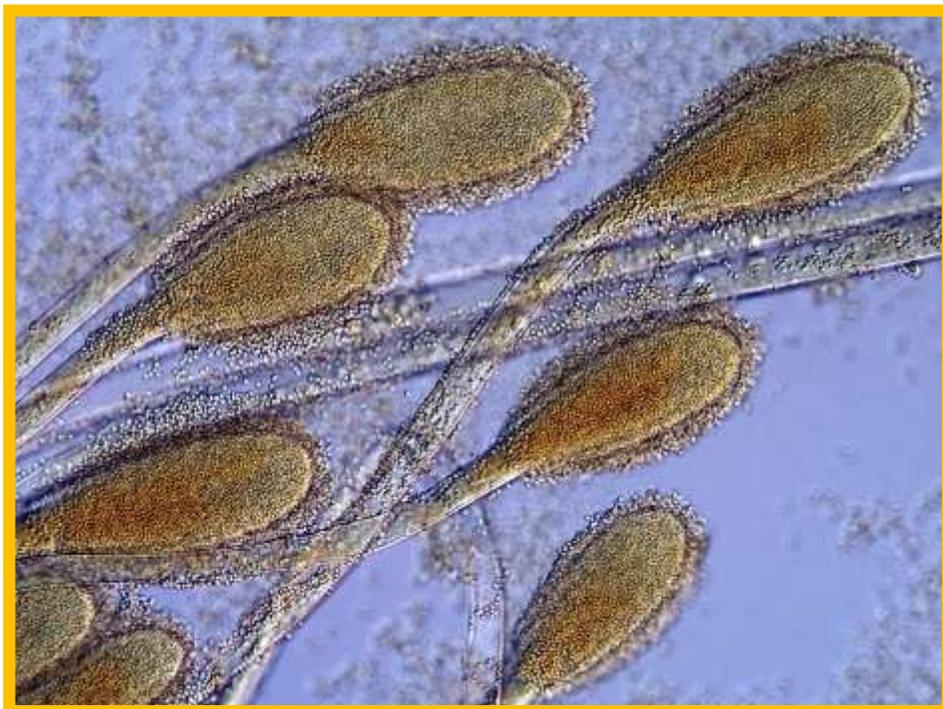


# Образование и свойства кератинолитической протеазы штамма *Aspergillus clavatus* A16



**Исполнитель:**

Кулешова К. И.

Студентка 4 курса

**Руководители:**

К. б. н. Попова Е. А.

Д. б. н., профессор Кураков А.В.

# Разнообразие вариантов применения кератиназ и продуктов гидролиза кератина



Разрушение кератина  
микроорганизмами

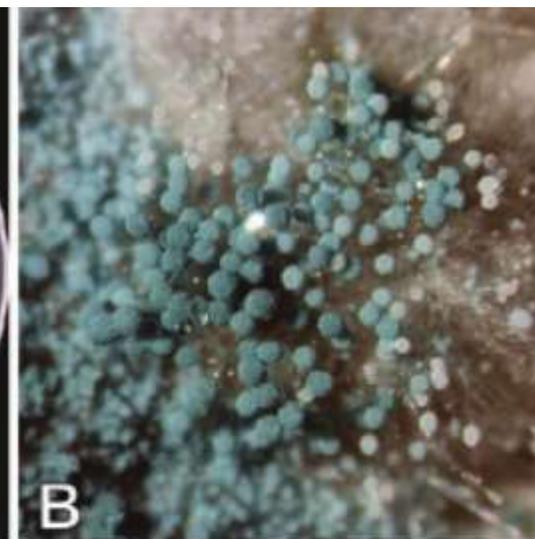
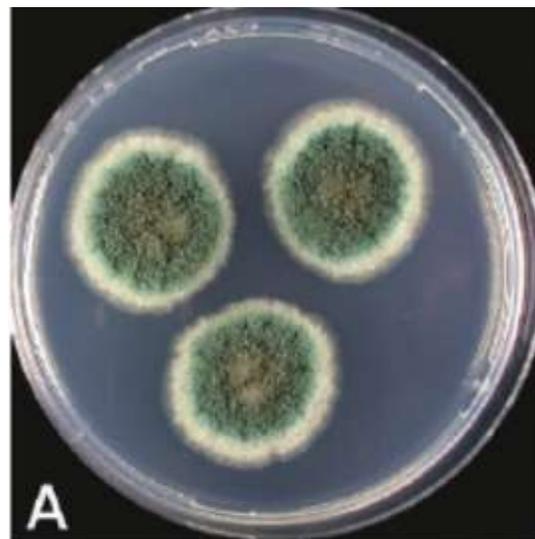


# Цели и задачи

- **Цель** - изучить продукцию кератинолитических ферментов *Aspergillus clavatus* A16 при использовании разных источников азота, выделить фермент и изучить его физико-химические и биохимические свойства.
- **Задачи:**
  - Подобрать оптимальные условия глубинного культивирования штамма *Aspergillus clavatus* A16 для образования кератиназ.
  - Получить комплексный препарат внеклеточных белков с кератиназной активностью *A. clavatus* A16 и разделить его по фракциям методом изоэлектрофокусирования. Охарактеризовать физико-химические и биохимические свойства кератиназы этого штамма.

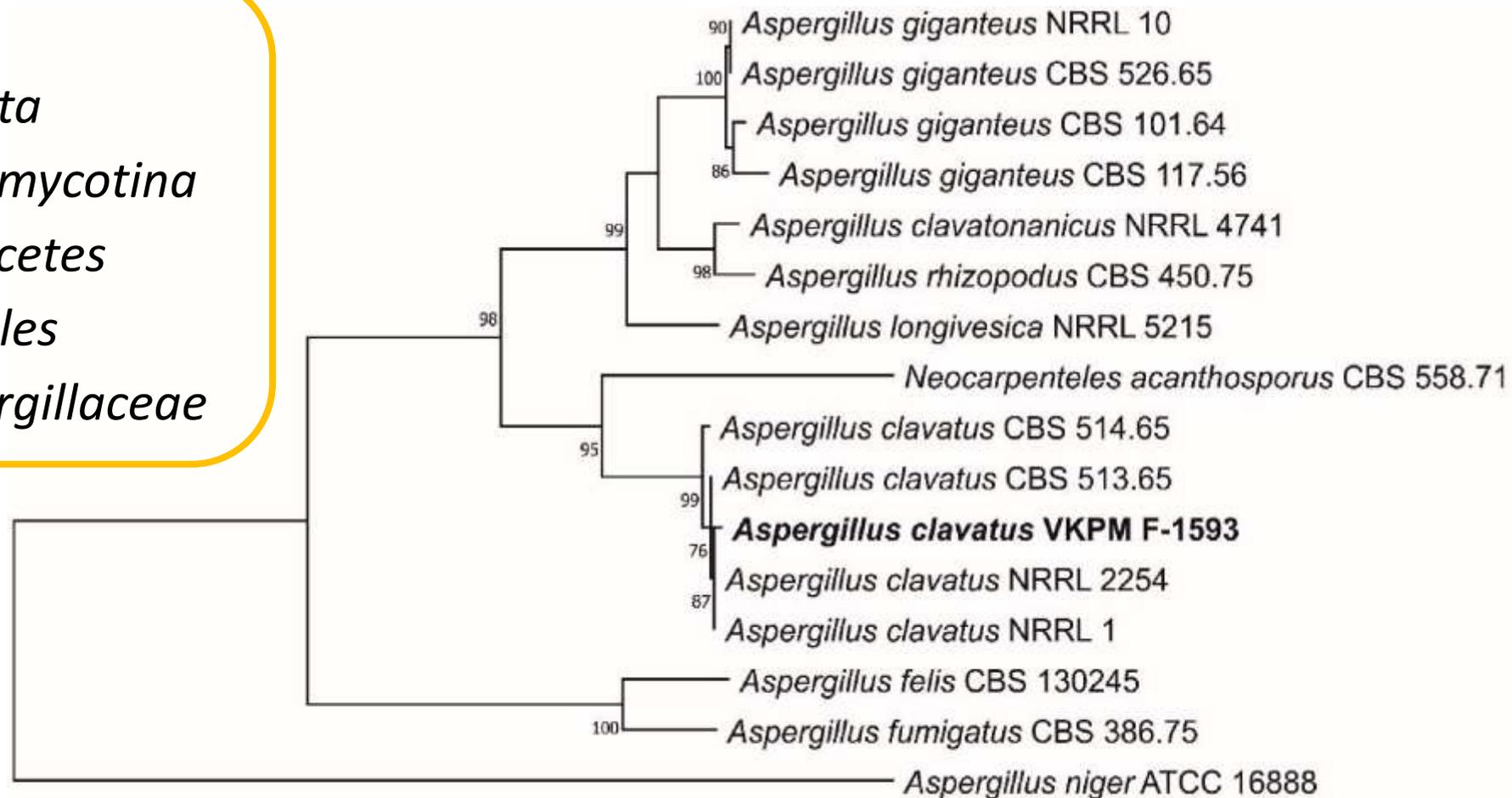
# Материалы и методы

- *Aspergillus clavatus* Desm.
- Штамм А16 (VKPM F-1593)



# Систематическое положение *Aspergillus clavatus* Desm.

- *Fungi*
- Отдел *Ascomycota*
- Подотдел *Pezizomycotina*
- Класс *Eurotiomycetes*
- Порядок *Eurotiales*
- Семейство *Aspergillaceae*



0.02

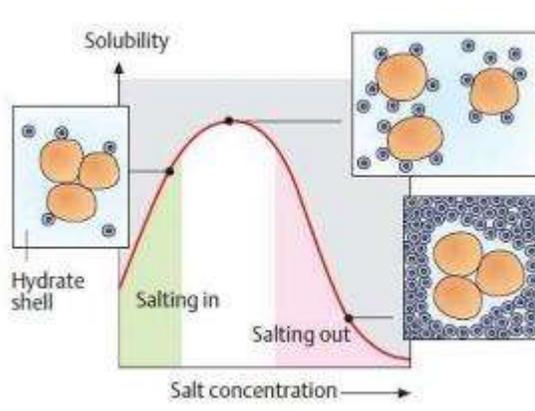
# Состав источников азота и кератинсодержащих субстратов в средах

- 1 –  $\text{NaNO}_3$
- 2 – перемолотое перо
- 3 – измельченная щетина
- 4 –  $\text{NaNO}_3$  и перемолотое перо
- 5 – перемолотое перо и измельченная щетина
- 6 –  $\text{NaNO}_3$  и измельченная щетина
- 7 – перемолотое перо, измельченная щетина и  $\text{NaNO}_3$
- перемолотое перо + ГРМ
- измельченная щетина + ГРМ
- перемолотое перо, измельченная щетина + ГРМ

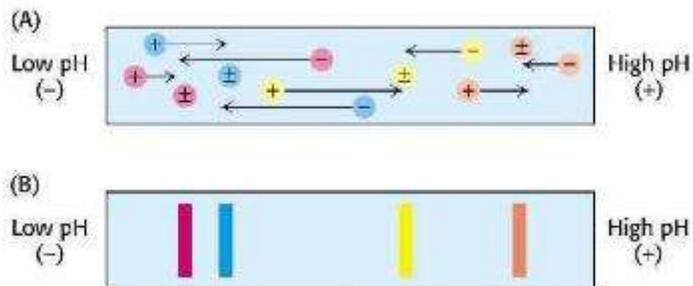


# Изучение биохимических и физико-химических свойств внеклеточных протеаз *Aspergillus clavatus* A16

Выделение белкового препарата  
методом высаливания



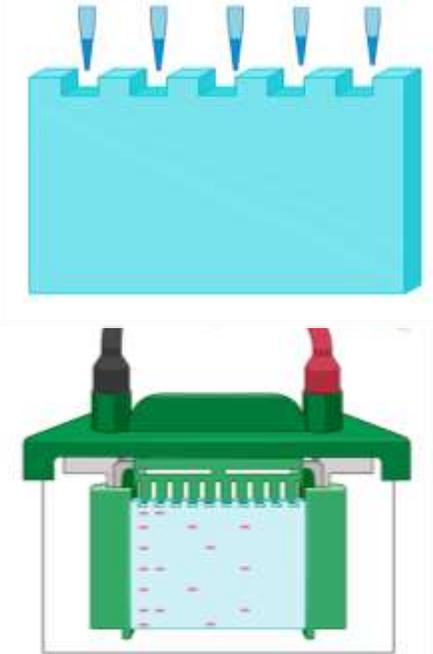
Разделение по фракциям с помощью  
метода изоэлектрофокусирования



Выявление белков методом нативного  
электрофореза по Дэвису

Проверка наличия протеолитической  
активности методом зимографии

Определение молекулярной массы  
кератиназы методом денатурирующего  
электрофореза по Лэммли

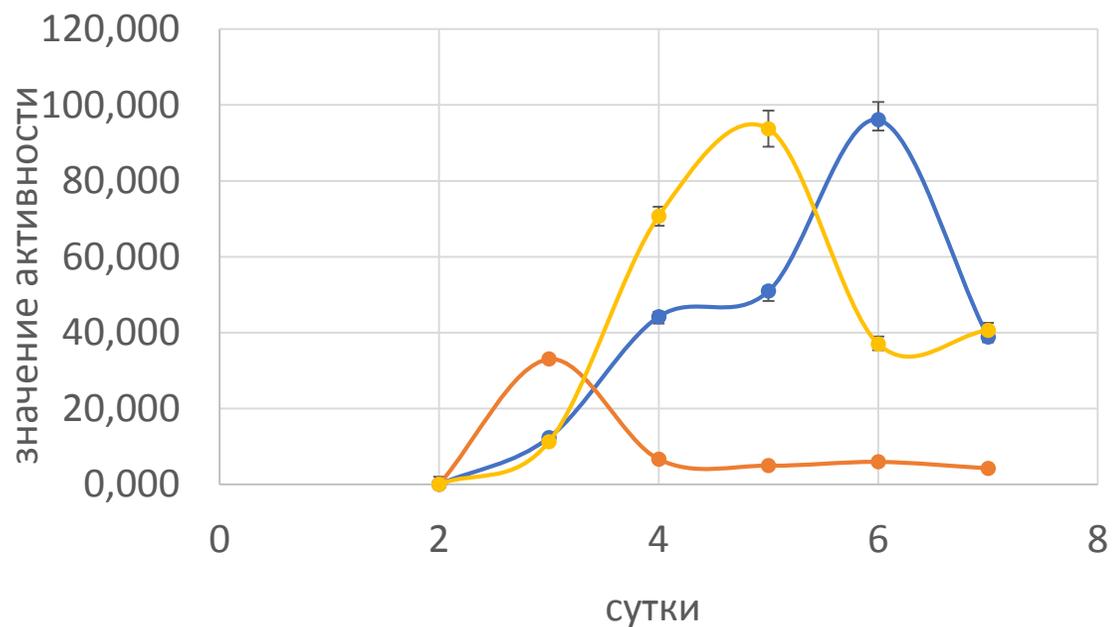


Определение оптимальных pH и температуры для работы  
выделенной кератиназы  
Изучение pH и температурной стабильности выделенной  
кератиназы

Определение углеводного компонента  
выделенной кератиназы

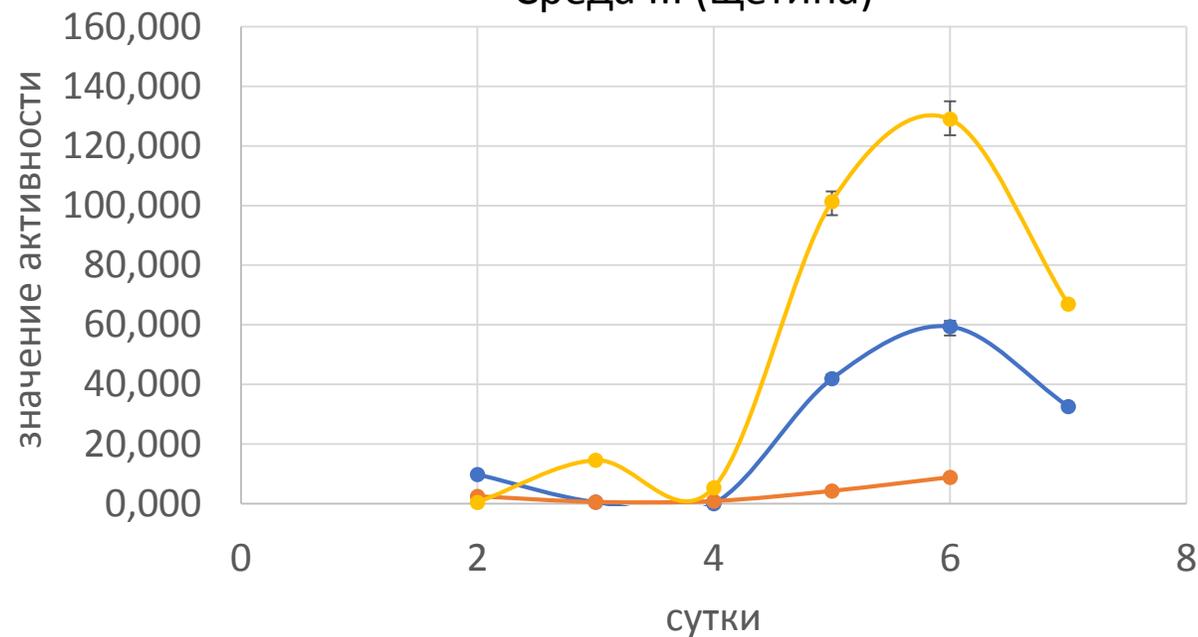
# Динамика накопления протеаз на трех средах с высокими значениями кератинолитической активности

## Перо+ГРМ

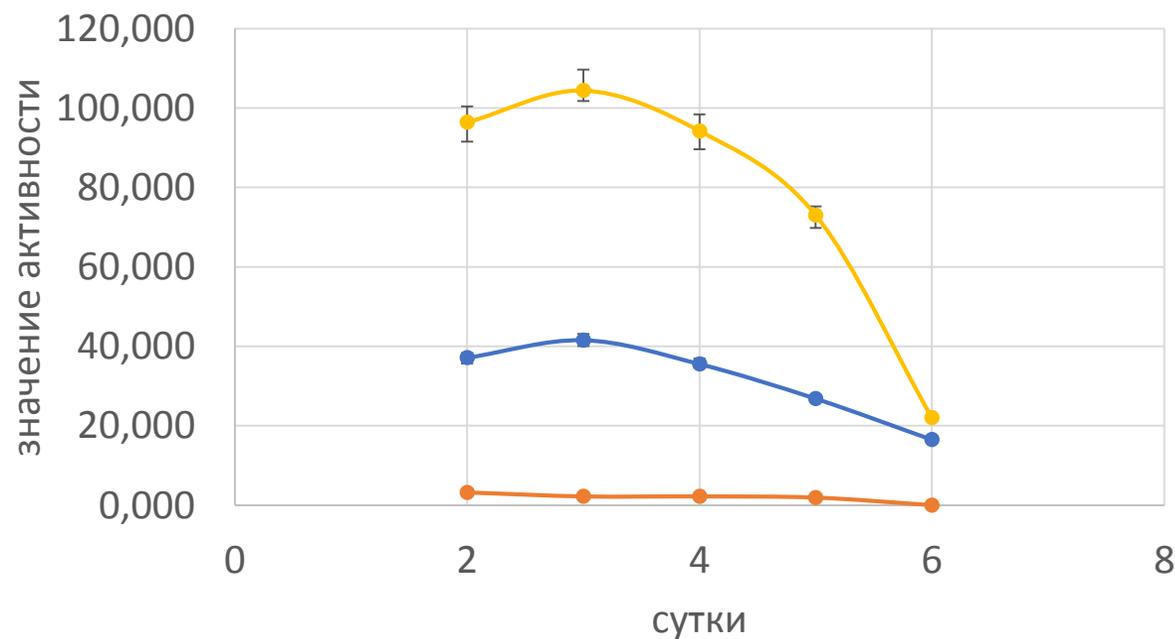


● Кератиназы ● Коллагеназы ● Казеиназы

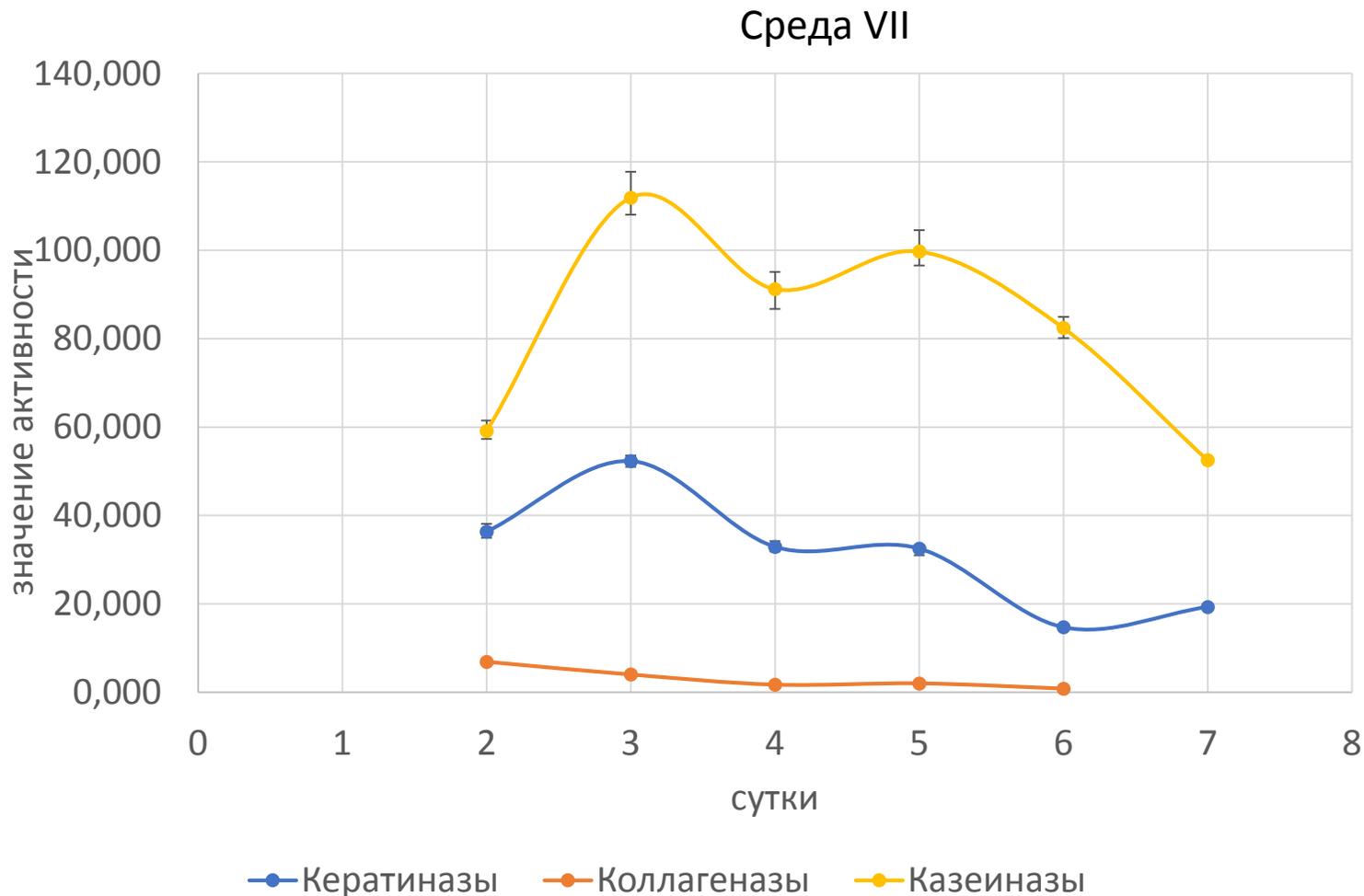
## Среда III (щетина)



## Среда VI (щетина и нитрат)



# Динамика накопления протеаз на приоритетной среде для синтеза кератиназ



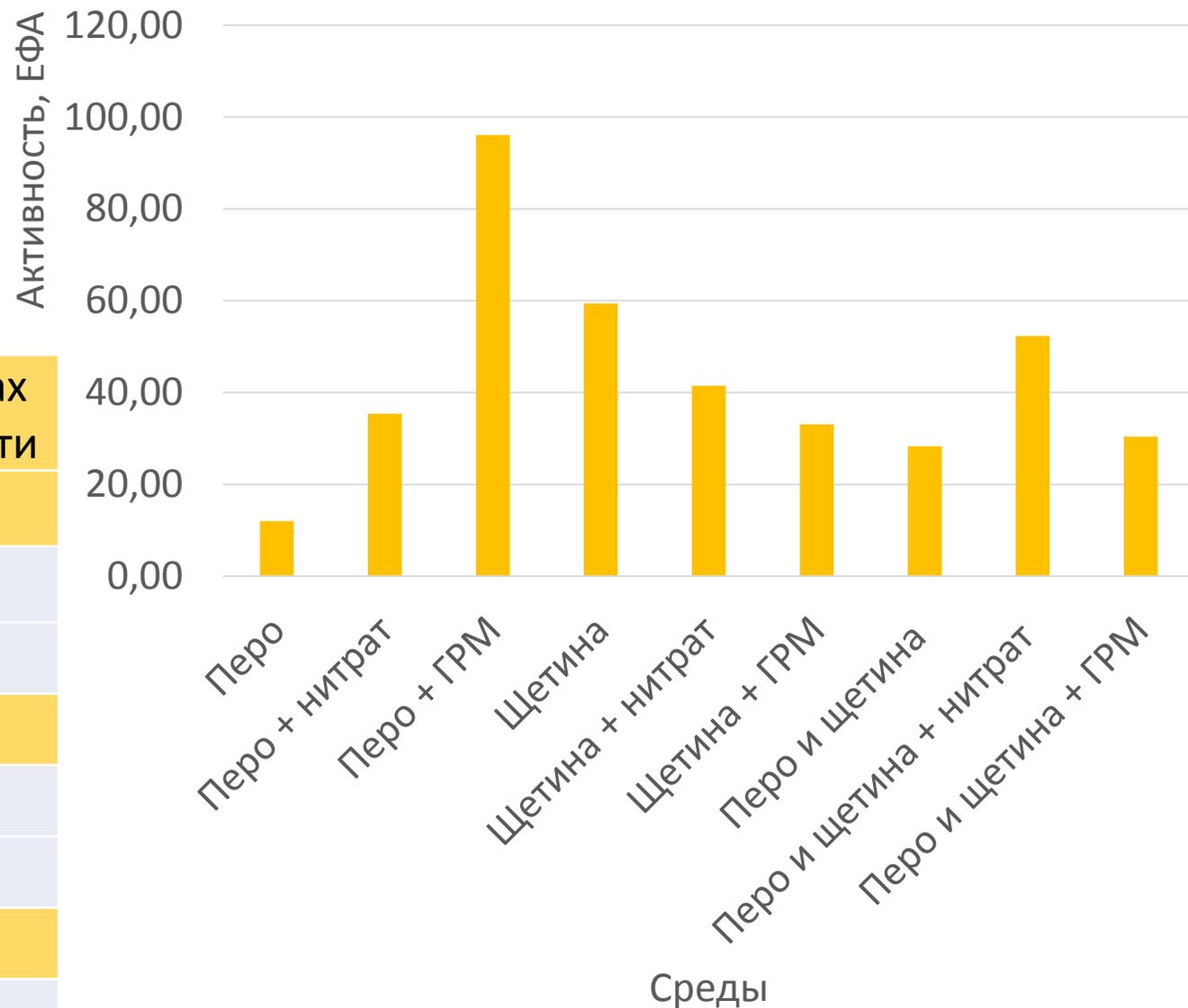
Источники азота

- $\text{NaNO}_3$
- Перемолоте перо
- Измельченная щетина

Пик кератинолитической активности на 3 сутки (52,3 ЕФА)

# Влияние добавок (нитрата и ГРМ) на динамику накопления кератиназ

Источник азота	ЕФА	Сутки max активности
Перо	12,00	6
Перо + нитрат	35,40	2
Перо + ГРМ	96,10	6
Щетина	59,40	6
Щетина + нитрат	41,50	5
Щетина + ГРМ	33,10	5
Перо и щетина	28,30	6
Перо и щетина + нитрат	52,30	3
Перо и щетина + ГРМ	30,40	3
Нитрат	29,15	4

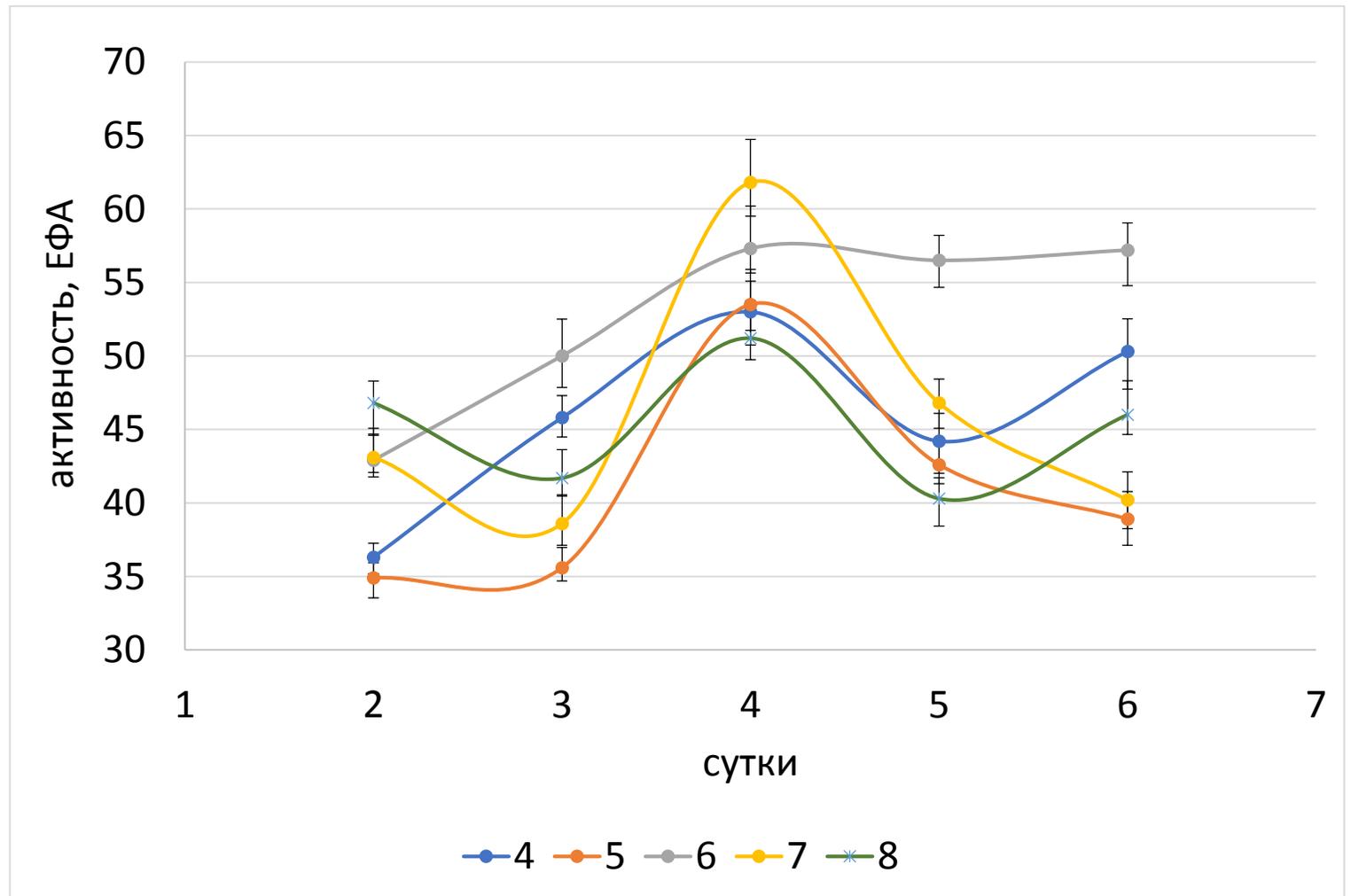


# Динамика накопления кератиназ для определения оптимального начального рН питательной среды для синтеза кератинолитических протеаз микромицетом *A. clavatus* A16

Среда №7:

- $\text{NaNO}_3$
- Перемолотое перо
- Измельченная щетина

Диапазон рН: 4-8  
Максимальные значения активности при рН 7 (61,8 ЕФА)

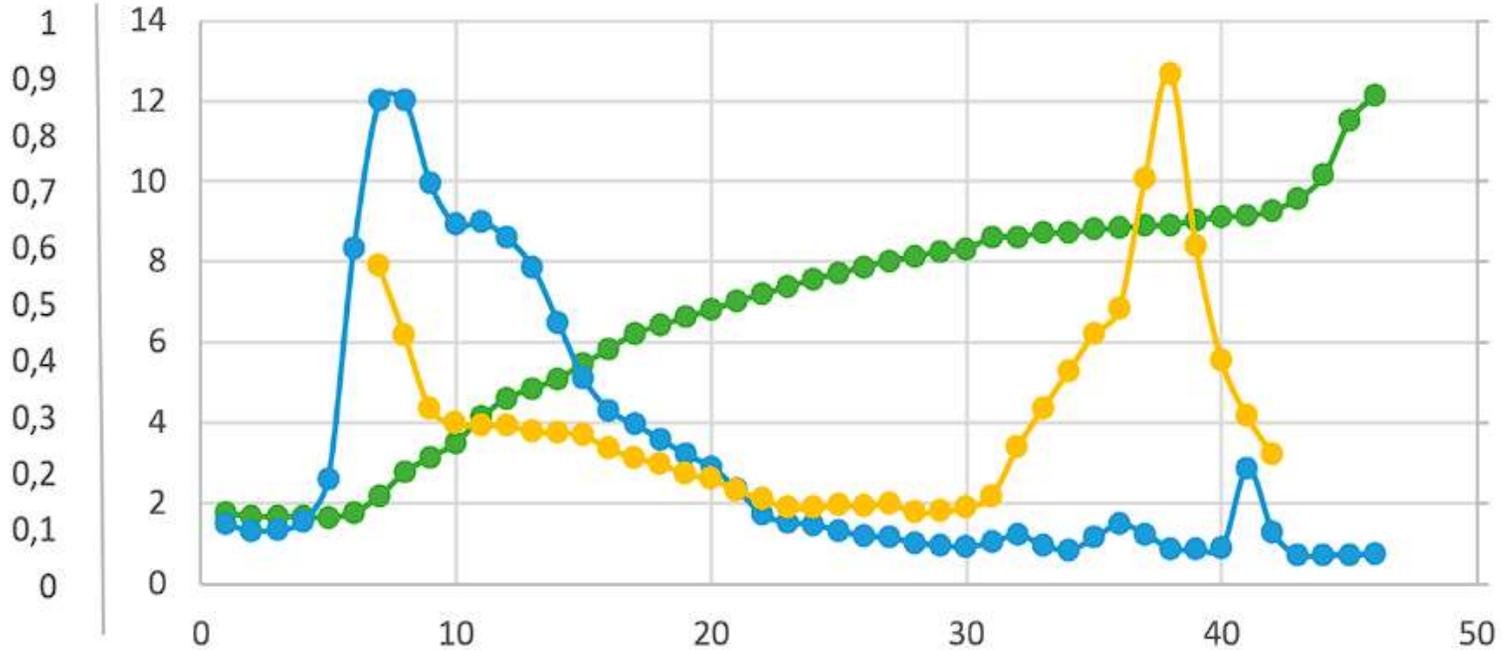


# Разделение по фракциям с помощью метода изоэлектрофокусирования

Изоэлектрическая точка – 9,1

кератинолитическая активность рН

концентрация белка



—●— рН    —●— концентрация белка    —●— кератинолитическая активность

Выявление белков методом нативного электрофореза по Дэвису

Проверка наличия протеолитической активности методом зимографии

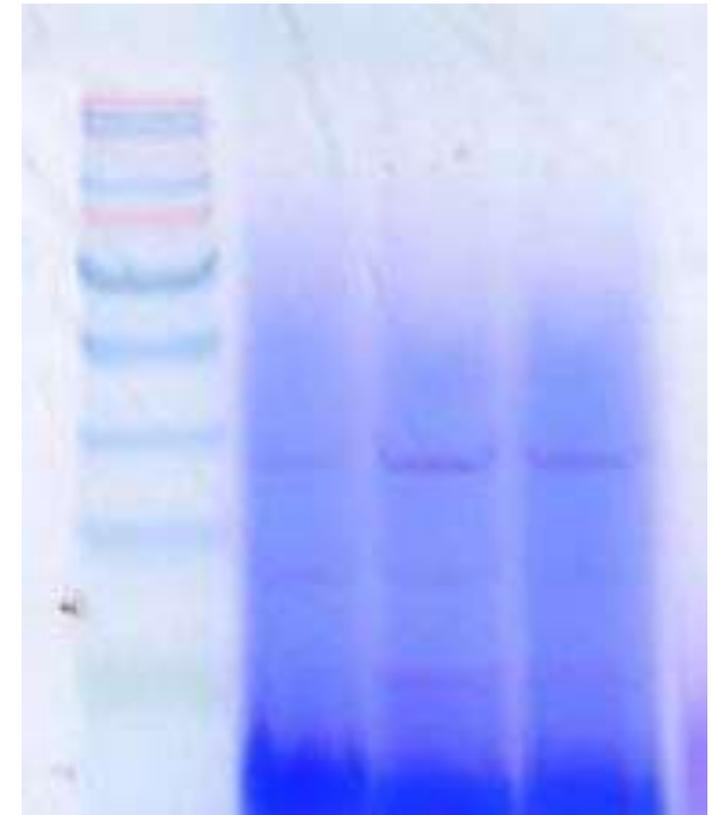
Определение молекулярной массы кератиназы методом денатурирующего электрофореза по Лэммли



Зимография



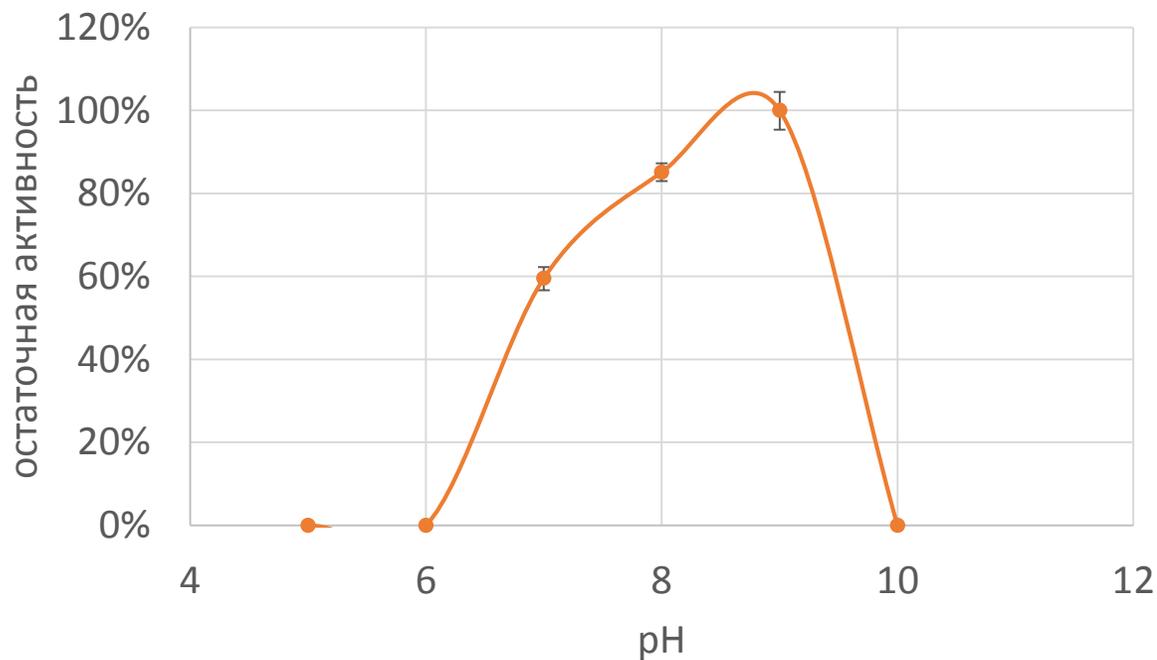
Нативный электрофорез по Дэвису



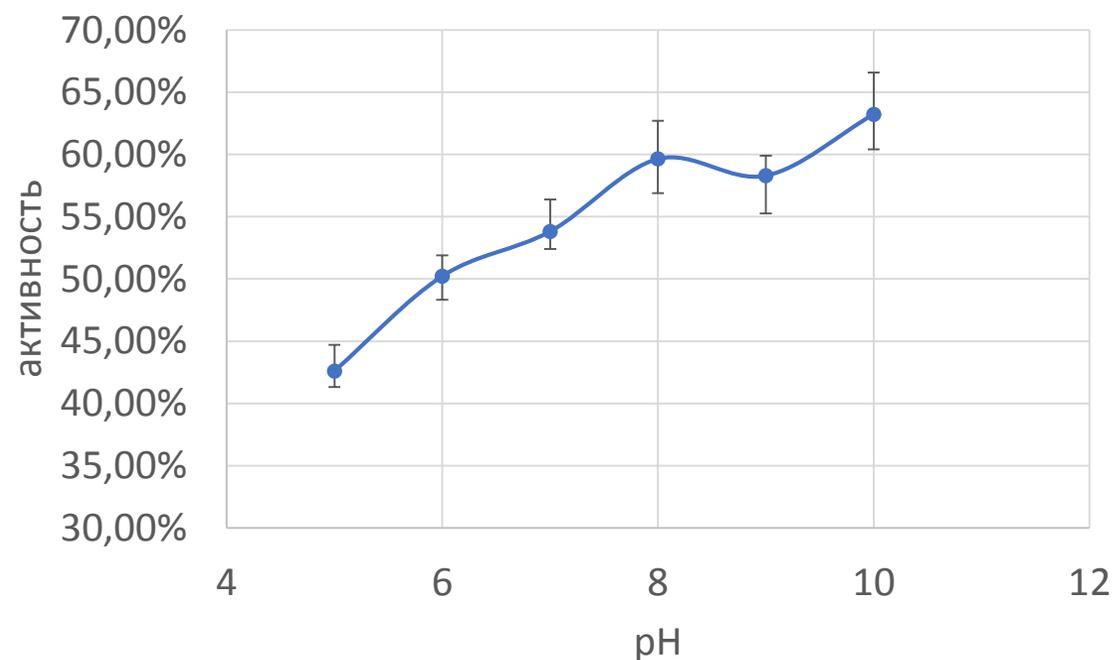
Денатурирующий электрофорез по Лэммли

# рН оптимум активности кератиназы *Aspergillus clavatus* A16 и стабильность фермента при разном рН

рН оптимум



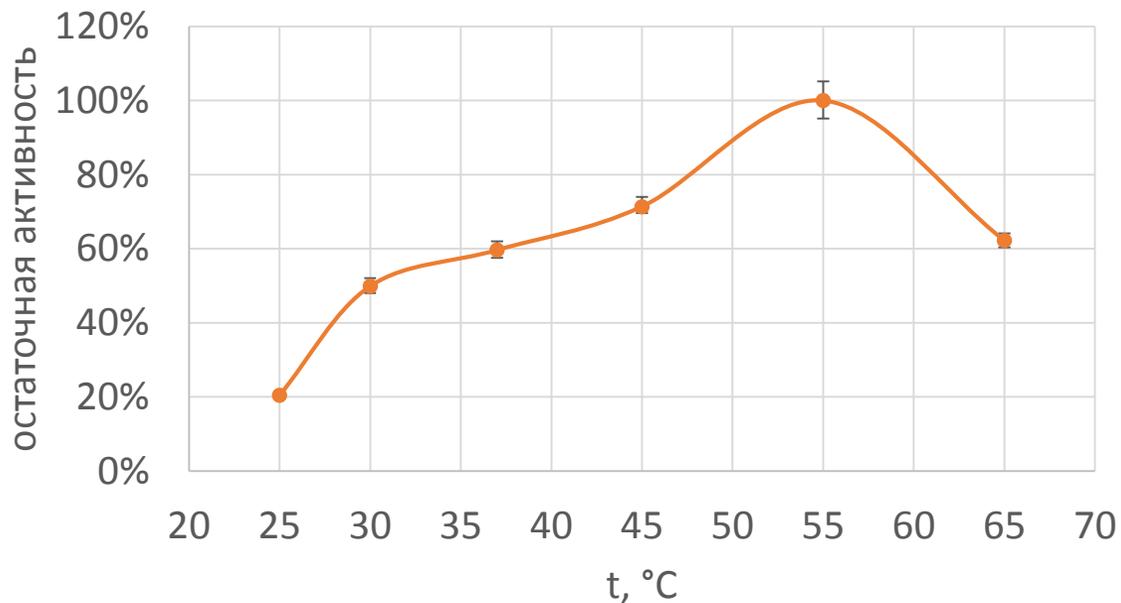
рН стабильность



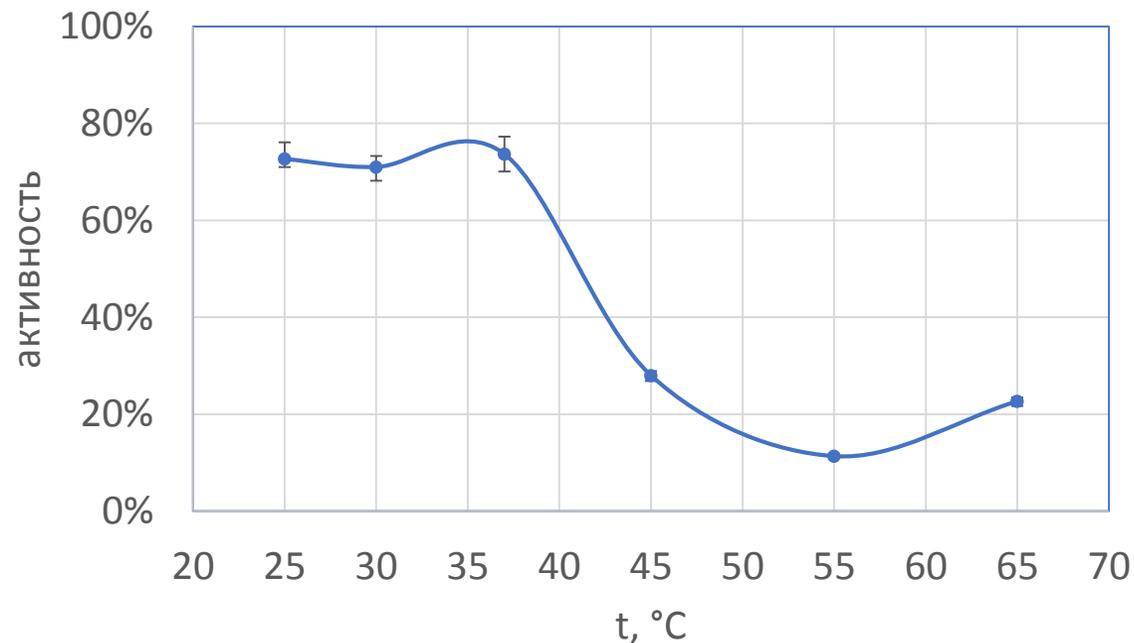
Время инкубации – 2 ч.

# Температурный оптимум активности кератиназы *Aspergillus clavatus* A16 и стабильность фермента при разной температуре

## Температурный оптимум



## Температурная стабильность

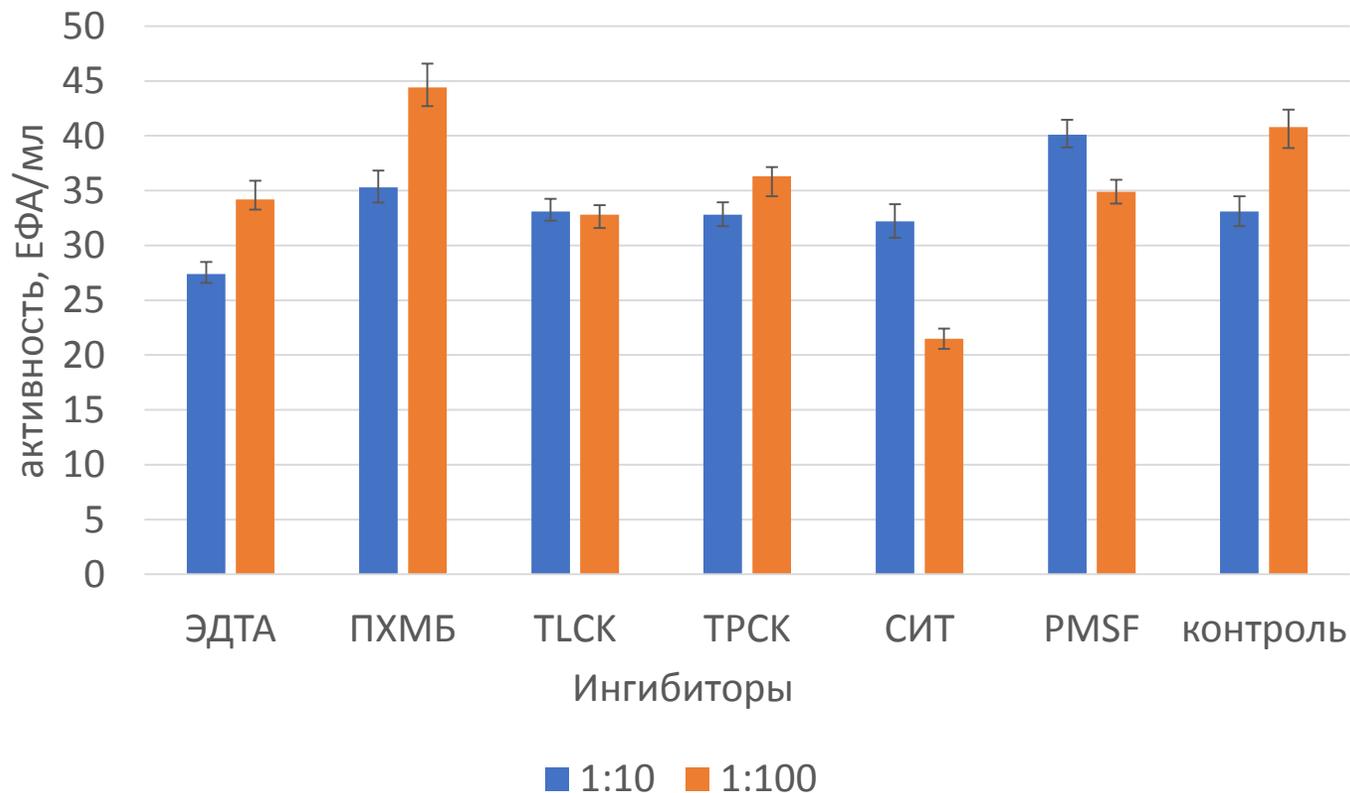


Время инкубации – 2 ч.

# Ингибиторный анализ

Кератинолитическая активность *A. clavatus* A16 при внесении ингибиторов протеаз

Ингибиторный анализ



## Ингибиторы разных классов протеаз

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота	металло
ПХМБ - пархлормеркурийбензоат	цистеиновые
TLCK - N-п-тозил-L-лизин хлорметилкетон	трипсино подобные
СИТ - Соевый ингибитор трипсина	сериновые
TPCK - N-тозил-L-фенилаланин хлорметилкетон	хемотрипсин ы
PMSF - фенилметилсульфонил фторид	сериновые

# Определение углеводного компонента в составе протеазы



БСА

препарат

инвертаза

- Положительный контроль - раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы
- Отрицательный контроль – БСА
- Концентрации 0,5 мг/мл.

Определение гликопротеинов с ШИК – реактивом  
методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах

# Сравнение с известной кератиназой *Aspergillus clavatus* A16

Выделенная нами кератиназа  
(Среда: перо+щетина+нитрат, 3 сутки)

- Молекулярная масса больше 70 кДа
- Изоэлектрическая точка 9,1
- Оптимальная температура 55
- Оптимальное значение pH 9
- Возможно, трипсиноподобная сериновая кератиназа
- Значение активности в изоэлектрической точке 94 ЕФА/мл
- Не гликозилирована

Кератиназа, описанная в статье  
Timorshina et al., 2022

(Среда: перо+нитрат, 4 сутки)

- Молекулярная масса около 27 кДа
- Изоэлектрическая точка 9,3
- Оптимальная температура 50
- Оптимальное значение pH 8
- Сериновая кератиназа
- Значение активности в изоэлектрической точке 37 ЕФА/мл
- Не гликозилирована

Keratinolytic Properties of *Aspergillus clavatus* promising for Biodegradation (Timorshina et al., 2022)

# Выводы

1. Установлен состав сред и некоторые условия глубинного культивирования для штамма *Aspergillus clavatus* A16 для переработки пера и щетины и продукции кератиназы. Максимальная активность кератиназы в культуральной жидкости установлена на 3-4-ые сутки. Скорость накопления кератинолитических протеаз штаммом не существенно менялась в при начальной кислотности среды в диапазоне pH, но наибольшая их активность была при выращивании *A. clavatus* A16 на среде с исходным pH =7.
2. Максимальная активность продукции кератиназы *A. clavatus* A16 достигалась при введении в среду измельченного пера, щетины и нитрата натрия. Культивирование на ней позволит перерабатывать одновременно отходы пера и щетины, и получать при этом большое количество кератинолитических протеаз уже на третьи сутки.

3. Проведены выделение и первичная очистка кератиназы *A. clavatus* A16.

Характеристики выделенной кератиназы:

- Оптимальное значение pH = 9.
- Оптимальная температура 55 °С.
- Фермент сохраняет более 50% активности в диапазоне температур от 25 до 37 °С и значениях pH в диапазоне от 6 до 10.
- Молекулярная масса больше 70 кДа.
- Изоэлектрическая точка 9,1.
- Значение активности в изоэлектрической точке 94 ЕФА/мл.
- Возможно, трипсиноподобная сериновая кератиназа.
- Не гликозилирована.

Спасибо за внимание!



Выражаю благодарность за помощь на всех этапах выполнения работы:

- Научной руководительнице Поповой Елизавете Андреевне, к.б.н.
- Научному руководителю Куракову Александру Васильевичу, д.б.н., профессору
- Рецензенту Котовой Ирине Борисовне, д.б.н., профессору
- Сотрудникам кафедры микологии и альгологии
- Сотрудникам лаборатории, в которой проводилась работа, каф. микробиологии