

УДК 579.222

## НОВЫЕ ШТАММЫ МИКРОМИЦЕТОВ С КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2025 г. С. Н. Тиморшина<sup>а, \*</sup>, Е. А. Ганецкая<sup>а</sup>, А. А. Шестакова<sup>а, b</sup>, В. М. Лямина<sup>а</sup>,  
А. В. Александрова<sup>а</sup>, Е. А. Попова<sup>а</sup>, Г. Б. Адманова<sup>с</sup>, А. А. Осмоловский<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

<sup>б</sup>НИУ “Высшая школа экономики”, Москва, 101000, Россия

<sup>с</sup>Актюбинский региональный университет им. К. Жубанова, Актюбе, 030000, Казахстан

\*e-mail: timorshina.svetlana@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2024 г.

После доработки 27.09.2024 г.

Принята к публикации 01.10.2024 г.

Впервые показана способность микромицета *Tolypocladium inflatum* синтезировать кератинолитические ферменты. 22 штамма микромицетов, выделенных из накопительных культур кератинолитических микроорганизмов, относились к родам *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolypocladium* и *Trichoderma*. Только два штамма показали высокую кератинолитическую активность при глубинном культивировании – *Keratinophyton terreum* C106 (74.2 Е) и *Tolypocladium inflatum* ST1 (87.1 Е). Целевая активность *K. terreum* в глубинной культуре снижалась практически до нуля уже к 7 сут культивирования, тогда как активность *T. inflatum* снижалась менее, чем на 20%. У *T. inflatum* была выделена внеклеточная протеаза с кератинолитической активностью, pI около 5.6 и молекулярной массой около 31 кДа.

**Ключевые слова:** кератиназы, протеазы, мицелиальные грибы, *Tolypocladium inflatum*

DOI: 10.31857/S0026365625020029

Кератиназы – протеолитические ферменты, гидролизующие полипептидную цепь кератина и высоко востребованные в разных отраслях экономики: от переработки отходов до фармацевтики и косметологии (de Menezes et al., 2021). Широкая распространенность процессов, требующих применения кератиназ, ведет к потребности изучения и зачастую конструирования ферментов с различными биохимическими и физико-химическими свойствами. По статистике базы данных PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) с 2020 года ежегодно в мире публикуется более 50 экспериментальных статей о новых источниках кератиназ и модификации уже известных ферментов (запросы для поиска: “keratinase”, “keratinolytic”). Однако большинство таких статей, как и патентов на кератинолитические ферменты, посвящены кератиназам бактериального происхождения (Shestakova et al., 2023). Кератинолитические протеазы грибного происхождения остаются малоизученными, хотя грибы являются известными продуцентами биотехнологически значимых ферментов, в том числе протеаз (El-Gendi et al., 2021). Накопленные данные о грибных кератиназах в большинстве своем

посвящены изучению кератинолитических свойств дерматофитов, применение которых в биотехнологии не может быть широким в связи с патогенностью этих организмов для человека или представителей рода *Aspergillus*, являющихся одними из наиболее часто используемых грибов-продуцентов в промышленности (Bhari, Kaur, 2023). При этом известно, что микромицеты разных таксономических групп способны секретировать протеазы, гидролизующие фибриллярные белки, а pH- и температурный оптимумы и стабильность, субстратная специфичность, резистентность к тяжелым металлам и поверхностно-активным веществам у таких ферментов различны и покрывают широкий спектр условий, благодаря чему применение грибных протеолитических ферментов возможно во многих биотехнологических процессах (Bhari, Kaur, 2023). Также важно, что грибы способны расти на отходах производств в условиях низкой обводненности системы, что снижает расходы на получение целевого продукта (Barríos-González, Tarragó-Castellanos, 2017).

В связи с этим наше исследование было посвящено выделению из природных образцов, богатых

кератиновым субстратом, и изучению новых перспективных для биотехнологического применения штаммов микромицетов с кератинолитической активностью.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение и идентификация культур кератинолитических микромицетов.** Пробы почвы и органического настила отбирали на территориях частных фермерских хозяйств, степной и парковых зонах (Воронежская область, Республика Крым и г. Москва). Пробы использовали в качестве посевного материала для получения накопительных культур кератинолитических микроорганизмов. Основным источником органических углерода и азота служили куриные перья (0.7 г), к которым добавляли 10 мл питательной среды следующего состава (%):  $\text{NaNO}_3$  – 0.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.1,  $\text{MgSO}_4$  – 0.05,  $\text{KCl}$  – 0.05,  $\text{FeSO}_4$  – 0.001, пептон – 0.1. Культивирование проводили в статических условиях при 28°C в течение 1 мес. Затем путем посева последовательных разведений на агаризованную среду Чапека с добавлением смеси антибиотиков (хлортетрациклин и гентамицин) выделяли чистые культуры микромицетов. Первичную идентификацию выделенных культур осуществляли по морфолого-культуральным признакам. При идентификации работали с культурами, посеянными тремя уколами на агаризованные среды, рекомендованные как стандартные для исследуемых групп грибов: среда Чапека с 3% содержанием сахарозы и сусло-агар для *Aspergillus* и *Penicillium*, среда на основе овсяного отвара для *Acremonium*-подобных и *Fusarium* и др. Культуры инкубировали в термостате при 28°C в течение 7–10 сут. Если культуры не формировали спороношения, их выдерживали при дневном освещении и смене температур до образования спор. Для идентификации у культур описывали культуральные признаки: диаметр колоний на 7 сут роста, цвет мицелия и спороношения, характер поверхности колонии, характер реверса, текстуру мицелия, характер роста, характер края колонии, образование пигмента, образование экссудата, запах и т.д.

Для изучения микроскопических признаков и морфометрии структур, связанных с размножением, готовили препараты в концентрированной молочной кислоте, при необходимости подкрашивали красителем Cotton blue. Использовали модифицированный микроскоп МИК-МЕД-6 (“ЛОМО”, Россия). Для идентификации по морфологическим признакам использовали определители, а также статьи, содержащие обработки отдельных родов и описания новых видов (Fungal Biodiversity, 2009; Food and Indoor Fungi, 2010; Houbraken et al., 2011; Bensch et al.,

2012; Crous et al., 2021; Dong et al., 2022). Выделенные культуры перечислены в табл. 1, наименования видов и систематическое положение дано в соответствии с базами данных Index Fungorum (<https://www.indexfungorum.org/names/names.asp>) и The MycoBank Fungal databases (<http://www.mycobank.org>) (по состоянию на 19.09.2024).

Среди выделенных культур микромицетов проводили скрининг для выявления протеолитического потенциала. Для наиболее активных культур микроскопических грибов была дополнительно проведена молекулярно-генетическая идентификация. Геномную ДНК из штаммов грибов выделяли с помощью набора DNEasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Праймеры для ПЦР подбирали для каждой культуры с учетом особенностей таксономического положения (табл. 2).

Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе FT3000 (“GeneMind Biosciences”, Китай). Для анализа секвенов использовали специализированную компьютерную программу BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Последовательности транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 депонировали в базу данных NCBI Genbank под номерами OR018528 (*C. pseudocladosporioides*), OR018407 (*P. sizovae*), OR018406 (*K. terreum*), OR018405 (*T. inflatum*), OR018529 (*A. versicolor*), OR018530 (*A. ochraceus*). Последовательности для филогенетического анализа из базы данных NCBI Genbank анализировали с помощью программы MEGA ver. 10.0 (Kumar et al., 2018). Филогенетическое дерево на основе последовательностей ITS1 и ITS2 было построено с использованием метода максимального правдоподобия и модели Тамура-Нея.

**Определение протеолитического потенциала выделенных культур.** Для определения протеолитического потенциала штаммов, полученных при посеве накопительных культур, проводили двустадийный скрининг на способность культур гидролизовать целевые белки. На этапе первичного скрининга культуры грибов сеяли уколом на агаризованные среды следующего состава (%):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.05,  $\text{MgSO}_4$  – 0.025, пептон – 0.5, агар – 1.5. В качестве основного источника углерода и азота в среды добавляли 1.0% казеина по Хаммерштайну, желатина или эластина, или 0.5% кератина. Культивировали 7 сут при 28°C, а затем осаждали негидролизované белки в средах 10% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и измеряли диаметр колоний ( $d_1$ ) и диаметр зон просветления ( $d_2$ ) для расчета энзиматических индексов (EI) по формуле:  $\text{EI} = d_2/d_1$ .

Культуры, показавшие наибольшие значения EI, были отобраны для вторичного скрининга, который включал в себя двустадийное культивирование штаммов микромицетов в глубинных условиях и измерение ферментативной активности в культуральной жидкости. Культивирование

**Таблица 1.** Штаммы микромицетов, выделенные из накопительных культур кератинолитиков

Штамм	Видовое название	Источник	Место отбора пробы
C1	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	Почва с остатками перьев	Ковыльная степь, Воронежская область
C11	<i>Penicillium sizovae</i> Baghd.		
ST1	<i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams		
ST2	<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	Почва с остатками перьев	Пойма реки Тихая Сосна, Воронежская область
C2w	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.		
C2g	<i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello		
C2y	<i>Trichoderma citrinoviride</i> Bissett		
C8A	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	Подстилка из курятника	с. Пшеничное, Нижегородский район, Крым
C7A	<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church (синоним <i>Emericella sydowii</i> (Bainier & Sartory) Pitt & A.D. Hocking)		
C72L	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. (синоним <i>Emericella versicolor</i> (Vuill.) Pitt & A.D. Hocking)		
C71	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.		
C106	<i>Keratinophyton terreum</i> H.S. Randhawa & R.S. Sandhu (синоним <i>Aphanoascus terreus</i> (H.S. Randhawa & R.S. Sandhu) Apinis)	Подстилка из курятника	с. Укромное, Симферопольский район, Крым
C5	<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church (синоним <i>Emericella sydowii</i> (Bainier & Sartory) Pitt & A.D. Hocking)		
C51	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. (синоним <i>Emericella versicolor</i> (Vuill.) Pitt & A.D. Hocking)		
C66	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> Bensch, Crous & U. Braun		
C41	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	Почва с остатками перьев	Парковая зона, Москва
C4	<i>Penicillium commune</i> Thom		
A1	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.		
A2	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.		
A3	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.		
A4	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.		
G4	<i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx		

проводили при перемешивании на орбитальных качалках (200 об./мин) и 28°C. Сначала споровую суспензию, полученную смывом спор гриба с семидневной культуры на скошенном сусло-агаре или агаризованной среде Чапека, использовали как посевной материал для культивирования в среде, богатой сахарами (%): сусло ячменное неохмеленное – 6.7, глюкоза – 2.0, пептон – 0.1; на 2 сут культивирования 3% полученной культуры по объему переносили в 7 модифицированных жидких сред Чапека, содержащих, помимо стандартного минерального фона, источники азота: нитрат натрия, перемолотое куриное перо и измельченную свиную щетину, а также их комбинации. Кератинолитическую и казеинолитическую активность

измеряли на 3 и 7 сут культивирования. Для культур с наибольшей целевой ферментативной активностью также была определена динамика накопления протеолитической активности.

**Измерение ферментативной активности.** Кератинолитическую активность определяли спектрофотометрически с использованием 1% суспензии кератина шерсти (“ТСІ”, Япония) в 0.05М Трис-НСІ 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 при 600 об./мин в термошейкерах TS-24 (“Biosan”, Латвия). Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10% ТХУ. Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью

**Таблица 2.** Праймеры, использованные при молекулярно-генетической идентификации отобранных культур микромицетов

Культура	Праймеры	Ген/участок ДНК	Ссылки
<i>A. ochraceus</i> ST2	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Домен D1/D2 гена 26S рРНК	Kurtzman, Robnett, 1998
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	Внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2	White et al., 1990
	Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Ген $\beta$ -тубулина	Glass, Donaldson, 1995
<i>A. versicolor</i> C51	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Домен D1/D2 гена 26S рРНК	Kurtzman, Robnett, 1998
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	Внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2	White et al., 1990
	Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Ген $\beta$ -тубулина	Glass, Donaldson, 1995
<i>C. pseudocladosporioides</i> C66	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Домен D1/D2 гена 26S рРНК	Kurtzman, Robnett, 1998
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	Внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2	White et al., 1990
	ACT-512F ATGTGCAAGGCCGTTTCGC ACT-783R TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Ген актина	Carbone, Kohn, 1999
<i>K. terreum</i> C106	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Домен D1/D2 гена 26S рРНК	Kurtzman, Robnett, 1998
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	Внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2	White et al., 1990
<i>P. sizovae</i> C11	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Домен D1/D2 гена 26S рРНК	Kurtzman, Robnett, 1998
	Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Ген $\beta$ -тубулина	Glass, Donaldson, 1995
<i>T. inflatum</i> ST1	NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG NL-4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Домен D1/D2 гена 26S рРНК	Kurtzman, Robnett, 1998
	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	Внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2	White et al., 1990

центрифуги MiniSpin (“Eppendorf”, Германия), после чего в надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при длине волны 280 нм, используя спектрофотометр BioSpectrometer kinetic (“Eppendorf”, Германия). Казеинолитическую активность измеряли по аналогичной схеме.

В качестве субстрата использовали 1% раствор казеина по Хаммерштайну в 0.1М Трис-НСl буфере (рН 8.2). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10% ТХУ. После центрифугирования в надосадочной жидкости

измеряли оптическую плотность при длине волны 275 нм. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0.01 ед. в условиях проведения реакции.

**Получение ферментного препарата и выделение целевой протеазы.** Для получения ферментного препарата из культуральной жидкости, предварительно отделенной от биомассы путем фильтрования, осаждали внеклеточные белки сульфатом аммония при 85% насыщении (608 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  на 1 л культуральной жидкости). Осадок формировался не менее 48 ч при 4°C, затем его отделяли центрифугированием при 3160 g и 4°C в течение 45 мин в центрифуге ЛМС-4200R ("Biosan", Латвия). Полученный осадок растворяли в 0.01M Трис-НСI-буфере (рН 8.2) и диализовали в диализных мешочках (диаметр пор 3.5 кДа) против 0.005M Трис-НСI-буфера на холоде в течение 24 ч на магнитной мешалке. Раствор после диализа центрифугировали в тех же условиях для удаления нерастворимой части осадка. Супернатант замораживали жидким азотом в круглодонной колбе и лиофильно высушивали под вакуумом. Полученный порошок ферментного препарата хранили при температуре –20°C.

Для разделения белков ферментного препарата и их дальнейшего изучения проводили изoeлектрофокусирование (ИЭФ) по методу Вестерберга при 4°C в градиенте рН амфолинов 3.0–10.0 и градиенте плотности сахарозы 0–40% в колонке объемом 110 мл при напряжении 800 В в течение 36 ч. После ИЭФ содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1.5 мл при 4°C с помощью коллектора фракций. Во фракциях измеряли рН, количество белка спектрофотометрически при длине волны 280 нм и ферментативную активность. Чистоту изучаемых ферментов подтверждали методом денатурирующего ПААГ-электрофореза по Лэммли в трис-глициновом буфере (рН 8.3) с концентрацией акриламида в концентрирующем геле 6.0% и в разделяющем геле – 7.5%. Белки разделяли при силе тока 25 мА. После прохождения электрофореза гель инкубировали в фиксирующем растворе (10% уксусной кислоты и 30% изопропанола) в течение 30 мин, а затем окрашивали 0.1% раствором кумасси бриллиантового синего R-250 в растворе 10% уксусной кислоты и 50% изопропанола в течение 30 мин. Для удаления избытка красителя из геля использовали 7%-ю уксусную кислоту.

**Статистический анализ.** Результаты представляли в виде средних абсолютных значений. Эксперименты проводили не менее чем в трех статистических повторностях. Статистическую достоверность данных характеризовали непараметрическим критерием Манна–Уитни при  $p < 0.05$  с использованием пакета Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Идентификация и первичный скрининг новых штаммов микромицетов.** Было выделено и идентифицировано по морфолого-культуральным признакам 22 штамма микромицетов из накопительных культур кератинолитических микроорганизмов, засеянных почвенными образцами, отобранными в курятниках, степной и парковых зонах (Воронежская обл., Республика Крым, г. Москва). Выделенные культуры относились к 8 родам отдела *Ascomycota*, а именно *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolypocladium* и *Trichoderma*. Для определения их протеолитического потенциала проводили первичный скрининг с использованием агаризованных сред, содержащих целевые белки (казеин, кератин, желатин). Значения ЕІ изучаемых культур представлены на рис. 1.

Из всех накопительных культур были выделены представители рода *Fusarium*, однако значения их ЕІ при росте на трех используемых средах значимо не превышали 1. Скорее всего, это свидетельствует о том, что эти грибы в сообществе задействованы не на первом этапе кератинолиза, который требует высокой протеолитической активности и способности гидролизовать нативный кератин (Qiu et al., 2020). Также часто встречающимися среди выделенных грибов оказались микромицеты двух родов – *Aspergillus* и *Penicillium*. ЕІ этих культур на средах с казеином и желатином значительно превышали 1 (максимальные значения ЕІ на казеине (3.76) и желатине (3.75) были получены при росте *Aspergillus versicolor* C72L), что согласуется с данными литературы о перспективности микромицетов родов *Aspergillus* и *Penicillium* в качестве продуцентов протеолитических ферментов (de Souza et al., 2015). Однако лишь пять культур показали высокую кератинолитическую активность, а именно: *Aspergillus ochraceus* ST2 (ЕІ 1.29), *Aspergillus versicolor* C51 (ЕІ 1.24), *Cladosporium pseudocladosporioides* C66 (ЕІ 1.42), *Keratinophyton terreum* C106 (ЕІ 1.43) и *Penicillium sizovae* C11 (1.32). Штамм *Tolypocladium inflatum* ST1 показал умеренную кератинолитическую активность (ЕІ 1.10), однако раньше не было сообщений о способности представителей этого рода гидролизовать кератин. Поэтому *T. inflatum* и 5 наиболее активных культур были отобраны для дальнейших работ.

Для шести отобранных культур микромицетов была дополнительно проведена молекулярно-генетическая идентификация. Анализ специфических последовательностей генов и построение филогенетического дерева подтвердил принадлежность исследуемых штаммов к соответствующим кладам (рис. 2).

Для отобранных штаммов микромицетов также были определены энзиматические индексы на среде

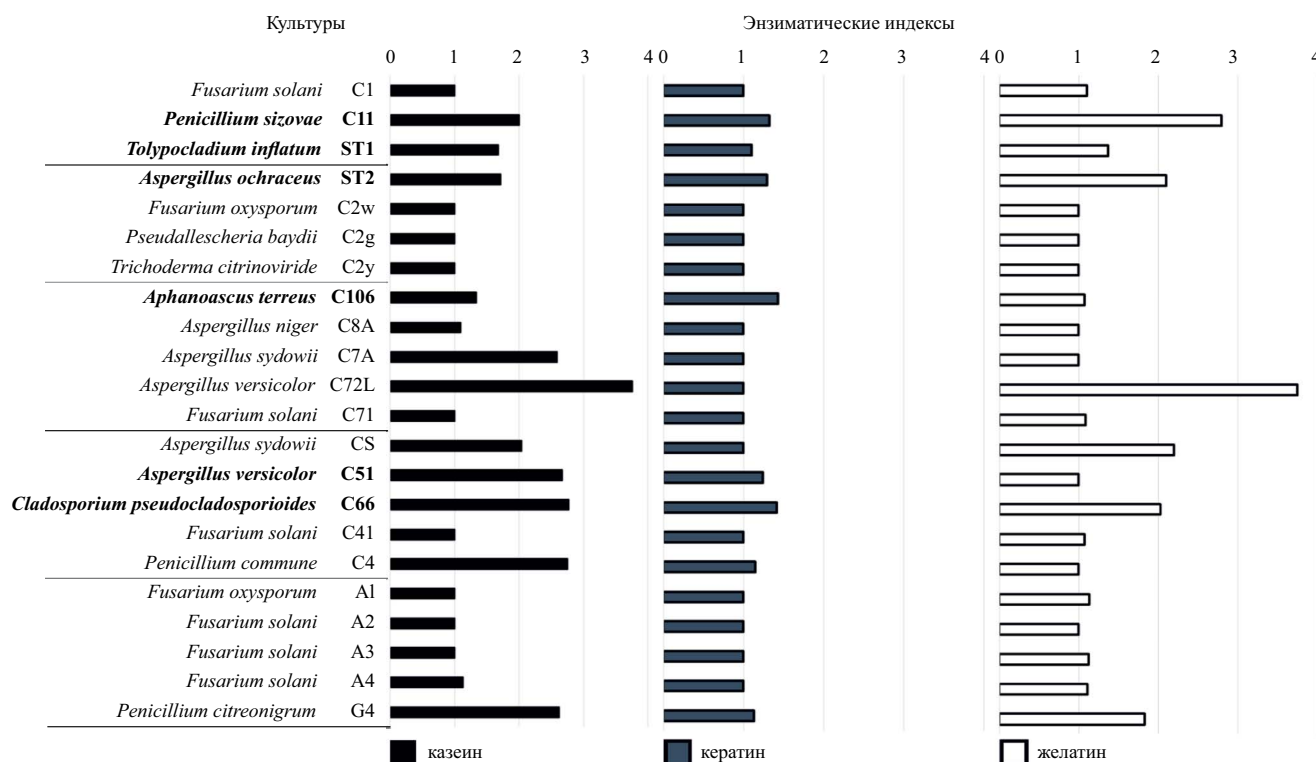


Рис. 1. Энзиматические индексы штаммов микромицетов, выделенных из накопительных культур кератинолитиков.

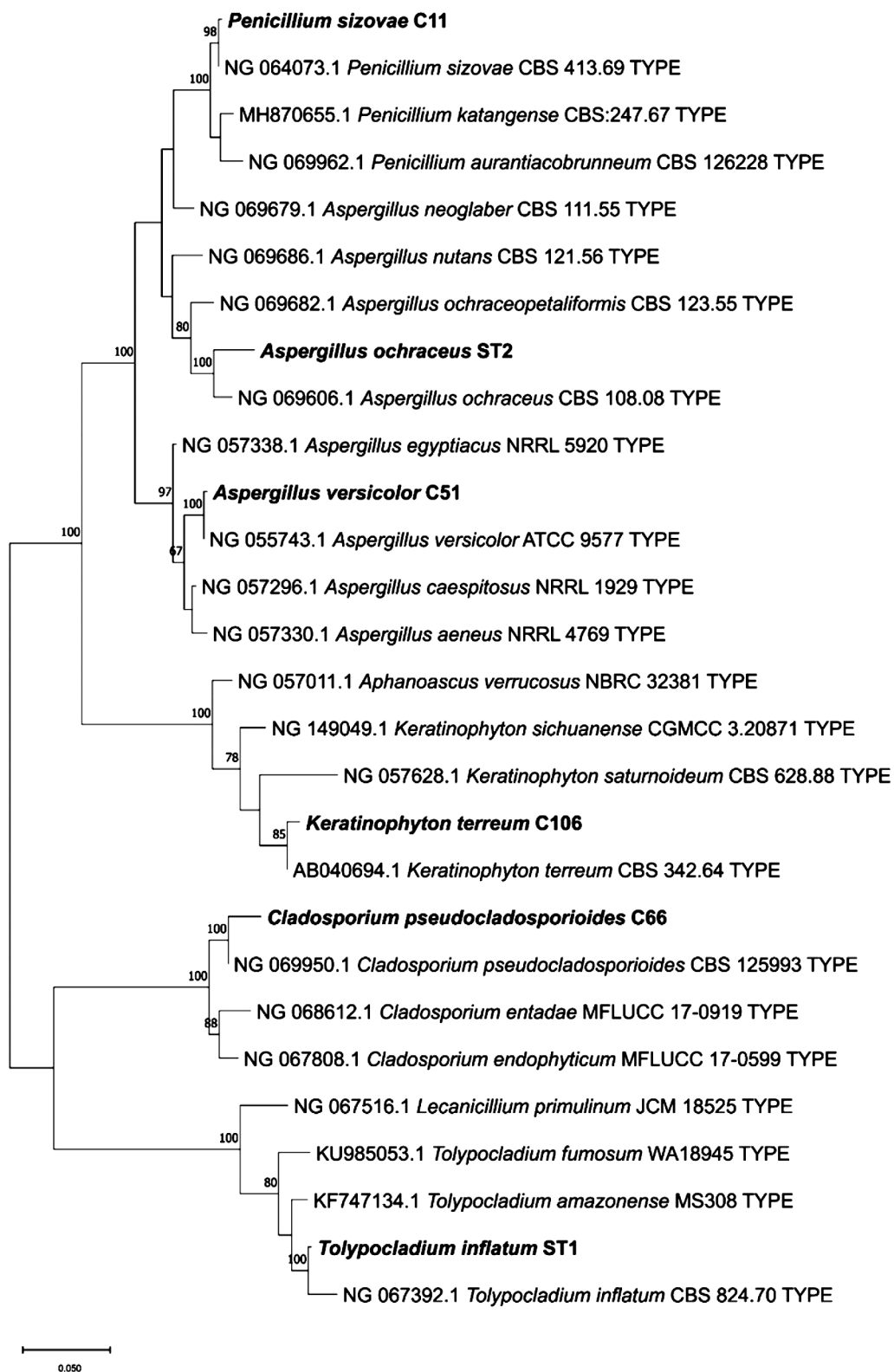
с эластином. Соотношения ЕІ изучаемых культур на средах с кератином, желатином и эластином к ЕІ на среде с казеином представлены в табл. 3.

Соотношения ЕІ на среде с эластином к ЕІ на среде с казеином у всех изучаемых культур ниже 1, что указывает на низкую субстратную специфичность внеклеточных протеаз этих штаммов к эластину. Так как эластолитическая активность обычно рассматривается в качестве фактора патогенности (Kothary et al., 1984; Tamura et al., 1992; Khosravi et al., 2012), то низкое сродство ферментов к эластину можно считать важной характеристикой для продуцентов биотехнологически значимых веществ. Только у двух культур (*A. ochraceus* и *P. sizovae*) соотношение ЕІ на среде с желатином к ЕІ на среде с казеином оказались выше 1. Способность гидролизовать желатин может служить индикатором наличия коллагенолитической активности. Коллагенолитическая активность, в совокупности с кератинолитической, является большим преимуществом в биodeградации и кожевенной промышленности при использовании протеаз для придания мягкости ткани и ее лучшему окрашиванию (Kanth et al., 2008), однако при ферментативном обезволаживании кожи коллагенолитическая активность снижает качество конечного продукта (Fang et al., 2017). Именно поэтому поиск и изучение кератинолитических микроорганизмов,

синтезирующих протеазы с разной субстратной специфичностью, являются важной задачей современной биотехнологии. Соотношение ЕІ на среде с кератином к ЕІ на среде с казеином оказалось выше 1 только у *K. terreus*, что согласуется с данными литературы о том, что представители этого рода являются геофильными грибами, специализирующимися на деградации кератинсодержащих субстратов (Labuda et al., 2021), но, несмотря на это, их протеазы слабо изучены на данный момент.

**Вторичный скрининг культур на способность секретировать кератинолитические ферменты.** Для дальнейшего изучения способности отобранных штаммов секретировать целевые ферменты, их культивировали в глубинных условиях. 7 различных ферментационных сред, являвшихся модифицированной средой Чапека, содержащей  $\text{NaNO}_3$ , перемолотое куриное перо и измельченную свиную щетину, а также их комбинации в качестве источника углерода и азота. Измерения кератинолитической и казеинолитической активности внеклеточных ферментов изучаемых микромицетов проводили на 3 и 7 сут культивирования (рис. 3).

Изучаемые культуры обильно росли в жидких средах в виде мелких пеллет, однако условия проведения культивирования, по-видимому,



**Рис. 2.** Филогенетическая дендрограмма, основанная на последовательностях внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 генов рНК. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия в программе MEGA 10.0. Bootstrap-анализ был выполнен с использованием 1000 повторений. Указаны значения выше 70%.

Таблица 3. Соотношения энзиматических индексов отобранных микромицетов

Культура	ЕI <sub>ксп</sub> ЕI <sub>каз.</sub>	ЕI <sub>жсл</sub> /ЕI <sub>каз.</sub>	ЕI <sub>эл.</sub> /ЕI <sub>каз.</sub>
<i>A. ochraceus</i> ST2	0.75	1.23	0.58
<i>A. versicolor</i> C51	0.46	0.37	0.19
<i>C. pseudocladosporioides</i> C66	0.51	0.73	0.18
<i>K. terreum</i> C106	1.07	0.80	0.75
<i>P. sizovae</i> C11	0.66	1.40	0.50
<i>T. inflatum</i> ST1	0.66	0.82	0.60

не подходили для накопления целевых внеклеточных протеаз культурами *C. pseudocladosporioides* и *P. sizovae*. Максимум кератинолитической (32.1 Е) и казеинолитической (75.0 Е) активности микромицета *A. ochraceus* приходился на 7 сут культивирования на среде, содержащей измельченную щетину в качестве единственного источника азота. А штамм *A. versicolor* проявлял кератинолитическую активность только на 7 сут на средах с нитратом (30.7 Е), нитратом и перемолотым пером (19.0 Е), а также нитратом и измельченной щетиной (33.2 Е), что говорит о необходимости наличия минерального азота в питательной среде при синтезе внеклеточных кератиназ этой культурой.

Наибольшие значения целевой активности были получены при культивировании *K. terreum* и *T. inflatum*. Максимальный уровень кератинолитической (74.2 Е) и казеинолитической (94.4 Е) активности *K. terreum* был получен при росте продуцента на среде с нитратом натрия и перемолотым куриным пером на 3 сут культивирования. Активность снижалась практически до нуля уже к 7 сут культивирования. Штамм *T. inflatum* проявил наибольшую кератинолитическую (87.1 Е) и казеинолитическую (167.1 Е) активность уже на 3 сут культивирования на среде, содержащей только органические источники азота и углерода — перемолотое куриное перо и измельченную свиную щетину. Помимо того, что именно эта культура показала самые высокие значения целевой активности, уровень ее ферментативной активности к 7 сут культивирования снизился менее, чем на 20%. В связи с этим дальнейшая работа проводилась с микромицетом *T. inflatum*.

Важно отметить, что результаты вторичного скрининга наглядно показывают, что данные, получаемые при скрининге на агаризованных средах, можно считать лишь ориентировочными, позволяющими отобрать потенциально перспективных продуцентов для дальнейших исследований. Однако результаты скрининга на агаризованных средах не могут служить основанием для однозначной количественной оценки активности микроорганизма. Все культуры, отобранные на этапе первичного скрининга, показали обильный рост в жидких средах, в том числе при

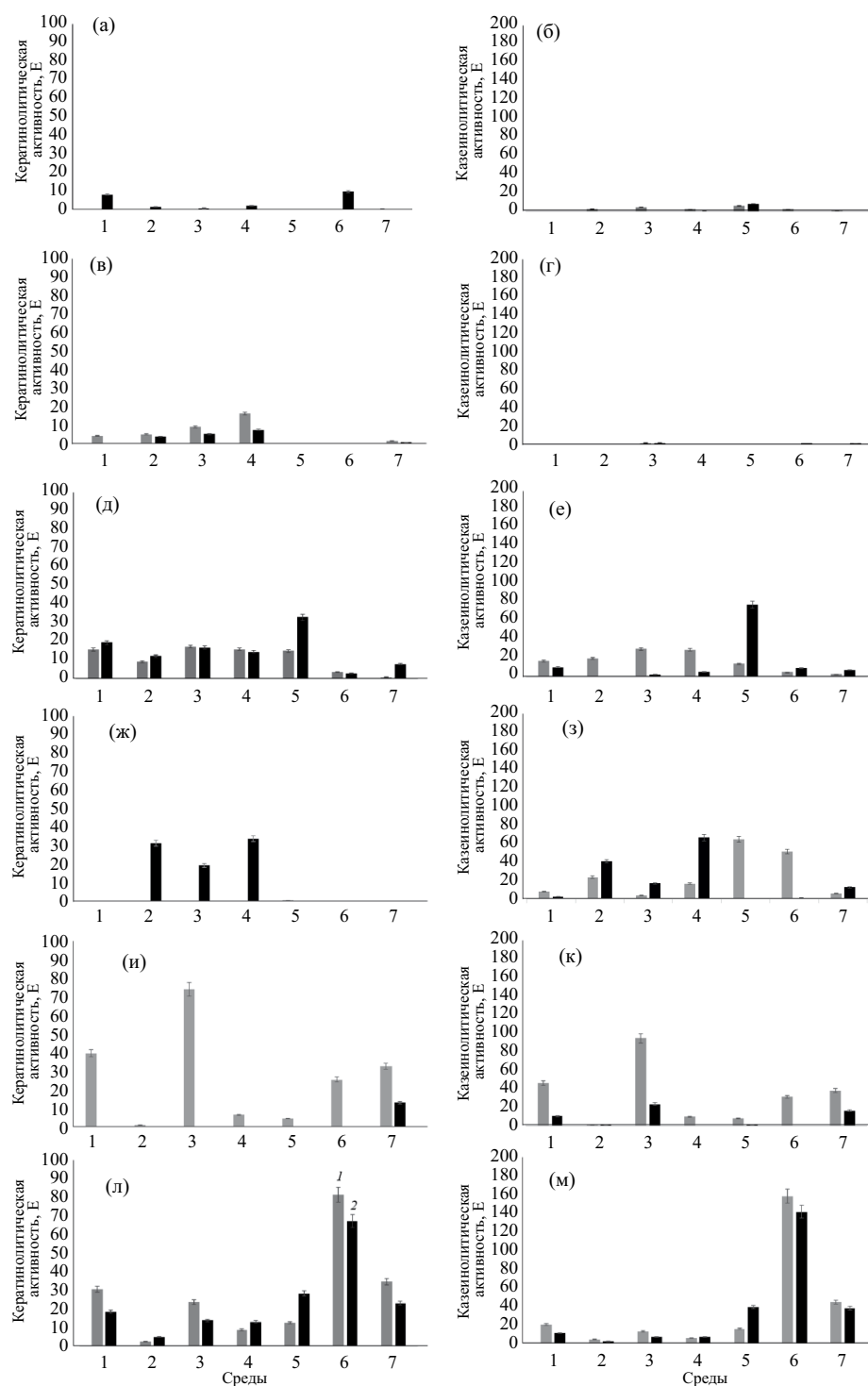
использовании кератинсодержащих субстратов. Но в то же время активность этих культур при глубинном культивировании не была пропорциональна их активности при поверхностном культивировании на агаризованных средах. Это связано с особенностью физиологии изучаемых объектов. Некоторым штаммам необходимы определенные компоненты в составе среды для синтеза и секреции целевых продуктов; такие компоненты не всегда входят в состав стандартных сред, и не всегда получается их подобрать с первого раза — это трудоемкий процесс. А некоторые культуры способны к синтезу определенных ферментов лишь в определенных условиях, к которым может относиться и определенный тип культивирования, что порой делает невозможным наработку целевого продукта в конкретных условиях проведения эксперимента (Oda et al., 2006).

**Особенности накопления внеклеточных кератинолитических ферментов микромицетом *T. inflatum*.** Изучение динамики накопления целевых протеаз *T. inflatum* на ферментационной среде с перемолотым куриным пером и измельченной свиной щетиной показало, что максимум кератинолитической активности (78.8 Е) приходится на 4 сут культивирования. Важно отметить, что уже ко 2 сут роста продуцента кератинолитическая активность достигает более 50% от максимального уровня, а снижение целевой активности к 8 сут культивирования незначительно — менее 15% (рис. 4).

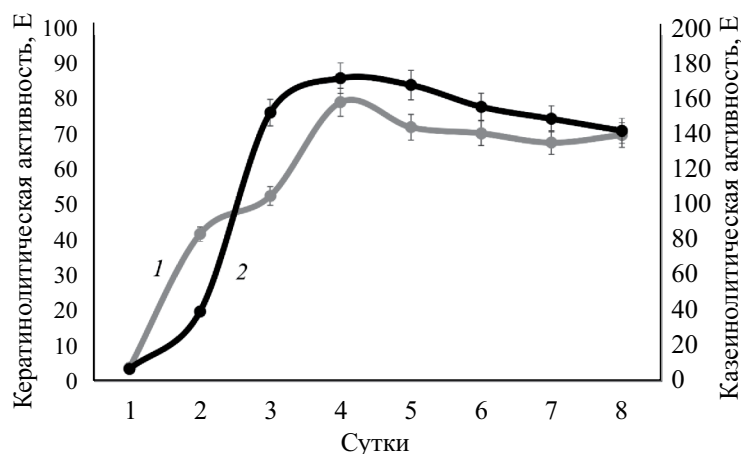
Профиль динамики накопления секретируемых казеинолитических ферментов штамма *T. inflatum* совпадал с таковым для кератинолитической активности. Для получения ферментного препарата высаливали внеклеточные белки *T. inflatum* в условиях достижения наибольшей целевой протеолитической активности. Полученный лиофильно высушенный ферментный препарат, растворенный в 0.05 М Трис-НСl буфере (рН 8.2) в концентрации 1 мг/мл, обладал кератинолитической активностью (82.1 Е) и казеинолитической активностью (201.5 Е).

**Выделение кератинолитической протеазы *T. inflatum*.** Белки полученного ферментного препарата разделяли методом колоночного изоэлектрофокусирования в градиенте рН амфолинов 3.0–10.0





**Рис. 3.** Протеолитическая активность изучаемых микромицетов на средах, содержащие различные источники азота: *C. pseudocladosporioides* C66 – кератинолитическая (а) и казеинолитическая (б) активность; *P. sizovae* C11 – кератинолитическая (с) и казеинолитическая (д) активность; *A. ochraceus* ST2 – кератинолитическая (е) и казеинолитическая (ф) активность; *A. versicolor* C51 – кератинолитическая (г) и казеинолитическая (х); *K. terreum* C106 – кератинолитическая (и) и казеинолитическая (j); *T. inflatum* ST1 – кератинолитическая (к) и казеинолитическая (л). Источники азота в средах: 1 – нитрат натрия, перемолотое перо и измельченная щетина; 2 – нитрат натрия; 3 – нитрат натрия и перемолотое перо; 4 – нитрат натрия и измельченная щетина; 5 – измельченная щетина; 6 – перемолотое перо и измельченная щетина; 7 – перемолотое перо. Время культивирования, в которое измеряли протеолитическую активность: 1 – 3 сут (серые столбики), 2 – 7 сут (черные столбики).

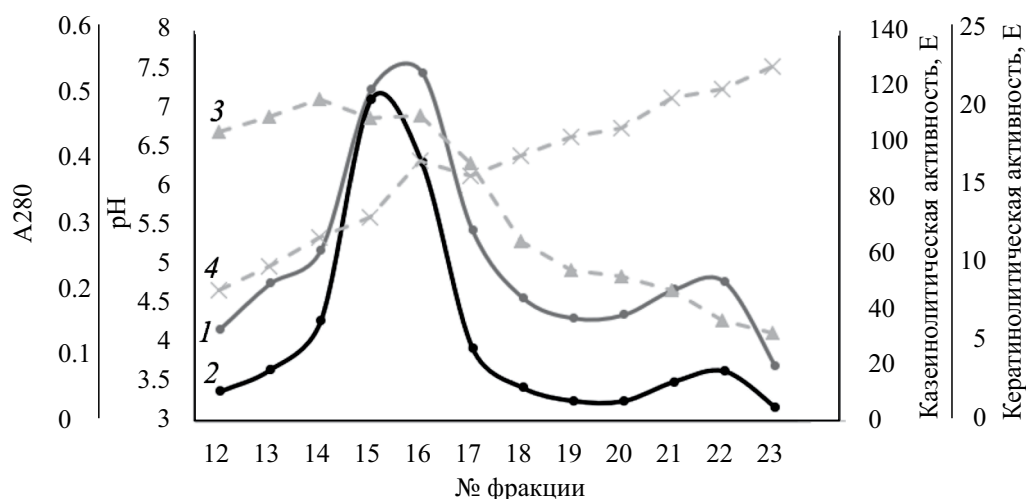


**Рис. 4.** Динамика накопления внеклеточных протеаз культуры *T. inflatum* ST1 при глубинном культивировании на среде без гидролизата рыбной муки: 1 — кератинолиз; 2 — казеинолиз.

и градиенте плотности сахарозы 0–40%. Наибольшая кератинолитическая активность (21.7 Е) приходилась на фракции с рН 5.6 (рис. 5). Чистота фермента с молекулярной массой около 31 кДа также была подтверждена методом денатурирующего электрофореза в ПААГ (рис. 6).

В настоящее время кератиназами называют все ферменты с кератинолитической активностью вне зависимости от строения молекулы и механизма действия протеазы. Однако некоторые исследователи предлагают ввести критерий истинности кератиназ, который заключается в вычислении соотношения кератинолитической активности к казеинолитической активности (Evans et al., 2000). Если это соотношение больше 1, то фермент стоит признавать истинной кератиназой. Если же соотношение

меньше 1, то фермент надо относить к протеазам с кератинолитической активностью. Среди трудностей внедрения такого критерия стоит отметить отсутствие унификации в методиках измерения кератинолитической и казеинолитической активности. Критерий истинности кератиназ выделенного фермента *T. inflatum* равен 0.21, что относит этот фермент в группу протеаз с кератинолитической активностью. Однако, несмотря на это, культура *T. inflatum* обладает высоким биотехнологическим потенциалом в связи с высокой скоростью накопления целевой активности, длительным временем секреции кератинолитических протеаз, а также высоким уровнем активности ферментного препарата. Высокий уровень как кератинолитической, так и общей протеолитической (казеинолитической)



**Рис. 5.** Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков комплексного препарата *T. inflatum* ST1 в интервале рН амфолинов 3.0–10.0: 1 — кератинолиз; 2 — казеинолиз; 3 — белок; 4 — рН.

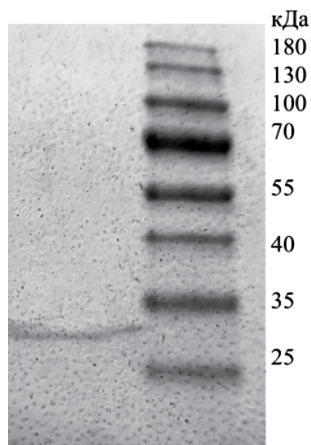


Рис. 6. Электрофореграмма кератиназы *T. inflatum* ST1 (денатурирующий электрофорез в ПААГ).

активности позволяет рассматривать штамм *T. inflatum* в качестве культуры для биodeградации кератинсодержащих отходов. Важно отметить, что ранее сообщалось о способности микромицета *T. inflatum* гидролизовать фибрин (Fokichev et al., 2022), который, так же как и кератин, относится к фибриллярным белкам. Это позволяет рассматривать гриб *T. inflatum* в качестве перспективного продуцента протеаз, активных по отношению к фибриллярным белкам. Представляет интерес и сравнение данных, полученных при использовании разных питательных сред для накопления целевых ферментов изучаемой культуры. В нашей работе показано, что при использовании только лишь органического азота при культивировании продуцента происходит преимущественное накопление протеазы с изоэлектрической точкой в слабокислой области (казеинолитическая активность – 114.9 Е), но также в ферментном препарате присутствуют две протеазы с изоэлектрическими точками в нейтральной (18.1 Е) и щелочной области (3.1 Е). Тогда как при росте *T. inflatum* k1 на среде, содержащей и минеральный, и органический источники азота, наибольшую общую протеолитическую активность проявляет щелочная протеаза, а наименьшую – кислая (Фокичев и соавт., 2021).

Таким образом, была показана кератинолитическая активность микромицетов, относящихся к разным родам отдела *Ascomycota*. Впервые выявлена способность синтезировать кератиназы представителем рода *Tolypocladium*. Полученные данные об активности штамма *T. inflatum* позволяют строить позитивные прогнозы на разработку схем использования *T. inflatum* для биodeградации кератинсодержащих отходов или в других отраслях промышленности, также нуждающихся в применении кератинолитических ферментов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-24-00674.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Фокичев Н.С., Корниенко Е.И., Крейер В.Г., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А. Тромболитический потенциал и свойства протеиназ – активаторов плазминогена, образуемых микромицетом *Tolypocladium inflatum* k1 // Микология и фитопатология. 2021. Т. 55. № 6. С. 446–452.
- Barrios-González J., Tarragó-Castellanos M.R. Solid-state fermentation: special physiology of fungi // Fungal metabolites. Reference series in phytochemistry / Eds. Mérillon J.M., Ramawat K. Cham: Springer, 2017. P. 319–347.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_6)
- Bensch K., Braun U., Groenewald J.Z., Crous P.W. The genus *Cladosporium* // Stud. Mycol. 2012. V. 72. P. 1–401.
- Bhari R., Kaur M. Fungal keratinases: enzymes with immense biotechnological potential // Fungal resources for sustainable economy / Eds. Singh I., Rajpal V.R., Navi S.S. Singapore: Springer, 2023. P. 89–125.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-19-9103-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-19-9103-5_4)
- Carbone I., Kohn L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes // Mycologia. 1999. V. 91. P. 553–556.  
<https://doi.org/10.2307/3761358>
- Crous P.W., Lombard L., Sandoval-Denis M., Seifert K.A., Schroers H.J., Chaverri P., Thines M. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell // Stud. Mycol. 2021. V. 98. Art. 100116.
- 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. V. 37. Art. 86.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-021-03052-z>
- de Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C., de Freitas M., de Almeida R.P., Silveira D., Fonseca Y.M., Ferreira Filho E.X., Pessoa Junior A., Magalhães P.O.

- A biotechnology perspective of fungal proteases // *Braz. J. Microbiol.* 2015. V. 46. P. 337–346.  
<https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>
- Dong Q. Y., Wang Y., Wang Z. Q., Liu Y. F., Yu H. Phylogeny and systematics of the genus *Tolypocladium* (*Ophiocordycipitaceae*, *Hypocreales*) // *J. Fungi.* 2022. V. 8. Art. 1158.
- El-Gendi H., Saleh A. K., Badierah R., Redwan E. M., El-Maradny Y. A., El-Fakharany E. M. A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges // *J. Fungi* (Basel). 2021. V. 8. Art. 23.  
<https://doi.org/10.3390/jof8010023>
- Evans K. L., Crowder J., Miller E. S. Subtilisins of *Bacillus* spp. hydrolyze keratin and allow growth on feathers // *Can. J. Microbiol.* 2000. V. 46. P. 1004–1011.  
<https://doi.org/10.1139/w00-085>
- Fang Z., Yong Y. C., Zhang J., Du G., Chen J. Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 7771–7779.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8484-1>
- Fokichev N. S., Kokaeva L. Yu., Popova E. A., Kurakov A. V., Osmolovskiy A. A. Thrombolytic Potential of micro-mycetes from the genus *Tolypocladium*, obtained from White Sea soils: screening of producers and exoproteins properties // *Microbiol. Res.* 2022. V. 13. P. 898–908.  
<https://doi.org/10.3390/microbiolres13040063>
- Food and indoor fungi. CBS Laboratory manual series 2 / Eds. Samson R. A., Houbraken J., Thrane U., Frisvad J. C., Andersen B. Utrecht, Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010. 390 p.
- Fungal biodiversity. CBS Laboratory manual series 1 / Eds. Crous P. W., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z., Samson R. A. Utrecht, Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009. 270 p.
- Glass N. L., Donaldson G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 1323–1330.  
<https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Houbraken J., Frisvad J. C., Samson R. A. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina* // *Stud. Mycol.* 2011. V. 70. P. 53–138.
- Kanth S. V., Venba R., Madhan B., Chandrababu N. K., Sathya S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing // *Dye Pigment.* 2008. V. 76. P. 338–347.
- Khosravi A. R., Mahdavi Omran S., Shokri H., Lotfi A., Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis // *J. Mycol. Med.* 2012. V. 22. P. 167–172.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.03.002>
- Kothary M. H., Chase Jr. T., Macmillan J. D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice // *Infect. Immun.* 1984. V. 43. P. 320–325.  
<https://doi.org/10.1128/iai.43.1.320-325.1984>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547–1549.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kurtzman C. P., Robnett C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1998. V. 73. P. 331–371.  
<https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- Labuda R., Bernreiter A., Hochenauer D., Kubátová A., Kandemir H., Schüller C. Molecular systematics of *Keratinophyton*: the inclusion of species formerly referred to *Chrysosporium* and description of four new species // *IMA Fungus.* 2021. V. 12. Art. 17.  
<https://doi.org/10.1186/s43008-021-00070-2>
- Oda K., Kakizono D., Yamada O., Iefuji H., Akita O., Iwashita K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 3448–3457.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3448-3457.2006>
- Qiu J., Wilkens C., Barrett K., Meyer A. S. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: classification, structure, function // *Biotechnol. Adv.* 2020. V. 44. Art. 107607.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607>
- Shestakova A., Lyamina V., Timorshina S., Osmolovskiy A. Patented keratinolytic enzymes for industrial application: an overview // *Recent Pat. Biotechnol.* 2023. V. 17. P. 346–363.  
<https://doi.org/10.2174/1872208317666221212122656>
- Tamura Y., Suzuki S., Sawada T. Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice // *Microb. Pathog.* 1992. V. 12. P. 237–244.  
<https://doi.org/10.1016/0882-401090058-v>
- White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T., Taylor J. L. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* AP, 1990. V. 18. № 1. P. 315–322.

## New Micromycetes Strains with Keratinolytic Activity

S. N. Timorshina<sup>1, \*</sup>, E. A. Ganetskaya<sup>1</sup>, A. A. Shestakova<sup>1, 2</sup>, V. M. Lyamina<sup>1</sup>,  
A. V. Aleksandrova<sup>1</sup>, E. A. Popova<sup>1</sup>, G. B. Admanova<sup>3</sup>, A. A. Osmolovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234, Russia*

<sup>2</sup>*National Research University "Higher School of Economics", Moscow 101000, Russia*

<sup>3</sup>*Aktobe Regional University named after K. Zhubanova, Aktobe 030000, Kazakhstan*

\*e-mail: timorshina.svetlana@mail.ru

**Abstract.** The ability of the micromycete *Tolypocladium inflatum* to synthesize keratinolytic enzymes has been demonstrated for the first time. 22 strains of micromycetes isolated from enrichment cultures of keratinolytic microorganisms belonged to the genera *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolypocladium* and *Trichoderma*. Only two strains showed high keratinolytic activity during submerged fermentation – *Keratinophyton terreum* C106 (74.2 E) and *Tolypocladium inflatum* ST1 (87.1 E). The target activity of *K. terreum* C106 in submerged culture decreased almost to zero by the 7th day of cultivation, while the activity of *T. inflatum* ST1 decreased by less than 20%. An extracellular protease with keratinolytic activity from the micromycete *T. inflatum* ST1 with a pI of about 5.6 and a molecular weight of about 31 kDa was isolated.

**Keywords:** keratinases, proteases, filamentous fungi, *Tolypocladium inflatum*