

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

**ИНТЕГРАЦИЯ В ГЕНОМ *BACILLUS LICHENIFORMIS*
КН-430 ГЕНА КЕРАТИНАЗЫ ***

**INTEGRATION OF KERATINASE
INTO THE *BACILLUS LICHENIFORMIS* KH-430 GENOME**

Е. А. Якушева¹, П. В. Колосов¹,
Е. А. Шарлаева¹, Д. Н. Щербаков^{1,2}

¹Алтайский государственный университет, Барнаул

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

E. A. Yakusheva¹, P. V. Kolosov¹,
E. A. Sharlaeva¹, D. N. Shcherbakov^{1,2}

¹Altai State University, Barnaul

²State 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 трудноразлагаемые субстраты.

Abstract

Keratin waste from agro-industrial production poses a threat to the ecosystem. Their decomposition by proteases such as papa-in, 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 α - и β -кератины, которые состоят из α -спирали и β -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_{GRAC} и ген Cat устойчивости к хлорамфениколу. Праймеры для фрагментов 16S, гена кератиназы с промотором и ген Cat разрабатывали, чтобы ПЦР-продукты имели перекрывания 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 клонны подтверждали секвенированием по Сэнгеру. После этого проводили трансформацию *B. licheniformis* Kh-430 методом электропорации. Интеграция в геном проходила по 16S pPHK. 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 сульфита натрия (Na_2SO_3) 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 ± 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).