

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-287

**ИНТЕГРАЦИЯ В ГЕНОМ *BACILLUS LICHENIFORMIS*  
KH-430 ГЕНА КЕРАТИНАЗЫ\*****INTEGRATION OF KERATINASE  
INTO THE *BACILLUS LICHENIFORMIS* KH-430 GENOME**

Е. А. Якушева<sup>1</sup>, П. В. Колосов<sup>1</sup>,  
Е. А. Шарлаева<sup>1</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

Е. А. Yakusheva<sup>1</sup>, P. V. Kolosov<sup>1</sup>,  
E. A. Sharlaeva<sup>1</sup>, D. N. Shcherbakov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Altai State University, Barnaul

<sup>2</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ elizavetaakuseva85@gmail.com

**Аннотация**

Кератиновые отходы агропромышленного производства представляют угрозу для экосистемы. Их разрушение с помощью таких протеаз, как папаин, пепсин и трипсин, практически не происходит. Кератиназы ценятся во многих биотехнологических процессах благодаря способности расщеплять труднорастворяемые субстраты.

**Abstract**

Keratin waste from agro-industrial production poses a threat to the ecosystem. Their decomposition by proteases such as papain, pepsin, and trypsin is practically nonexistent. Keratinases are valued in many biotechnological processes due to their ability to break down hard-to-degrade substrates.

Кератин обладает сложной физико-химической структурой. В зависимости от вторичной структуры и аминокислотной последовательности его можно разделить на  $\alpha$ - и  $\beta$ -кератины, которые состоят из  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складчатой структуры соответственно. Кератин также можно разделить на мягкий и твердый в зависимости от количества остатков цистеина. Мягкий кератин содержит менее 10 % цистеина, присутствует в эпидермисе кожи. Твердый кератин содержит 10–14 % цистеина и находится в волосах, ногтях, перьях и когтях [1, 2].

В 2020 г. во всем мире было произведено 100,5 млн тонн мяса птицы. Это привело к формированию твердых отходов. Среди большого количества твердых отходов более 4,7 млн тонн составляют куриные перья.

Кератиназы — это класс протеолитических ферментов, которые способны расщеплять кератин. В результате образуются богатые питательными веществами белковые гидролизаты, их продуцентами являются такие бактерии и грибы, как *Candida*, *Aspergillus*, *Streptomyces* и *Bacillus* [2].

Цель работы — получение кератиназы путем интеграции с помощью гомологичной рекомбинации гена в геном *B. licheniformis* Kh-430.

Ген кератиназы был амплифицирован с полученной нами ранее плазмиды pHT255-Ker. Для интеграции использовали гомологичные области 16S, которые фланкировали ген кератиназы с промотором P<sub>GRAC</sub> и ген Cat устойчивости к хлорамфениколу. Праймеры для фрагментов 16S, гена кератиназы с промотором и ген Cat разрабатывали, чтобы ПЦР-продукты имели перекрытия с участками соседних генов. Сборку конструкции проводили с помощью Т4 ДНК-полимеразы, которую затем лигировали с вектором pJet1.2/blunt (ThermoFisher Scientific, США), и проводили трансформацию клеток *Escherichia coli* Top10 (New England Biolabs, США). Полученные клоны подтверждали секвенированием по Сэнгеру. После этого проводили трансформацию *B. licheniformis* Kh-430 методом электропорации. Интеграция в геном проходила по 16S рРНК. Отбор клонов проводили на среде с повышенным содержанием антибиотика хлорамфеникола. Далее проводили оценку активности. Для этого после индукции культуральную жидкость центрифугировали и оставляли надосадочную жидкость, из которой высаливали белок, который растворяли в буфере Tris-HCl (pH 9,0) с добавлением сульфата натрия (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) до конечной

\* Исследование выполнено в рамках «Приоритета-2030» (проект «Продукты и технологии метаболической инженерии»).  
© Е. А. Якушева, П. В. Колосов, Е. А. Шарлаева, Д. Н. Щербаков, 2025

---

концентрации 0,1 % и регенерированного кератина. Полный гидролиз кератина прошел за 4 недели, и активность кератиназы составила  $120 \pm 8$  Е/мл.

### **Литература**

1. Nnolim N. E., Udenigwe C. C., Okoh A. I., Nwodo U. U. Microbial keratinase: next generation green catalyst and prospective applications // Front. Microbiol. 2020. Vol. 11. URL: 10.3389/fmicb.2020.580164 (accessed: 23.07.2025).
2. Moktip T., Salaipeth L., Cope A. E. et al. Current Understanding of Feather Keratin and Keratinase and Their Applications in Biotechnology // Biochem. Res. Int. Vol. 2025, No 1. URL: 10.1155/bri/6619273 (accessed: 23.07.2025).