

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-127

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ КЕРАТИНАЗЫ В ПРОДУЦЕНТЕ *BACILLUS MOJAVENSIS*
PRODUCTION OF RECOMBINANT KERATINASE IN THE PRODUCER *BACILLUS MOJAVENSIS*

Е. А. Якушева¹, Е. А. Шарлаева¹, П. В. Колосов¹, Д. Н. Щербаков^{1,2}¹Алтайский государственный университет, Барнаул²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. КольцовоE. A. Yakusheva¹, E. A. Sharlaeva¹, P. V. Kolosov¹, D. N. Scherbakov^{1,2}¹Altai State University, Barnaul²State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo

✉ elizavetaakuseva85@gmail.com

Аннотация

В связи с ростом животноводства в мире увеличивается количество кератиновых отходов, которые являются концентратом белка. Кератиназы — ферменты, которые разрушают кератин. По различным исследованиям они имеют потенциальное применение в различных областях (производство кожи, моющих средств, фармацевтических препаратов и биомедицина).

Abstract

Due to the growth of animal husbandry in the world, the amount of keratin waste, which is a protein concentrate, is increasing. Keratinases are enzymes that break down keratin. According to various studies, they have potential applications in various fields (leather production, detergents, pharmaceuticals and biomedicine).

Накопление кератинсодержащих отходов связано со структурой кератина. Она характеризуется α -спиральными (α -кератин) и β -складчатыми (β -кератин) пептидными цепочками, которые скреплены между собой большим количеством дисульфидных мостиков. Методы разложения кератина являются трудоемкими и разрушают некоторые эссенциальные аминокислоты, поэтому его деградация микроорганизмами, которые продуцируют кератиназу, имеет огромные преимущества [1].

Кератиназы относятся к классу гидролаз, подклассу пептидаз, подподклассу сериновых или металлопротеаз. Молекулярная масса, оптимальные значения pH и температур фермента имеют широкий диапазон. Механизм действия кератиназы на кератин включает два этапа: сульфитолиз и протеолиз. В результате сульфитолиза происходит разрушение дисульфидных связей. В свою очередь, протеолиз приводит к разрушению кератина до аминокислот.

В качестве природных источников кератиназы выступают бактерии и грибы [2]. Для сверхпродукции кератиназы и уменьшения стоимости экстракции и очистки фермента используются экспрессионные системы *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Pichia pastoris* [3].

Цель работы — получение рекомбинантной кератиназы в продуценте *Bacillus mojavensis* BDV-1.

Аmplификацию гена кератиназы проводили с использованием в качестве матрицы геномной ДНК *B. licheniformis* SCDB 14, полученную нуклеотидную последовательность встраивали в плазмидный вектор pJet1.2/blunt (ThermoFisher Scientific, США). После этого провели трансформацию в клетки *E. coli* Stbl3 (New England Biolabs, США). Нуклеотидную последовательность полученной плазмиды подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Далее ген кератиназы был переклонирован из pJet-Ker по сайтам рестрикции BamHI и AatII в экспрессионные векторы pHT255 и pBSU. Полученными экспрессионными плазмидами трансформировали клетки *Bacillus mojavensis* BDV-1 методом электропорации.

Литература

1. Чиндарева М. А., Казловский И. С., Зинченко А. И. получение штамма *Escherichia coli* — продуцента кератиназы *Bacillus licheniformis* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2021. Т. 13. С. 143–152.
2. Vidmar B., Vodovnik M. Microbial keratinases: enzymes with promising. Biotechnological applications // Food Technol. Biothechnol. 2018. Vol. 56, No. 3. P. 312–328.
3. Чиндарева М. А., Казловский И. С., Казаков Р. В., Зинченко А. И. Создание рекомбинантного штамма *Pichia pastoris* — продуцента кератиназы бактерий *Bacillus licheniformis* БИМ В-800 // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2022. Т. 14. С. 197–208.