

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.152.34:582.282.123.4

Кератинолитический потенциал микромицета *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 и сравнение его ферментов с коммерческим препаратом кератиназы

С.Н. Тиморшина¹ , Е.А. Попова¹ , К.И. Кулешова¹,
А.К. Акьол^{1, 2}, А.А. Осмоловский^{1, *}

¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Faculty of Science, Bursa Uludag University, Turkey, 16059 Nilüfer, Bursa, Görükle Kampüsü

*e-mail: aosmol@mail.ru

Кератинсодержащие отходы (перья, щетина) составляют большую часть всех отходов животноводства — быстроразвивающейся отрасли сельского хозяйства, увеличивающей объем продукции ежегодно. Развитие методов экологически чистой переработки таких отходов с получением ценных ресурсов (аминокислот и олигопептидов) — важная задача современной науки, в том числе биотехнологии. Одним из путей утилизации отходов животноводства, отвечающим современным тенденциям развития зеленой экономики, является использование микроорганизмов и их ферментов. Была изучена возможность получения кератинолитических ферментов *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 в глубинных условиях с различными источниками азота и углерода, в том числе при росте продуцента на отходах животноводства. Наибольшая целевая активность (96,1 Е) достигалась при использовании смешанных источников углерода и азота: неорганического — нитрата натрия, легкоусвояемого органического — гидролизата рыбной муки и труднодоступного органического — перемолотого куриного пера. Варьирование содержания различных субстратов в составе ферментационных сред позволило не только регулировать уровень протеолитической активности, но и достигать пика активности продуцента на разные сутки культивирования. Проведено сравнение удельной активности кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 (рI 9,3) по отношению к различным белковым субстратам с активностью коммерческого препарата протеиназы К. Оба фермента показали схожий уровень активности по отношению к большинству использованных субстратов. Однако протеаза *A. clavatus* ВКПМ F-1593, как оказалось, обладает большей общей протеолитической активностью, что подтверждает перспективность этой культуры для биodeградации отходов животноводства.

Ключевые слова: кератиназы, кератинолитические ферменты, кератин, *Aspergillus clavatus*, протеиназа К, биodeградация

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-5

С ростом населения Земли растет потребность человечества в продуктах сельского хозяйства, что неизбежно приводит к увеличению объемов отходов этой отрасли экономики, в том числе отходов животного происхождения — перьев, щетины. Так, например, в 2020 г. в мире было накоплено более 8 млн тонн лишь перьев, являющихся основным побочным продуктом птицеводства и более чем на 80% состоящих из кератина [1]. Отходы животноводства богаты трудноразлагаемыми фибриллярными белками, в связи с чем в настоящее время такие отходы утилизируют путем сжигания, кислотного/щелочного гидролиза или захороне-

ния. Такие методы увеличивают негативное воздействие на окружающую среду за счет образования факторов загрязнения (например таких, как парниковые газы и сажа), способствуют распространению патогенных микроорганизмов, а также делают невозможным вторичное использование отходов животноводства [2].

Кератин — ценный источник аминокислот и олигопептидов, применение которых возможно в качестве удобрений, кормовых добавок, субстратов для производства биотоплива и биологически активных веществ. Однако получение этих соединений в свободном виде затруднено в связи

с устойчивостью кератина к широкому спектру протеаз, например, трипсина и папаина, что обусловлено его основными физиологическими функциями: структурной и защитной [3].

Для перехода к рациональному использованию трудноразлагаемых белковых субстратов необходимо развитие методов биodeградации. Современные подходы к гидролизу кератина основаны на применении протеолитических ферментов бактериального и грибного происхождения [4, 5]. В настоящее время существует обширная база сведений о бактериальных кератиназах и их продуцентах [6–10]. В том числе известно множество коммерческих кератинолитических препаратов на основе бактериальных протеаз [11, 12], однако проблема переработки кератинсодержащих отходов сельского хозяйства остается нерешенной.

Грибные кератиназы изучены меньше бактериальных. Единственным широко применимым препаратом на основе грибных ферментов с кератинолитической активностью до сих пор остается протеиназа К [13, 14]. Однако этот фермент не подходит для нужд биodeградации из-за своей дороговизны и патогенности продуцента. Микромицеты рода *Aspergillus* – перспективные продуценты протеаз широкого спектра, в том числе – гидролизующих фибриллярные белки [15, 16]. В 2022 г. Цю с соавт. были показаны наличие гена, кодирующего металлопротеазу АсМер с кератинолитической активностью в геноме *Aspergillus clavatus*, и возможность получения этого фермента в рекомбинантном штамме *Pichia pastoris* X-33 [17]. Затем, также в 2022 г., нами была показана секреция микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 сериновой кератиназы при росте на куриных перьях [18]. Полученные данные говорят о перспективности этого штамма в качестве продуцента кератинолитических ферментов для биodeградации кератинсодержащих отходов сельского хозяйства.

Целью настоящей работы стала оптимизация наработки кератинолитических ферментов микро-

мицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 при росте продуцента на наиболее распространенных кератинсодержащих отходах животноводства (свиной щетине и куриных перьях), а также сравнение протеолитического потенциала кератиназ изучаемого штамма с таковым коммерческого аналога – протеиназы К.

Материалы и методы

Реактивы. Субстраты для анализа протеолитической активности, а также коммерческий препарат протеиназы К были приобретены у производителя Sigma-Aldrich (США). В исследовании были использованы соли, кислоты и другие реактивы фирмы Panreac (Испания). Куриные перья и свиная щетина были предоставлены частными малыми хозяйствами. Куриные перья перемалывали на промышленной роторной мельнице. Свиную щетину нарезали на фрагменты по 1,0–1,5 см.

Объект. Объектом исследования служил штамм *A. clavatus* ВКПМ F-1593 [19], относящийся к отделу Ascomycota. Поддержание культуры осуществляли на скошенном сусло-агаре при хранении в комнатных условиях (25°C).

Оптимизация получения кератинолитических ферментов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 при росте на отходах сельского хозяйства. Для оптимизации получения кератинолитических ферментов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 выращивали в условиях глубинного культивирования. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера (750 мл) в 100 мл питательной среды на орбитальных качалках (200 об./мин) при 28°C. Для посева использовали споровую суспензию микромицета на 7-е сут роста на скошенном сусло-агаре. Культивирование проводили в две стадии. Сначала *A. clavatus* ВКПМ F-1593 выращивали на богатой питательными веществами посевной среде (сусло – 6,7, глюкоза – 2,0, пептон – 0,1, (%), рН 5,5), а на 2-е сут культивирования 3% биомассы от общего объема посевной среды переносили в одну из ферментационных сред, различающихся по источникам азота и углерода (табл. 1).

Таблица 1

Ферментационные среды для культивирования *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593

Компоненты	Ферментационные среды									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Количество, %									
K ₂ HPO ₄	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
MgSO ₄	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
KCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,05	0,05	0,05
FeSO ₄	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,001	0,001	0,001
глюкоза	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3,0	3,0	3,0
NaNO ₃	0,3	–	–	0,3	–	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
перемолотое куриное перо	–	0,5	–	0,5	0,25	–	0,25	0,5	–	0,25
измельченная свиная щетина	–	–	1	–	0,5	1	0,5	–	0,5	0,25
гидролизат рыбной муки	–	–	–	–	–	–	–	0,5	0,5	0,5

Культивирование в ферментационных средах проводили в течение 7 сут. Со 2 по 7 сут каждые 24 ч проводили отбор проб для фильтрации культуральной жидкости через бумажный фильтр. Затем культуральную жидкость использовали для измерения протеолитической активности.

Получение кератиназы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593. Получение ферментного препарата осуществляли путем двухстадийного глубинного культивирования с использованием ферментационной среды, при росте на которой продуцент проявил наибольшую протеолитическую активность. В день накопления максимальной протеолитической активности микромицетом белки осаждали сульфатом аммония из отфильтрованной от биомассы культуральной жидкости (608 г на 1 л культуральной жидкости). После 48 ч инкубации при 4°C белки центрифугировали при 3160 g и 4°C в течение 45 мин в центрифуге LMC-4200R (Biosan, Латвия). Осадки растворяли в 0,01 М Трис-НСl буфере (рН 8,2) и подвергали диализу против 0,005М Трис-НСl буфера (рН 8,2) в течение 24 ч перед повторным центрифугированием в аналогичных условиях. Супернатанты замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Полученные порошки препаратов внеклеточных белков хранили при температуре –20°C. Затем белки препарата разделяли методом изоэлектрофокусирования (по Вестербергу) в градиенте рН амфолинов 3,5–10,0 и плотности сахарозы 0–40% в колонке объемом 110 мл фирмы LKB (Швеция) при напряжении 800 В в течение 36 ч.

Анализ протеолитической активности. Кератинолитическую активность протеаз определяли спектрофотометрически с использованием 1%-ной суспензии кератина шерсти (ТС1, Япония) в 0,05М 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%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), после чего в надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при длине волны 280 нм.

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%-ного раствора казеина по Хаммерштайну в 0,1М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Реакционную смесь инкубировали

при 37°C в течение 10 мин в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-ного раствора ТХУ. Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 275 нм [20].

Способность фермента расщеплять фибрин также оценивали по количеству высвобожденного тирозина. К 100 мкл пробы добавляли 200 мкл 1%-ной суспензии фибрина в 0,05М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-ной ТХУ, далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 275 нм [22].

Для определения коллагенолитической активности в культуральной жидкости использовали суспензию азоколлагена, приготовленного на 0,05М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Реакцию проводили с 200 мкл 0,2%-ного азоколлагена и 100 мкл пробы. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 20 мин в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-ного раствора ТХУ. Затем образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия) перед измерениями оптической плотности при 520 нм.

Для расширения представлений о субстратной специфичности кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 определяли протеолитическую активность с использованием растворов и суспензий в 0,05 М Трис-НСl буфере (рН 8,2) следующих окрашенных белков: азоказеин, эластин-конго красный, кератин-азур и Hide Powder Azure [21].

Условия проведения реакций представлены в табл. 2. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 10%-ной ТХУ, далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости.

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед. в условиях проведения реакции.

Эксперименты проводились 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 $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для оптимизации условий образования кератинолитических ферментов микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 была изучена динамика накопления протеолитической активности при росте продуцента на 10 средах с различными источниками азота (рис. 1, 2). Основными кератин-содержащими отходами сельского хозяйства являются перо и щетина, и они, предварительно очищенные и измельченные, были использованы в составе сред. Перо и щетина являются источником азота, углерода и серы для гриба, однако они относительно труднодоступны из-за особенностей структуры кератина. В связи с этим в среды также добавляли более доступные источники азота – нитрат и гидролизат рыбной муки (ГРМ), углерода – глюкоза, серы – сульфаты.

Максимальные значения кератинолитической активности (96,1 Е) были получены на среде с куриным пером и ГРМ на 6-е сут культивирования (рис. 1, 2), что подтверждает данные о перспективности использования этой среды для получения кератиназ [18].

Также умеренно высокие значения целевой активности были получены на средах со свиной щетиной; с пером, щетиной и нитратом, а также с нитратом и щетиной (рис. 1, 2). Пик кератинолитической активности на среде 3, содержащей только измельченную щетину в качестве источника азота, приходился на 6-е сут культивирования, а на средах 6 и 7 (со свиной щетиной и нитратом и со смесью щетины, пера и нитрата соответственно) – на 3-и сут, однако значения активности при использовании этих сред для роста продуцента достигали лишь 41,0 – 62,5% от активности на среде 8 с нитратом, куриным пером и гидролизатом рыбной муки.

Увеличение количества легкодоступного углерода и азота в ферментационных средах (ГРМ и глюкозы) имело значительное влияние на уровень кератинолитической активности только на среде 8 с перемолотым куриным пером, однако на средах со свиной щетиной такого эффекта не было (рис. 2), но стоит отметить, что пики активности были достигнуты раньше – на 5-е и 3-и сут на 9 (нитрат, щетина, ГРМ) и 10 (нитрат, щетина, перо, ГРМ) средах соответственно.

Таблица 2

Условия проведения ферментативных реакций с окрашенными белками и измерения количества образовавшегося продукта

Субстрат	Концентрация субстрата, %	Состав реакционной смеси			Время проведения реакции, ч	Длина волны для измерения оптической плотности, нм
		Объем субстрата, мкл	Объем пробы, мкл	Объем ТХУ, мкл		
Азоказеин	0,2	200	100	300	0,5	340
Азоколлаген	0,2	200	100	300	6	520
Hide Powder Azure	0,2	200	100	300	6	595
Эластин-конго красный	0,2	200	100	300	24	495
Кератин-азур	2	50	150	200	48	595

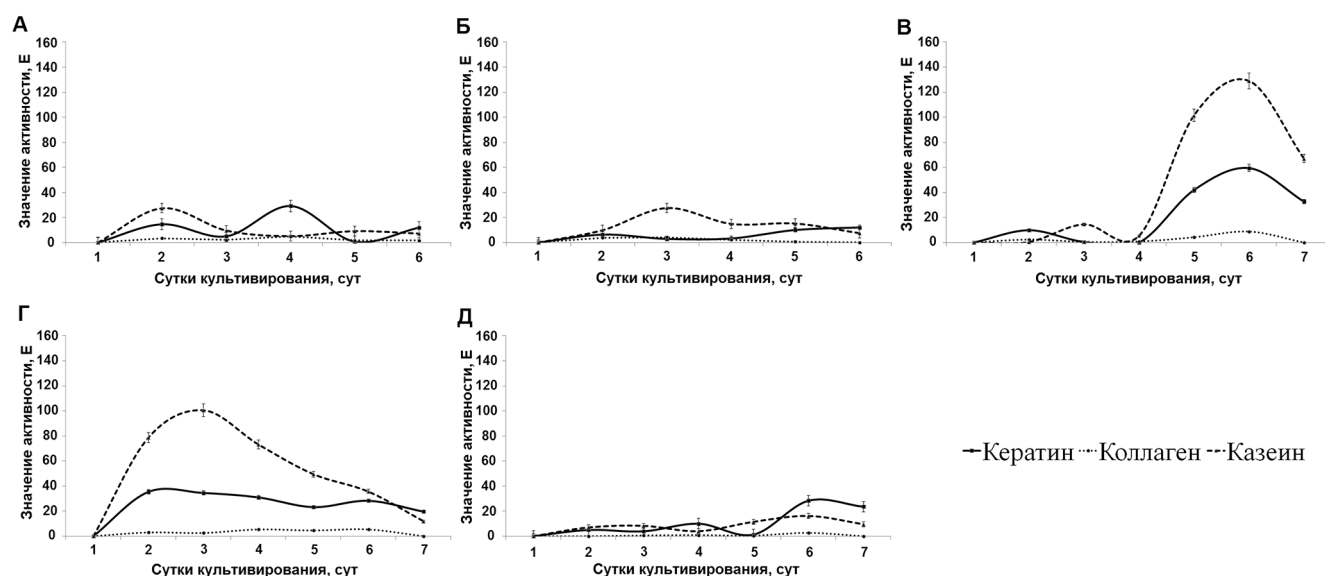


Рис. 1. Динамика накопления внеклеточных протеаз *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на средах: А – среде 1 с нитратом натрия, Б – среде 2 с перемолотым куриным пером, В – на среде 3 с измельченной свиной щетиной, Г – на среде 4 с нитратом натрия и перемолотым куриным пером, Д – на среде 5 с перемолотым куриным пером и измельченной щетиной.

Также положительно на уровень секреции целевых ферментов влияло присутствие нитратов. При сравнении сред 4 и 2 (перо с нитратом и без, рис. 1), 7 и 5 (комбинация пера и щетины с нитратом и без, рис. 1 и 2), видно, что активность на средах с нитратом выше. Кроме того, на среде 7 максимальные значения активности (52,3 Е) наблюдались раньше, чем на среде 5, но в другой паре сравниваемых сред — 4 и 2 — добавление нитрата не ускорило накопление кератиназ, пики активности в обоих случаях приходятся на 6-е сут. На средах 6 и 3 (щетина с нитратом и без него, рис. 1, 2) результаты также отличаются — нитрат дает выигрыш в скорости, но на среде без нитрата более высокие значения активности. При этом на среде 1 (рис. 1), не содержащей органических источников азота, а содержащей только нитрат, пик активности достигается достаточно быстро (на 4-е сут), однако значения активности низкие (менее 30,0 Е).

Полученные данные согласуются с тем, что синтез большинства известных кератинолитических ферментов является индуцибельным. Важно отметить преимущество смешенного по азоту питания *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с наличием легкоусвояемого органического азота для получения кератиназ. Несмотря на способность протеолитических ферментов изучаемого продуцента гидролизовать альфа-кератин, предпочтительным субстратом для роста этого микромицета в глубинных условиях является перо — источник бета-кератина.

Коллаген — самый распространенный белок животных, также широко представлен в отходах животноводства. Однако коллагенолитическая активность у *A. clavatus* ВКПМ F-1593 оказалась

низкой. Максимальные значения активности (33,0 Е) наблюдали на среде с пером и ГРМ на 3-и сут культивирования. Интересно, что на этой же среде были обнаружены максимальные значения кератинолитической активности. На других средах коллагенолитическая активность оказалась пренебрежимо мала (не более 7,0 Е).

Общую протеолитическую активность, являющуюся важной характеристикой для ферментов в сфере биodeградации из-за необходимости гидролизовать не только целевые, но и примесные белки, *A. clavatus* ВКПМ F-1593 оценивали по уровню гидролиза казеина. Максимальные значения активности (129,0 Е) отмечали на среде 3 со свиной щетиной, для которой также была обнаружена высокая кератинолитическая активность. При этом пики активности совпадают и приходятся на 6-е сут.

Также высокая протеолитическая активность обнаружена на средах 7 (111,9 Е), 6 (104,4 Е) и 4 (100,5 Е) — это совпадает с высокими показателями кератинолиза. При этом для сред 6 и 7 пики активности кератинолиза и казеинолиза совпадают, в то время как для среды 4 пик кератинолитической активности приходится на 6-е сут, а казеинолитической — на 3-и сут культивирования. В большинстве случаев на описанных выше средах пики активности кератинолиза и казеинолиза не совпадают, что говорит о проявлении активности разных протеолитических ферментов.

Для дальнейших исследований получали ферментный препарат при культивировании продуцента на среде 8 с ГРМ, куриным пером и нитратом, показавшей наиболее высокие значения кератинолитической активности. Белки культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония,

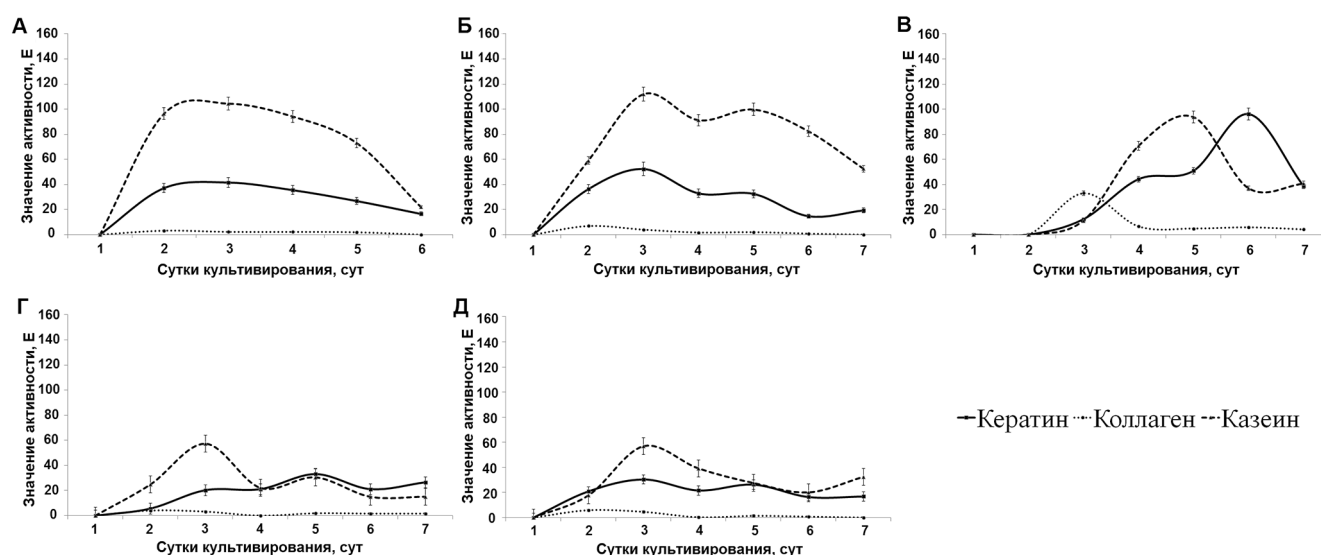


Рис. 2. Динамика накопления внеклеточных протеаз *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на средах: А — на среде 6 с нитратом натрия и измельченной свиной щетиной, Б — на среде 7 с нитратом натрия, перемолотым пером и измельченной свиной щетиной, В — на среде 8 с нитратом натрия, перемолотым куриным пером и гидролизатом рыбной муки, Г — на среде 9 с нитратом натрия, измельченной свиной щетиной и гидролизатом рыбной муки, Д — на среде 10 с нитратом натрия, перемолотым куриным пером, свиной щетиной и гидролизатом рыбной муки.

полученный осадок отделяли от жидкости центрифугированием на холоду и диализовали. Полученный раствор лиофильно высушивали и затем препарат использовали для очистки сериновой щелочной протеазы с рI 9,3, что соответствовало ранее полученным данным [18].

Активность выделенной кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 сравнивали с активностью коммерческой протеиназы К с использованием окрашенных белковых субстратов. Отношения протеолитической активности ферментов, полученной при проведении реакций с различными субстратами, к кератинолитической представлены в табл. 3.

Как видно из результатов, оба фермента не обладали эластолитической активностью, а внеклеточная протеаза *A. clavatus* ВКПМ F-1593 показала более низкие значения фибринолитической активности (1,21), чем протеиназа К (2,52), что могло бы свидетельствовать о большем потенциале изучаемой кератиназы в качестве компонента медицинских препаратов, однако относительные величины ферментативной активности протеазы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с азоказеином (3,52) и Hide Powder Azure (0,75) выше, чем у протеиназы К (1,93 и 0,07 соответственно), и говорят о большей общей протеолитической активности фермента. Это может быть свидетельством большей пирогенности, в то же время столь высокая общая протеолитическая активность является положительным свойством для применения фермента в биодеградаци, так как позволит расщеплять сопутствующие белковые субстраты. Значения активности при проведении реакций с азоколлагеном и кератин-азуром оказались относительно невысокими для обеих протеаз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Safaric R., Fras Zemljic L., Novak M., Dugonik B., Bratina B., Gubelj N., Bolka S., Strnad S. Preparation and characterisation of waste poultry feathers composite fibreboards. *Materials*. 2020;13(21):4964.
2. Nnolim N.E., Udenigwe C.C., Okoh A.I., Nwodo U.U. Microbial keratinase: next generation green catalyst and prospective applications. *Front. Microbiol.* 2020;11:580164.
3. 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;19(11):6681.
4. de Menezes C.L.A., Santos R.D.C., Santos M.V., Boscolo M., da Silva R., Gomes E., da Silva R.R. Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021;37(5):86.
5. Sypka M., Jodłowska I., Białkowska A.M. Keratinases as versatile enzymatic tools for sustainable development. *Biomolecules*. 2021;11(12):1900.

Таблица 3
Протеолитическая активность кератиназы *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 (рI 9,3) и протеиназы К по отношению к различным белковыми субстратам

Субстрат	Отношение протеолитической активности к кератинолитической	
	Кератиназа <i>A. clavatus</i>	Протеиназа К
Азоказеин	3,52	1,93
Азоколлаген	0,34	0,07
Кератин-азур	0,19	0,34
Фибрин	1,21	2,52
Эластин-конго красный	0,05	0,01
Hide Powder Azure	0,75	0,07

Таким образом, была показана возможность получения кератинолитических ферментов при культивировании микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 в глубинных условиях на отходах животноводства – курином пере и свиной щетиной. Выделенная протеаза и описанная ранее [18] по своим свойствам не уступают коммерческому аналогу – грибной кератиназе протеиназе К. Также кератинолитическая протеаза *A. clavatus* ВКПМ F-1593 показала более высокий уровень общей протеолитической активности, что является важным качеством для фермента, нацеленного на использование в области биодеградаци отходов.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00674). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

6. Tamreihao K., Mukherjee S., Khunjamayum R., Devi L.J., Asem R.S., Ningthoujam D.S. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production. *J. Basic Microbiol.* 2019;59(1):4–13.
7. Gong J.S., Ye J.P., Tao L.Y., Su C., Qin J., Zhang Y.Y., Li H., Li H., Xu Z.H., Shi J.S. Efficient keratinase expression via promoter engineering strategies for degradation of feather wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 2020;137:109550.
8. Li Q. Structure, application, and biochemistry of microbial keratinases. *Front. Microbiol.* 2021;12:674345.
9. Liaqat I., Ali S., Butt A., Durrani A.I., Zafar U., Saleem S., Naseem S., Ahsan F. Purification and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* dcs1 for poultry waste processing. *J. Oleo Sci.* 2022;71(5):693–700.
10. 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;107(4):1003–1017.

11. Gupta R., Rajput R., Sharma R., Gupta N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013;97(23):9931–9940.
12. Shestakova A., Lyamina V., Timorshina S., Osmolovskiy A. Patented keratinolytic enzymes for industrial application: an overview. *Recent Pat. Biotechnol.* 2023;17(4):346–363.
13. Kushnirov V.V., Dergalev A.A., Alexandrov A.I. Proteinase K resistant cores of prions and amyloids. *Prion.* 2020;14(1):11–19.
14. Brilhante R.S.N., Lopes R.G.P., de Aguiar L., de Oliveira J.S., Araújo G.D.S., Paixão G.C., Pereira-Neto W.A., Freire R.S., Nunes J.V.S., de Lima R.P., Santos F.A., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G. Inhibitory effect of proteinase K against dermatophyte biofilms: an alternative for increasing the antifungal effects of terbinafine and griseofulvin. *Biofouling.* 2022;38(3):286–297.
15. De Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* 2015;46(2):337–346.
16. 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.* 2021;7(6):471.
17. Qiu J., Barrett K., Wilkens C., Meyer A.S. Bioinformatics based discovery of new keratinases in protease family M36. *N. Biotechnol.* 2022;68:19–27.
18. Timorshina S., Popova E., Kreyer V., Baranova N., Osmolovskiy A. Keratinolytic properties of *Aspergillus clavatus* promising for biodegradation. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;19(21):13939.
19. Тиморшина С.Н., Осмоловский А.А., Александрова А.В. Штамм *Aspergillus clavatus* – продуцент протеолитических ферментов с кератинолитической активностью. Патент РФ № 2774366. Дата выдачи: 17.06.2022.
20. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* 1-1 and *Aspergillus ustus* 1. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016;71(1):62–66.
21. 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 Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(3):178–183.

Поступила в редакцию 05.08.2023

После доработки 28.11.2023

Принята в печать 29.11.2023

RESEARCH ARTICLE

Keratinolytic potential of micromycete *Aspergillus clavatus* VKPM F-1593 and comparison of its enzymes with the commercial keratinase preparation

S.N. Timorshina¹ , E.A. Popova¹ , K.I. Kuleshova¹,
A.K. Akyol^{1, 2}, A.A. Osmolovskiy^{1, *} 

¹Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Faculty of Science, Bursa Uludag University, 16059 Nilüfer, Bursa, Görükle Kampüsü,
*e-mail: aosmol@mail.ru

Animal husbandry is a rapidly developing branch of agriculture, increasing the volume of production annually, and keratin-containing waste (feathers, bristles) make up the majority of all waste from this industry. The development of methods of environmentally friendly processing of such waste to obtain valuable resources (amino acids and oligopeptides) is an important mission of modern science, including biotechnology. One of the ways to dispose of animal husbandry waste that meets modern trends in the development of a green economy is the use of microorganisms and their enzymes. The possibility of obtaining keratinolytic enzymes of *Aspergillus clavatus* VKPM F-1593 under deep conditions with various sources of nitrogen and carbon, including with the growth of the producer on animal waste, was studied. The highest target activity (96.1 E) was achieved using mixed carbon and nitrogen sources: inorganic – sodium nitrate, easily digestible organic – fish meal hydrolysate and hard-to-reach organic – ground chicken feather. Varying the content of various substrates in the composition of fermentation media allowed not only to regulate the level of proteolytic activity, but also to reach the peak of producer activity on different days of cultivation. The specific keratinase activity of *A. clavatus* VKPM F-1593 (pI 9.3) to various protein substrates with the activity of a commercial proteinase K. Both enzymes showed a similar level of activity regarding most of the substrates used. However, protease *A. clavatus* VKPM F-1593 has a greater overall proteolytic activity, which confirms the prospects of this culture for biodegradation of animal waste.

Keywords: *keratinases, keratinolytic enzymes, keratin, Aspergillus clavatus, proteinase K, biodegradation*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-24-00674.

Сведения об авторах

Тиморшина Светлана Наильевна — мл. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: timorshina.svetlana@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2963-4368>

Попова Елизавета Андреевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: e.a.popova1994@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0334-4234>

Кулешова Ксения Игоревна — студентка первого курса магистратуры биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: kulesh-ksu@yandex.ru

Акьол Айдын Кутай (Akyol Aydin Kutay) — студент университета Улудаг, стажер каф. микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: kutayakyol.ka@gmail.com

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>