S., Sehgal P. Industrial applications of keratins — A review // *Journal of Scientific and Industrial Research.* 2007. V. 66. P. 710–715.
118. Kaur M., Bhari R., Singh R.S. Chicken feather waste-derived protein hydrolysate as a potential biostimulant for cultivation of mung beans // *Biologia.* 2021. V. 76. P. 1807–1815. doi:10.1007/s11756-021-00724-x.

119. Khosravi A.R., Mahdavi Omran S., Shokri H., Lotfi A., Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis // *Journal de Mycologie Medicale*. 2012. V. 22. № 2. P. 167-172. doi:10.1016/j.mycmed.2012.03.002.
120. Kim J.D. Preliminary characterization of keratinolytic enzyme of *Aspergillus flavus* K-03 and its potential in biodegradation of keratin wastes // *Mycobiology*. 2003. V. 31. № 4. P. 209-213. doi:10.4489/MYCO.2003.31.4.209.
121. Kim J.D. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading fungus, *Aspergillus flavus* Strain K-03 // *Mycobiology*. 2007. V. 35. № 4. P. 219-225. doi:10.4489/MYCO.2007.35.4.219.
122. Kokwe L., Nnolim N.E., Ezeogu L.I., Sithole B., Nwodo U.U. Thermoactive metallo-keratinase from *Bacillus sp.* NFH5: Characterization, structural elucidation, and potential application as detergent additive // *Heliyon*. 2023. V. 9. № 2. P. e13635. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13635.
123. Konop M., Czuwara J., Kłodzińska E., Laskowska A., Sulejczak D., Damps T., Zielenkiewicz U., Brzozowska I., Sureda A., Kowalkowski T., Schwartz R. A., Rudnicka L. Evaluation of keratin biomaterial containing silver nanoparticles as a potential wound dressing in full-thickness skin wound model in diabetic mice // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2020. V. 14. P. 334–346. doi:10.1002/term.2998.
124. Konop M., Laskowska A., Rybka M., Kłodzińska E., Sulejczak D., Schwartz R., Czuwara J. Keratin Scaffolds Containing Casomorphin Stimulate Macrophage Infiltration and Accelerate Full-Thickness Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 2554. doi:10.3390/molecules26092554.
125. Kothari D., Rani A., Goyal A. Keratinases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier. 2017. P. 850.
126. Kothary M.H., Chase T. Jr., Macmillan J.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice // *Infection and Immunity*. 1984. V. 43. № 1. P. 320-325.
127. Kreplak L., Doucet J., Dumas P., Briki F. New Aspects of the α -Helix to β -Sheet Transition in Stretched Hard α -Keratin Fibers // *Biophys. J.* 2004. V. 87. P. 640–647. doi:10.1529/biophysj.103.036749.
128. Kshetri P., Roy S.S., Sharma S., Singh T.S., Alam Ansari M., Prakash N., Ngachan S.V. Transforming Chicken Feather Waste into Feather Protein Hydrolysate Using a Newly Isolated Multifaceted Keratinolytic Bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7 // *Waste Biomass-Valorization*. 2019. V. 10. P. 1–11. doi:10.1007/s12649-017-0037-4.

129. Kshetri P., Roy S.S., Chanu S.B., Singh T.S., Tamreihao K., Sharma S.K., Ansari M., Prakash N. Valorization of chicken feather waste into bioactive keratin hydrolysate by a newly purified keratinase from *Bacillus sp.* RCM-SSR-102 // J. Environ. Manag. 2020. V. 273. P. 111195. doi:10.1016/j.jenvman.2020.111195.
130. Kuczius T., Groschup M.H. Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains // Molecular medicine. 1999. V. 5. № 6. P. 406-418.
131. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
132. Kunert J. Physiology of keratinophilic fungi // Revista Iberoamericana de Micologia. 2000. V. 1. P. 77-85.
133. La Claire J.W., Herrin D.L. Co-isolation of high-quality DNA and RNA from coenocytic green algae // Plant Molecular Biology Reporter. 1997. V. 15. № 3. P. 263-272.
134. Labuda R., Bernreiter A., Hochenauer D., Kubátová A., Kandemir H., Schüller C. Molecular systematics of *Keratinophyton*: the inclusion of species formerly referred to *Chrysosporium* and description of four new species // IMA Fungus. 2021. V. 12. № 1. P. 17. doi: 10.1186/s43008-021-00070-2.
135. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685. doi:10.1038/227680a0.
136. Lange L., Huang Y., Busk P.K. Microbial decomposition of keratin in nature – a new hypothesis of industrial relevance // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 5. P. 2083-2096. doi:10.1007/s00253-015-7262-1.
137. Leichner C., Steinbring C., Baus R.A., Baecker D., Gust R., Bernkop-Schnürch A. Reactive keratin derivatives: A promising strategy for covalent binding to hair // J. Colloid Interface Sci. 2019. V. 534. P. 533–541. doi:10.1016/j.jcis.2018.09.062.
138. Lewis D.M., Rippon J.A. The coloration of wool and other keratin fibres. New Delhi: John Wiley & Sons. 2013. P. 450.
139. Li K., Li G., Peng S., Tan M. Effective biodegradation on chicken feather by the recombinant KerJY-23 *Bacillus subtilis* WB600: A synergistic process coupled by disulfide reductase and keratinase // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 253. P. 127194. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.127194.
140. Li Q. Progress in microbial degradation of feather waste //Frontiers in Microbiology. 2019. V. 10. P. 2717. doi:10.3389/fmicb.2019.02717.

141. Li Y., Lin J., Zhi X., Li P., Jiang X., Yuan J. Triple stimuli-responsive keratin nanoparticles as carriers for drug and potential nitric oxide release // *Mater. Sci. Eng. C*. 2018. V. 91. P. 606–614. doi:10.1016/j.msec.2018.05.073.
142. Li Z.W., Liang S., Ke Y., Deng J.J., Zhang M.S., Lu D.L., Li J.Z., Luo X.C. The feather degradation mechanisms of a new *Streptomyces* sp. isolate SCUT-3 // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. P. 191. doi:10.1038/s42003-020-0918-0.
143. Lin C.-W., Chen Y.-K., Tang K.-C., Yang K.-C., Cheng N.-C., Yu J. Keratin scaffolds with human adipose stem cells: Physical and biological effects toward wound healing // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2019. V. 13. P. 1044–1058. doi:10.1002/term.2855.
144. Lin X., Kelemen D.W., Miller E.S., Shih J.C. Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. № 4. P. 1469-1474.
145. Lin Y.-C., Ramadan M., Van Dyke M., Kokai L.E., Philips B.J., Rubin J.P., Marra K.G. Keratin Gel Filler for Peripheral Nerve Repair in a Rodent Sciatic Nerve Injury Model // *Plast. Reconstr. Surg.* 2012. V. 129. P. 67–78. doi:10.1097/prs.0b013e3182268ae0.
146. Lingham-Soliar T., Murugan N. A new helical crossed-fibre structure of β -keratin in flight feathers and its biomechanical implications // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 6. P. e65849. doi:10.1371/journal.pone.0065849.
147. Liu Z.Q., Jiao D., Meyers M.A., Zhang Z.F. Structure and mechanical properties of naturally occurring lightweight foam-filled cylinder–The peacock’s tail coverts shaft and its components // *Acta Biomaterialia*. 2015. V. 17. P. 137-151. doi:10.1016/j.actbio.2015.01.035.
148. Lopes F.C., Silva L.A., Tichota D.M., Velho R.V., Pereira J. Q., Corrêa A.P.F., Brandelli A. Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger* // *Enzyme research*. 2011. V. 2011. P. e487093. doi:10.4061/2011/487093.
149. Lusiana R.S., Müller-Goymann C.C. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011. V. 78. P. 432–440. doi:10.1016/j.ejpb.2011.01.022.
150. Lusiana R.S., Müller-Goymann C.C. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum in vitro* // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. V. 84. P. 599–605. doi:10.1016/j.ejpb.2013.01.015.
151. Luo T., Hao S., Chen X., Wang J., Yang Q., Wang Y., Weng Y., Wei H., Zhou J., Wang B. Development and assessment of keratine nanoparticles for use as a hemostatic agent // *Mater. Sci. Eng. C*. 2016. V. 63. P. 352–358. doi:10.1016/j.msec.2016.03.007.

152. Macedo A.J., Beys da Silva W.O., Termignoni C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase // Canadian journal of microbiology. 2008. V. 54. № 3. P. 180-188. doi:10.1139/w07-124.
153. Mazotto A., Couri S., Damaso M., Vermelho A. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: comparison of submerged and solid-state fermentation // Int. J. Biodeterioration and Biodegradation. 2013. V. 85. P. 189-195. doi:10.1016/j.ibiod.2013.07.003.
154. McMurry J., Fay R. Biochemistry. In: Chemistry. Pearson Prentice Hall, Prentice Hall, Upper Saddle River. NJ. 2003.
155. Mercer E.H. Keratin and keratinization: an essay in molecular biology. Pergamon. 1961.
156. Mercer D.K., Stewart C.S. Keratin hydrolysis by dermatophytes // Med. Mycol. 2019. V. 57. № 1. P. 13-22. doi:10.1093/mmy/myx160
157. Mitola G., Escalona F., Salas R., García E., Ledesma A. Morphological characterization of in-vitro human hair keratinolysis, produced by identified wild strains of *Chrysosporium* species // Mycopathologia. 2002. V. 156. P. 163–169. doi:10.1023/a:1023340826584.
158. Mitsuiki S., Ichikawa M., Oka T., Sakai M., Moriyama Y., Sameshima Y., Goto M., Furukawa K. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardioopsis* sp. TOA-1 // Enzyme and Microbial Technology. 2004. V. 34. № 5. P. 482-489. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.011.
159. Moay Z., Nguyen L., Hartrianti P., Lunny D., Leavesley D., Kok Y., Chong S., Chua A., Tee S.-I., Ng K. Keratin-Alginate Sponges Support Healing of Partial-Thickness Burns // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 8594. doi:10.3390/ijms22168594.
160. Mokrejs P., Hutta M., Pavlackova J., Egner P., Benicek L. The cosmetic and dermatological potential of keratin hydrolysate // J. Cosmet. Dermatol. 2017. V. 16. P. e21–e27. doi:10.1111/jocd.12319.
161. Mokrejš P., Svoboda P., Hrnčířík J., Janacova D., Vasek V. Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline enzymatic hydrolysis // Waste Manag. Res. J. A Sustain. Circ. Econ. 2011. V. 29. P. 260–267. doi:10.1177/0734242x10370378.
162. Mokrejš P., Hutta M., Pavlačková J., Egner P. Preparation of Keratin Hydrolysate from Chicken Feathers and Its Application in Cosmetics // J. Vis. Exp. 2017. V. 129. P. e56254–e56254. doi:10.3791/56254.
163. Moreira-Gasparin F.G., de Souza C.G.M., Costa A.M., Alexandrino A.M., Bracht C.K., Boer C.G., Peralta R.M. Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria* // Biodegradation. 2009. V. 20. № 5. P. 727-736. doi:10.1007/s10532-009-9260-4.

164. Mori H., Hara M. Transparent biocompatible wool keratin film prepared by mechanical compression of porous keratin hydrogel // *Mater. Sci. Eng. C* 2018. V. 91. P. 19–25. doi:10.1016/j.msec.2018.05.021.
165. Nam G., Lee D., Lee H., Lee N., Kim B., Choe E., Hwang J., Suhartono M., Pyun Y. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe // *Archives of Microbiology*. 2002. V. 178. № 6. P. 538-547. doi:10.1007/s00203-002-0489-0.
166. Navone L., Speight R. Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 8. P. e0202608. doi:10.1371/journal.pone.0202608.
167. Navone L., Moffitt K., Hansen K.A., Blinco J., Payne A., Speight R. Closing the textile loop: Enzymatic fibre separation and recycling of wool/polyester fabric blends // *Waste Management*. 2020. V. 102. P. 149-160. doi:10.1016/j.wasman.2019.10.026.
168. Navarro J., Clohessy R.M., Holder R.C., Gabard A.R., Herendeen G.J., Christy R.J., Burnett L.R., Fisher P.J.P. *In Vivo* Evaluation of Three-Dimensional Printed, Keratin-Based Hydrogels in a Porcine Thermal Burn Model // *Tissue Eng. Part A*. 2020. V. 26. P. 265–278. doi:10.1089/ten.tea.2019.0181.
169. Nurdiawati A., Nakhshiniev B., Zaini I.N., Saidov N., Takahashi F., Yoshikawa K. Characterization of potential liquid fertilizers obtained by hydrothermal treatment of chicken feathers // *Environ. Prog. Sustain. Energy*. 2018. V. 37. P. 375–382. doi:10.1002/ep.12688.
170. Nwadiaro P., Ogbonna, A., Wuyep P., Adekojo D. Keratinolytic activity of *Cladosporium* and *Trichoderma* species isolated from barbers' landfill // *International Journal of Biosciences*. 2015. Vol. 6. № 10. P. 104-115. doi:10.12692/ijb/6.105-115.
171. Pace L.A., Plate J.F., Mannava S., Barnwell J.C., Koman L.A., Li Z., Smith T.L., Van Dyke M. A Human Hair Keratin Hydrogel Scaffold Enhances Median Nerve Regeneration in Nonhuman Primates: An Electrophysiological and Histological Study // *Tissue Eng. Part A*. 2014. V. 20. P. 507–517. doi:10.1089/ten.tea.2013.0084.
172. Pandey A. Solid-state fermentation // *Biochemical Engineering Journal*. 2003. V. 13. № 2-3. P. 81-84.
173. Parker R.N., Trent A., Stefaniak K.L.R., Van Dyke M.E., Grove T.Z. A comparative study of materials assembled from recombinant K31 and K81 and extracted human hair keratins // *Biomed. Mater.* 2020. V. 15. P. 65006. doi:10.1088/1748-605x/ab98e8.
174. Parry D.A.D. Hard α -keratin intermediate filaments: an alternative interpretation of the low-angle equatorial X-ray diffraction pattern, and the axial disposition of putative disulphide bonds in the intra-and inter-protofilamentous networks // *International journal of biological macromolecules*. 1996. V. 19. № 1. P. 45-50.

175. Parry D.A., Fraser R.B., Squire J.M. Fifty years of coiled-coils and α -helical bundles: A close relationship between sequence and structure // *J. Struct. Biol.* 2008. V. 163. P. 258–269. doi:10.1016/j.jsb.2008.01.016.
176. Parry D.A., Fraser R.B., Alibardi L., Rutherford K., Gemmell N. Molecular structure of sauropsid β -keratins from tuatara (*Sphenodon punctatus*) // *J. Struct. Biol.* 2019. V. 207. P. 21–28. doi:10.1016/j.jsb.2019.04.008.
177. Passipieri J., Baker H., Siriwardane M., Ellenburg M.D., Vadhavkar M., Saul J.M., Tomblyn S., Burnett L., Christ G.J. Keratin Hydrogel Enhances In Vivo Skeletal Muscle Function in a Rat Model of Volumetric Muscle Loss // *Tissue Eng. Part A.* 2017. V. 23. P. 556–571. doi:10.1089/ten.tea.2016.0458.
178. Paul T., Halder S.K., Das A., Bera S., Maity C., Mandal A., Das P.S., Das Mohapatra P.K., Pati B.R., Mondal K.C. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2 // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2013. V. 2. № 1. P. 50-57. doi:10.1016/j.bcab.2012.10.001.
179. Paul T., Das A., Mandal A., Halder S. K., Das Mohapatra P. K., Pati B. R., Mondal K. C. Production and purification of keratinase using chicken feather bioconversion by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* TKF1: detection of valuable metabolites // *Biomass Conversion and Biorefinery.* 2014. V. 4. № 2. P. 137-148. doi:10.1007/s13399-013-0090-6.
180. Peng Z., Zhang J., Du G., Chen J. Keratin waste recycling based on microbial degradation: mechanisms and prospects // *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2019. V. 7. P. 9727-9736. doi:10.1021/acssuschemeng.9b01527.
181. Peng Z., Mao X., Zhang J., Du G., Chen J. Biotransformation of keratin waste to amino acids and active peptides based on cell-free catalysis // *Biotechnol. Biofuels.* 2020. V. 13. P. 1–12. doi:10.1186/s13068-020-01700-4.
182. Peng Z., Xu P., Song Y., Du G.C., Zhang J., Chen J. Cysteine-Mediated Cyclic Metabolism Drives the Microbial Degradation of Keratin // *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2021. V. 9. P. 9861–9870. doi:10.1021/acssuschemeng.1c02627.
183. Peyton C.C., Keys T., Tomblyn S., Burmeister D., Beumer J.H., Holleran J.L., Sirintrapun J., Washburn S., Hodges S.J. Halofuginone infused keratin hydrogel attenuates adhesions in a rodent cecal abrasion model // *J. Surg. Res.* 2012. V. 178. P. 545–552. doi:10.1016/j.jss.2012.07.053.
184. Placone J.K., Navarro J., Laslo G.W., Lerman M.J., Gabard A.R., Herendeen G.J., Falco E.E., Tomblyn S., Burnett L., Fisher J.P. Development and Characterization of a 3D Printed,

- Keratin-Based Hydrogel // Ann. Biomed. Eng. 2017. V. 45. P. 237–248. doi:10.1007/s10439-016-1621-7.
185. Poranki D., Whitener W., Howse S., Mesen T., Howse E., Burnell J., Greengauz-Roberts O., Molnar J., Van Dyke M. Evaluation of skin regeneration after burns in vivo and rescue of cells after thermal stress in vitro following treatment with a keratin biomaterial // J. Biomater. Appl. 2014. V. 29. P. 26–35. doi:10.1177/0885328213513310.
186. Preczeski K.P., Dalastra C., Czapela F.F., Kubeneck S., Scapini T., Camargo A.F., Zanivan J., Bonatto C., Stefanski F.S., Venturin B., Fongaro G., Treichel H. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus sp.* as Keratinase Producers Using Swine Hair From Agroindustrial Residues // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020. V. 8. P. 71. doi:10.3389/fbioe.2020.00071.
187. Pulidori E., Micalizzi S., Bramanti E., Bernazzani L., Duce C., De Maria C., Montemurro F., Pelosi C., De Acutis A., Vozzi G., Tinè M. R. One-Pot Process: Microwave-Assisted Keratin Extraction and Direct Electrospinning to Obtain Keratin-Based Bioplastic // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 9597. doi:10.3390/ijms22179597.
188. Purchase D. Microbial keratinases: characteristics, biotechnological applications and potential // CAB International. The Handbook of Microbial Bioresources. 2016. V. 10.
189. Qiu J., Wilkens C., Barrett K., Meyer A.S. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function // Biotechnol. Adv. 2020. V. 44. P. 107607. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107607.
190. Qiu J., Barrett K., Wilkens C., Meyer A.S. Bioinformatics based discovery of new keratinases in protease family M36 // N. Biotechnol. 2022. V. 68. P. 19-27. doi:10.1016/j.nbt.2022.01.004.
191. Rajput R., Sharma R., Gupta R. Biochemical characterization of a thiol-activated, oxidation stable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12 // Enzyme research. 2010. V. 2010. doi:10.4061/2010/132148.
192. Ramakrishnan N., Sharma S., Gupta A., Alashwal B.Y. Keratin based bioplastic film from chicken feathers and its characterization // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 111. P. 352–358. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.037.
193. Ramnani P., Singh R., Gupta R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation // Can. J. Microbiol. 2005. V. 51. P. 191–196. doi:10.1139/w04-123.
194. Ramos M.L.P., González J.A., Fabian L., Perez C.J., Villanueva M.E., Copello G.J. Sustainable and smart keratin hydrogel with pH-sensitive swelling and enhanced mechanical properties // Mater. Sci. Eng. C. 2017. V. 78. P. 619–626. doi:10.1016/j.msec.2017.04.120.

195. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial proteases applications // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019. V. 7. P. 110. doi:10.3389/fbioe.2019.00110.
196. Ren Y., Yu X., Li Z., Liu D., Xue X. Fabrication of pH-responsive TA-keratin bio-composited hydrogels encapsulated with photoluminescent GO quantum dots for improved bacterial inhibition and healing efficacy in wound care management: In vivo wound evaluations // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2020. V. 202. P. 111676. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111676.
197. Roy D.C., Tomblyn S., Isaac K.M., Kowalczewski C.J., Burmeister D.M., Burnett L.R., Christy R.J. Ciprofloxacin-loaded keratin hydrogels reduce infection and support healing in a porcine partial-thickness thermal burn // *Wound Repair Regen.* 2016. V. 24. P. 657–668. doi:10.1111/wrr.12449.
198. Saber W.I.A., El-Metwally M.M., El-Hersh M.S. Keratinase production and biodegradation of some keratinous wastes by *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus nidulans* // *Research journal of microbiology*. 2010. V. 5. № 1. P. 21-35. doi:10.3923/jm.2010.21.35.
199. Sadeghi S., Nourmohammadi J., Ghaee A., Soleimani N. Carboxymethyl cellulose-human hair keratin hydrogel with controlled clindamycin release as antibacterial wound dressing // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 147. P. 1239–1247. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.251.
200. Sankar G.G., Lakshmi S.S., Prabhakar T., Kumari P.K. Screening, partial purification and characterization of keratinase from newly isolated marine fungi // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2014. V. 24. № 2.
201. Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A., Langbein L., Lane E.B., Magin T.M., Maltais L., Omary M.B., Parry D.A., Rogers M.A., Wright M.W. New consensus nomenclature for mammalian keratins // *The Journal of cell biology*. 2006. V. 174. № 2. P. 169-174. doi:10.1083/jcb.200603161.
202. Selvam K., Vishnupriya B. Biochemical and molecular characterization of microbial keratinase and its remarkable applications // *International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive*. 2012. V. 3. № 2. P. 267-275.
203. Serna-Cock L., Rengifo-Guerrero C.A., Rojas-Restrepo M.A. Use of Earthworm (*Eisenia foetida*) Flour and Hydrolyzed Chicken Feathers as Sources of Nitrogen and Minerals for Ethanol Production // *Waste Biomass-Valorization*. 2018. V. 9. P. 1513–1522. doi:10.1007/s12649-017-9931-z.
204. Sharma L.A., Love R., Ali M.A., Sharma A., Macari S., Avadhani A., Dias G.J. Healing Response of Rat pulp Treated with an Injectable Keratin Hydrogel // *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 2017. V. 15. P. 244–250. doi:10.5301/jabfm.5000346.

205. Sharma R., Devi S. Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2018. V. 17. № 1. P. 19-45. doi:10.1007/s11157-017-9454-x.
206. Shavandi A., Silva T.H., Bekhit A.A., Bekhit A.E.-D.A. Keratin: Dissolution, extraction and biomedical application // *Biomater. Sci.* 2017. V. 5. P. 1699–1735. doi:10.1039/c7bm00411g.
207. Shen D., Wang X., Zhang L., Zhao X., Li J., Cheng K., Zhang J. The amelioration of cardiac dysfunction after myocardial infarction by the injection of keratin biomaterials derived from human hair // *Biomaterials*. 2011. V. 32. P. 9290–9299. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.057.
208. Shestakova A., Lyamina V., Timorshina S., Osmolovskiy A. Patented Keratinolytic Enzymes for Industrial Application: An Overview // *Recent. Pat. Biotechnol.* 2023. V. 17. № 4. P. 346-363. doi:10.2174/1872208317666221212122656.
209. Sierpinski P., Garrett J., Ma J., Apel P., Klorig D., Smith T., Koman L.A., Atala A., Van Dyke M. The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves // *Biomaterials*. 2008. V. 29. P. 118–128. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.023.
210. Sionkowska A., Skopinska-Wiśniewska J., Kozłowska J., Płancka A., Kurzawa M. Photochemical behaviour of hydrolysed keratin // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2011. V. 33. P. 503–508. doi:10.1111/j.1468-2494.2011.00662.x.
211. Sivakumar T., Balamurugan P., Ramasubramanian V. Characterization and applications of keratinase enzyme by *Bacillus thuringiensis* TS2 // *International Journal of Future Biotechnology*. 2013. V. 2. № 1. P. 1-8. doi:10.5567/IMICRO-IK.2013.1.8.
212. Song K., Xu H., Xu L., Xie K., Yang Y. Cellulose nanocrystal-reinforced keratin bioadsorbent for effective removal of dyes from aqueous solution // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 232. P. 254–262. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.070.
213. Song K., Qian X., Li X., Zhao Y., Yu Z. Fabrication of a novel functional CNC cross-linked and reinforced adsorbent from feather biomass for efficient metal removal // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 222. P. 115016. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115016.
214. Song K., Qian X., Zhu X., Li X., Hong X. Fabrication of mechanical robust keratin film by mesoscopic molecular network reconstruction and its performance for dye removal // *J. Colloid Interface Sci.* 2020. V. 579. P. 28–36. doi:10.1016/j.jcis.2020.06.026.
215. Sousa M., Souza O., Maciel M., Cruz R., Gorete Rêgo M., Magalhães O., Pessoa-Júnior A., Porto A., Souza-Motta C. Keratinolytic potential of fungi isolated from soil preserved at

- the Micoteca URM // European journal of biotechnology and bioscience. 2015. V. 3. № 4. P. 10-15.
216. Srivastava B., Khatri M., Singh G., Arya S.K. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications // Journal of Cleaner Production. 2020. V. 252
217. Stiborova H., Branska B., Vesela T., Lovecka P., Stranska M., Hajslova J., Jiru M., Patakova P., Demnerova K. Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2016. V. 91. P. 1629–1637. doi:10.1002/jctb.4912.
218. Strasser B., Mlitz V., Hermann M., Tschachler E., Eckhart L. Convergent evolution of cysteine-rich proteins in feathers and hair // BMC Evol. Biol. 2015. V. 15. P. 82. doi:10.1186/s12862-015-0360-y.
219. Suarato G., Contardi M., Perotto G., Heredia-Guerrero J.A., Fiorentini F., Ceseracciu L., Pignatelli C., Debellis D., Bertorelli R., Athanassiou A. From fabric to tissue: Recovered wool keratin/polyvinylpyrrolidone biocomposite fibers as artificial scaffold platform // Mater. Sci. Eng. C. 2020. V. 116. P. 111151. doi:10.1016/j.msec.2020.111151.
220. Sun Z., Yi Z., Zhang H., Ma X., Su W., Sun X., Li X. Bio-responsive alginate-keratin composite nanogels with enhanced drug loading efficiency for cancer therapy // Carbohydr. Polym. 2017. V. 175. P. 159–169. doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.078.
221. Sun Z., Yi Z., Cui X., Chen X., Su W., Ren X., Li X. Tumor-targeted and nitric oxide-generated nanogels of keratin and hyaluronan for enhanced cancer therapy // Nanoscale. 2018. V. 10. P. 12109–12122. doi:10.1039/c8nr03265c.
222. Sypka M., Jodłowska I., Białkowska A.M. Keratinases as Versatile Enzymatic Tools for Sustainable Development // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 1900. doi:10.3390/biom11121900.
223. Tamreihao K., Devi L.J., Khunjamayum R., Mukherjee S., Asem R.S. Ningthoujam D.S. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production // Journal of basic microbiology. 2019. V. 59. № 1. P. 4-13. doi:10.1002/jobm.201800434.
224. Tamura Y., Suzuki S., Sawada T. Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice // Microbial pathogenesis. 1992. V. 12. № 3. P. 237-244.
225. Tang L., Sierra J.O., Kelly R., Kirsner R.S., Li J. Wool-derived keratin stimulates human keratinocyte migration and types IV and VII collagen expression // Exp. Dermatol. 2012. V. 21. P. 458–460. doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01505.x.

226. Tang A., Li Y., Yao Y., Yang X., Cao Z., Nie H., Yang G. Injectable keratin hydrogels as hemostatic and wound dressing materials // *Biomater. Sci.* 2021. V. 9. P. 4169–4177. doi:10.1039/d1bm00135c.
227. Tasaki K. A novel thermal hydrolysis process for extraction of keratin from hog hair for commercial applications // *Waste Manag.* 2020. V. 104. P. 33–41. doi:10.1016/j.wasman.2019.12.042.
228. Tesfaye T., Sithole B., Ramjugernath D. Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route – current status and future prospects // *Clean Technologies and Environmental Policy.* 2017. V. 19. № 10. P. 2363-2378. doi:10.1007/s10098-017-1443-9.
229. Taskin M., Kurbanoglu E. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth // *J. Appl. Microbiol.* 2011. V. 111. P. 826–834. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05103.x.
230. Tatineni R., Doddapaneni K.K., Potumarthi R.C., Vellanki R.N., Kandathil M.T., Kolli N., Mangamoori L.N. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces sp.* // *Bioresource technology.* 2008. V. 99. № 6. P. 1596-1602. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.019.
231. Than M.P., Smith R.A., Cassidy S., Kelly R., Marsh C., Maderal A., Kirsner R.S. Use of a keratin-based hydrogel in the management of recessive dystrophic epidermolysis bullosa // *J. Dermatol. Treat.* 2013. V. 24. P. 290–291. doi:10.3109/09546634.2011.654108.
232. Thanikaivelan P., Rao J.R., Nair B.U., Ramasami T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing // *TRENDS in Biotechnology.* 2004. V. 22. № 4. P. 181-188. doi:10.1016/j.tibtech.2004.02.008.
233. Thompson M., Giuffre A., McClenny C., Van Dyke M. A keratin-based microparticle for cell delivery // *J. Biomater. Appl.* 2021. V. 35. P. 579–591. doi:10.1177/0885328220951892.
234. Tomblyn S., Kneller E.L.P., Walker S.J., Ellenburg M.D., Kowalczewski C.J., Van Dyke M., Burnett L., Saul J.M. Keratin hydrogel carrier system for simultaneous delivery of exogenous growth factors and muscle progenitor cells // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2016. V. 104. P. 864–879. doi:10.1002/jbm.b.33438.
235. Tsuboi R., Ko I., Takamori K., Ogawa H. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH // *Infection and immunity.* 1989. V. 57. № 11. P. 3479-3483.
236. Vaidya M.M., Kanojia D. Keratins: Markers of cell differentiation or regulators of cell differentiation? // *J. Biosci.* 2007. V. 32. P. 629–634. doi:10.1007/s12038-007-0062-8.
237. Valkov A., Zinigrad M., Sobolev A., Nisnevitch M. Keratin Biomembranes as a Model for Studying Onychomycosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 3512. doi:10.3390/ijms21103512.

238. Varga J., Due M., Frisvad J.C., Samson R.A. Taxonomic revision of *Aspergillus* section Clavati based on molecular, morphological and physiological data // Stud. Mycol. 2007. V. 59. P. 89-106. doi:10.3114/sim.2007.59.11.
239. Verma A., Singh H., Anwar S., Chattopadhyay A., Tiwari K.K., Kaur S., Dhilon G.S. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential // Critical reviews in biotechnology. 2017. V. 37. № 4. P. 476-491. doi:10.1080/07388551.2016.1185388.
240. Villanueva M.E., Cuestas M.L., Pérez C.J., Orto V.C.D., Copello G.J. Smart release of antimicrobial ZnO nanoplates from a pH-responsive keratin hydrogel // J. Colloid Interface Sci. 2019. V. 536 P. 372–380. doi:10.1016/j.jcis.2018.10.067.
241. Wan M.-Y., Dong G., Yang B.-Q., Feng H. Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysate // Biotechnol. Lett. 2016. V. 38. P. 643–649. doi:10.1007/s10529-015-2016-9.
242. Wang B., Meyers M.A. Seagull feather shaft: Correlation between structure and mechanical response // Acta Biomater. 2017. V. 48. P. 270-288. doi:10.1016/j.actbio.2016.11.006.
243. Wang J., Hao S., Luo T., Yang Q., Wang B. Development of feather keratin nanoparticles and investigation of their hemostatic efficacy // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 2016. V. 68. P. 768-773. doi:10.1016/j.msec.2016.07.035.
244. Wang L., Cheng G., Ren Y., Dai Z., Zhao Z.S., Liu F., Li S., Wei Y., Xiong J., Tang X. F., Tang B. Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces sp.* CDF and characterization of its keratinolytic protease // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. № 9. P. 3949-3959. doi:10.1007/s00253-014-6207-4.
245. Wang L., Shang Y., Zhang J., Yuan J., Shen J. Recent advances in keratin for biomedical applications // Adv. Colloid Interface Sci. 2023. V. 321. P. 103012. doi:10.1016/j.cis.2023.103012
246. Wang S., Wang Z., Foo S.E.M., Tan N.S., Yuan Y., Lin W., Zhang Z., Ng K.W. Culturing Fibroblasts in 3D Human Hair Keratin Hydrogels // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. V. 7. P. 5187–5198. doi:10.1021/acsami.5b00854.
247. Wang X., Shi Z., Zhao Q., Yun Y. Study on the Structure and Properties of Biofunctional Keratin from Rabbit Hair // Materials. 2021. V. 14. P. 379. doi:10.3390/ma14020379.
248. Wang Y., Wang B., Zhang Q., Ma J. New soft tissue filler derived from autologous keratin and fibroblast for neck wrinkles // J. Cosmet. Dermatol. 2018. V. 17. P. 600–605. doi:10.1111/jocd.12438.

249. Wang Z., Chen Y., Yan M., Li K., Okoye C.O., Fang Z., Ni Z., Chen H. Research progress on the degradation mechanism and modification of keratinase // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2023. V. 107. № 4. P. 1003-1017. doi:10.1007/s00253-023-12360-3
250. Wu P., Dai X., Chen K., Li R., Xing Y. Fabrication of regenerated wool keratin/polycaprolactone nanofiber membranes for cell culture // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 114. P. 1168–1173. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.157.
251. Xu Y., Hu K., Liu C., Du P., Zhou F., Lu Y., Fu Q., Xu J., Lyu G. Eschar dissolution and the immunoregulator effect of keratinase on burn wounds // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. № 1. P. 13238. doi:10.1038/s41598-023-39765-4.
252. Yamamura S., Morita Y., Hasan Q., Yokoyama K., Tamiya E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas sp.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 294. P. 11–38. doi:10.1016/S0006-291X(02)00580-6.
253. Yang W., Shan Z. Application of wool keratin: An anti-ultraviolet wall material in spray drying // *J. Food Sci. Technol.* 2021. V. 58. P. 4235–4244. doi:10.1007/s13197-020-04897-2.
254. Ye W., Qin M., Qiu R., Li J. Keratin-based wound dressings: From waste to wealth // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 211. P. 183-197. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.04.216
255. Yesilova Y., Turan E., Aksoy M., Tanrikulu O., Eroglu N., Sürücü H. Lack of effectiveness of keratin dressings in epidermolysis bullosa // *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2015. V. 81. P. 91–92. doi:10.4103/0378-6323.148602.
256. Zhai M., Xu Y., Zhou B., Jing W. Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2018. V. 180. P. 253–258. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.02.018.
257. Zhang B., Jiang D., Zhou W., Hao H., Niu T. Isolation and characterization of a new *Bacillus sp.* 50-3 with highly alkaline keratinase activity from *Calotes versicolor* faeces // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2009. V. 25. № 4. P. 583-590. doi:10.1007/s11274-008-9926-9.
258. Zhang H., Liu P. Bio-inspired keratin-based core-crosslinked micelles for pH and reduction dual-responsive triggered DOX delivery // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 123. P. 1150–1156. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.178.
259. Zhang H., Liu P. One-Pot Synthesis of Chicken-Feather-Keratin-Based Prodrug Nanoparticles with High Drug Content for Tumor Intracellular DOX Delivery // *Langmuir.* 2019. V. 35. P. 8007–8014. doi:10.1021/acs.langmuir.9b01190.
260. Zhang H., Pei M., Liu P. pH-Activated surface charge-reversal double-crosslinked hyaluronic acid nanogels with feather keratin as multifunctional crosslinker for tumor-

- targeting DOX delivery // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 150. P. 1104–1112. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.116.
261. Zhang L., Hu F., Zhu S., Lin Y., Meng Z., Yu R., Liu X.Y. Meso-Reconstruction of Wool Keratin 3D “Molecular Springs” for Tunable Ultra-Sensitive and Highly Recovery Strain Sensors // *Small*. 2020. V. 16. P. e2000128. doi:10.1002/smll.202000128.
262. Zhang R.X. Gong J.S., Su C., Zhang D.D., Tian H., Dou W.F., Li H., Shi J.S., Xu Z.H. Biochemical characterization of a novel surfactant-stable serine keratinase with no collagenase activity from *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798 // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016. V. 93. P. 843-851. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.063.
263. Zhao X., Lui Y.S., Choo C.K.C., Sow W.T., Huang C.L., Ng K.W., Tan L.P., Loo J.S.C. Calcium phosphate coated Keratin–PCL scaffolds for potential bone tissue regeneration // *Mater. Sci. Eng. C*. 2015. V. 49. P. 746–753. doi:10.1016/j.msec.2015.01.084.
264. Zhu Q., Gong Y., Guo T., Deng J., Ji J., Wang B., Hao S. Thermo-sensitive keratin hydrogel against iron-induced brain injury after experimental intracerebral hemorrhage // *Int. J. Pharm.* 2019. V. 566. P. 342–351. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.076.
265. Zhu W., Qian X., Yu H., Li X., Song K. Fabrication of mechanical robust keratin adsorbent by induced molecular network transition and its dye adsorption performance // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020. V. 27. P. 41577–41584. doi:10.1007/s11356-020-10165-9.
266. <http://www.mycobank.org>
267. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1.

Коллекционные штаммы микромицетов, использованные в исследовании

Штамм	Источник, место отбора пробы	Коллекция
<i>A. alliaceus</i> 7dN1	-	Кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
<i>A. chevalieri</i> 1197		
<i>A. chevalieri</i> 1205		
<i>A. flavus</i> 4059		
<i>A. niger</i> 443		
<i>A. niger</i> 3640		
<i>A. niger</i> GS		
<i>A. ochraceus</i> 247		
<i>A. sydowii</i> 1		
<i>A. sydowii</i> 21		
<i>A. unguis</i> 16		
<i>A. unguis</i> 2167		
<i>A. ustus</i> 1		
<i>Chaetomium globosum</i> 2382		
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> 1779		
<i>C. sphaerospermum</i> 3118		
<i>Paecilomyces varoitii</i> 444		
<i>P. varoitii</i> 2228		
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> 20		
<i>P. chrysogenum</i> 1		
<i>P. chrysogenum</i> 24		
<i>P. expansum</i> 31		
<i>Ulocladium botrytis</i> 4037		

Штамм	Источник, место отбора пробы	Коллекция
<i>Aspergillus aculeatus</i> A2	лесная подстилка, Кроноцкий заповедник, Камчатка, Россия	Кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
<i>A. amstelodami</i> A6	почва, Ростовский заповедник, Россия	
<i>A. candidus</i> A4	лесная подстилка, Тверская область, Россия	
<i>A. clavatus</i> ВКПМ F-1593	почва, Национальный парк Суаншон, Вьетнам	
<i>A. crustosus</i> A29	почва, Баскунчак, Россия	
<i>A. fischeri</i> A11	почва, Баскунчак, Россия	
<i>A. janus</i> A17	листовой опад, Национальный парк Катъен, Вьетнам	
<i>A. raperi</i> A13	листовой опад, Национальный парк Чуянгсин, Вьетнам	
<i>A. ustus</i> A9	почва, Ростовский заповедник, Россия	

Штаммы микромицетов, выделенные из накопительных культур кератинолитиков

Штамм	Источник	Место отбора пробы
<i>Fusarium solani</i> C1	почва с остатками перьев	Ковыльная степь, Воронежская область
<i>Penicillium sizovae</i> C11		
<i>Tolypocladium inflatum</i> ST1		
<i>Aspergillus ochraceus</i> ST2	почва с остатками перьев	Пойма реки Тихая Сосна, Воронежская область
<i>Fusarium oxysporum</i> C2w		
<i>Pseudallescheria boydii</i> C2g		
<i>Trichoderma citrinoviride</i> C2y		
<i>Aspergillus niger</i> C8A	подстилка из курытника	с. Пшеничное, Нижегородский район, Крым
<i>Aspergillus sydowii</i> C7A		
<i>Aspergillus versicolor</i> C72L		
<i>Fusarium solani</i> C71		
<i>Keratinophyton terreum</i> C106		
<i>Aspergillus sydowii</i> C5	подстилка из курытника	с. Укромное, Симферопольский район, Крым
<i>Aspergillus versicolor</i> C51		
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> C66		
<i>Fusarium solani</i> C41		
<i>Penicillium commune</i> C4		
<i>Fusarium oxysporum</i> A1	почва с остатками перьев	Парковая зона, Москва
<i>Fusarium solani</i> A2		
<i>Fusarium solani</i> A3		
<i>Fusarium solani</i> A4		
<i>Penicillium citreonigrum</i> G4		

Питательные среды и условия культивирования микромицетов

Метод культивирования	Питательная среда/носитель/ субстрат	Состав питательной среды, %	Условия культивирования
Поверхностное культивирование	Сусло-агар	Сусло – 4.0, агар – 2.0	Скошенная агаризованная среда в пробирке, статично, 28°C
	Агаризованная среда Чапека	K ₂ HPO ₄ – 0.1, MgSO ₄ – 0.05, KCl – 0.05, FeSO ₄ – 0.001, глюкоза – 3.0, NaNO ₃ – 0.3, агар – 2.0; pH 5.5	
	Полуселективные среды для первичного скрининга	K ₂ HPO ₄ – 0.05, MgSO ₄ – 0.025, пептон – 0.5, белковый субстрат – 1.0 (если кератин – 0.5), агар – 1.5.	Чашки Петри, статично, 28°C
Твердофазное культивирование	Элективная среда для получения накопительной культуры кератинолитиков	Цельные куриные перья – 0.7 г, NaNO ₃ - 0.3, K ₂ HPO ₄ - 0.1, MgSO ₄ - 0.05, KCl - 0.05, FeSO ₄ - 0.001, пептон - 0.1	10 мл среды (250 мл колба), статично, 28°C
	5 г вермикулита или смесью куриного	Одна из сред для глубинного культивирования	20 мл среды (250 мл колба), статично, 28°C
	0.7 г цельных куриных перьев	Одна из сред для глубинного культивирования без добавления источника кератина	10 мл среды (250 мл колба), статично, 28°C
	1.7 г свиной щетины		
	Смесь 0.4 г цельных куриных перьев и 0.9 г свиной щетины		

Метод культивирования	Питательная среда/носитель/ субстрат	Состав питательной среды, %	Условия культивирования
Глубинное культивирование	Посевная среда	сусло – 6.7, глюкоза – 2.0, пептон – 0.1; pH 5.5	100 мл среды (750 мл колба Эрленмейера), 200 об/мин, 28°C
	Среда №1	K ₂ HPO ₄ – 0.1, MgSO ₄ – 0.05, KCl – 0.025, NaCl – 0.025, FeSO ₄ – 0.001, глюкоза – 3.0, кератин шерсти – 0.5; pH 5.5	
	Среда №2	Среда №1 с NaNO ₃ – 0.3	
	Среда №3	Среда №1 с NaNO ₃ – 0.3 и без кератина шерсти	
	Среда №4	NaNO ₃ – 0.3, K ₂ HPO ₄ – 0.1, MgSO ₄ – 0.05, KCl – 0.05, FeSO ₄ – 0.001, глюкоза – 3.0, гидролизат рыбной муки (ГРМ) – 0.5, кератин – 0.5; pH 6.0	
	Среда №5	Среда №4 с перемолотым куриным пером – 0.5 и без кератина	
	Среда №6	Среда №4 с цельным куриным пером – 0.5 и без кератина	

Приложение 3 (продолжение).

Метод культивирования	Питательная среда/носитель/ субстрат	Состав питательной среды, %	Условия культивирования
Глубинное культивирование	Модифицированная среда Чапека (1-7)	Минеральный фон: K_2HPO_4 – 0.1, $MgSO_4$ – 0.05, KCl – 0.05, $FeSO_4$ – 0.001, глюкоза – 3.0 Источники азота: 1 – $NaNO_3$, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – $NaNO_3$; 3 – $NaNO_3$ и перемолотое перо; 4 – $NaNO_3$ и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо	100 мл среды (750 мл колба Эрленмейера), 200 об/мин, 28°C
Глубинное культивирование в иммобилизованном состоянии	Каррагинан	Одна из сред для глубинного культивирования	100 мл среды (750 мл колба Эрленмейера), 200 об/мин, 28°C
	Альгинат кальция	Одна из сред для глубинного культивирования с добавлением 0.05 М $CaCl_2$	

Праймеры, использованные при молекулярно-генетической идентификации
микромицетов

Культура	Праймеры	Ген/участок ДНК
<i>Aspergillus clavatus</i> ВКПМ F-1593	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	домен D1/D2 гена 26S рРНК
	Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	ген β -тубулина
<i>Aspergillus ochraceus</i> ST2	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	домен D1/D2 гена 26S рРНК
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2
	Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	ген β -тубулина
<i>Aspergillus versicolor</i> C51	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	домен D1/D2 гена 26S рРНК
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2
	Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	ген β -тубулина
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> C66	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	домен D1/D2 гена 26S рРНК
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2
	ACT-512F ATGTGCAAGGCCGTTTCGC ACT-783R TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	ген актина
<i>Keratinophyton terreum</i> C106	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	домен D1/D2 гена 26S рРНК
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2
<i>Penicillium sizovae</i> C11	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	домен D1/D2 гена 26S рРНК
	Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	ген β -тубулина
<i>Tolypocladium inflatum</i> ST1	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	домен D1/D2 гена 26S рРНК
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2