

VILNIAUS UNIVERSITETAS

AUDRIUS GEGECKAS

*GEOBACILLUS* SP. IR *BACILLUS* SPP. SEKRETOJAMŲ  
KERATINOLIZINIŲ AKTYVUMŲ PASIŽYMINČIŲ  
PEPTIDAZIŲ CHARAKTERIZAVIMAS IR PRITAIKYMAS

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01B)

Vilnius, 2016 metai

Disertacija rengta 2012-2016 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultete, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje.

Moksliniai vadovai:

- prof. dr. Donaldas Jonas Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B); Laikotarpis: 2012-10-01 – 2016-01-31;
- prof. dr. Nomeda Kuisienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B); Laikotarpis: 2016-02-01 – 2016-09-30.

# Turinys

SANTRUMPOS .....	6
ĮVADAS .....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	12
1.1. Mikroorganizmai – biokatalizatorių šaltinis .....	12
1.1.1. Ląstelė-biokatalizatorius .....	13
1.1.2. Proteoliziniai fermentai .....	15
1.1.3. Keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai .....	17
1.2. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus sintetinantys mikroorganizmai .....	22
1.3. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų substratai .....	24
1.3.1. Keratinas .....	24
1.3.2. Kolagenas .....	25
1.3.3. Elastinas .....	28
1.4. Keratino hidrolizės mechanizmas .....	29
1.5. Keratino hidrolizės produktų biotechnologija .....	32
1.6. Bioaktyvūs peptidai – fermentinės hidrolizės produktai .....	34
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	37
2.1. Medžiagos .....	37
2.1.1. Reagentai .....	37
2.1.2. Bakterijų kamienai .....	37
2.1.3. Vektoriai .....	38
2.1.4. Oligonukleotidai .....	39
2.1.5. Bakterijų auginimo terpės .....	40
2.2. Metodai .....	40
2.2.1. Mitybinių terpių ruošimas .....	40
2.2.2. Suminės DNR skyrimas .....	40
2.2.3. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje .....	41
2.2.4. Polimerazinė grandininė reakcija .....	42
2.2.5. PGR produktų analizė .....	42
2.2.6. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis ir defosforilinimas .....	43
2.2.7. Ligavimas .....	43
2.2.8. Elektrokompententinių ląstelių paruošimas .....	43
2.2.9. Elektrotransformacija .....	44
2.2.10. Plazmidinės DNR skyrimas .....	44
2.2.11. Pasėjamosios medžiagos paruošimas .....	45
2.2.12. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų produkcija .....	45
2.2.13. Baltymų išsodinimas .....	46
2.2.14. Baltymų dializė .....	46
2.2.15. Baltymų koncentravimas .....	46
2.2.16. Mėginių paruošimas baltymų elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis .....	47
2.2.17. Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis .....	47
2.2.18. Aktyvumo gelyje įvertinimas – zimografija .....	48
2.2.19. Keratinolizinio aktyvumo nustatymas .....	48
2.2.20. Temperatūros įtakos aktyvumui ir stabilumui nustatymas .....	49
2.2.21. pH įtakos aktyvumui ir stabilumui nustatymas .....	49
2.2.22. Metalų jonų, detergentų, organinių tirpiklių ir slopiklių įtakos nustatymas .....	50

2.2.23. Substratinio savitumo nustatymas.....	50
2.2.24. Tikslinių genų klonavimas.....	50
2.2.25. Tikslinių genų raiška.....	51
2.2.26. Baltymų gryninimas.....	52
2.2.26.1. Rekombinantinių baltymų gryninimas .....	52
2.2.26.2. Natyvių baltymų gryninimas .....	53
2.2.26.3. Plonasluoksni chromatrografija.....	53
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	55
3.1. Termofilinių mikroorganizmų sekretuojamos keratinolizinės peptidazės .....	55
3.1.1. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų paieška .....	56
3.1.2. Termofilinio AD-11 kamieno identifikavimas .....	56
3.1.3. AD-11 kamieno augimo dinamikos analizė.....	57
3.1.4. AD-11 kamieno sekretuojamos keratinazės produkavimas .....	61
3.1.5. Proteominiai NatGEOker baltymų tyrimai .....	63
3.1.6. GEOker koduojančio geno klonavimas .....	65
3.1.6.1. Klonavimas ir sekų analizė.....	65
3.1.6.2. GEOker baltymo variantų klonavimas .....	71
3.1.7. GEOker geno variantų raiška, raiškos analizė ir gryninimas.....	73
3.1.7.1. GEOker1 raiška ir gryninimas .....	73
3.1.7.2. GEOker2, GEOker3 ir GEOker4 raiška .....	76
3.1.8. RecGEOker baltymo fizikinių ir cheminių savybių nustatymas.....	76
3.1.8.1. Temperatūros įtakos fermento aktyvumui ir stabilumui nustatymas.....	77
3.1.8.2. pH įtakos aktyvumui ir stabilumui nustatymas .....	78
3.1.8.3. Metalų jonų įtakos keratinoliziniam aktyvumui įvertinimas .....	79
3.1.8.4. Detergentų ir organinių tirpiklių įtakos keratinoliziniam aktyvumui įvertinimas .....	80
3.1.8.5. Slopiklių įtakos keratinoliziniam aktyvumui įvertinimas.....	82
3.1.8.6. Substratinio savitumo nustatymas .....	83
3.1.8.7. Hidrolizės produktų analizė.....	84
3.2. Mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamos keratinolizinės peptidazės.....	86
3.2.1. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų paieška ir identifikavimas.....	87
3.2.2. Mezofilinių kamienų augimo dinamikos analizė.....	89
3.2.3. Mezofilinių mikroorganizmų sintetinių keratinazių produkavimas.....	92
3.2.4. Mezofilinių mikroorganizmų sintetinių keratinazių gryninimas.....	93
3.2.5. Mezofilinių mikroorganizmų keratinazių fizikinės ir cheminės savybės .....	95
3.2.5.1. Temperatūros poveikis .....	95
3.2.5.2. pH poveikis.....	97
3.2.5.3. Metalų jonų poveikis .....	98
3.2.5.4. Detergentų ir organinių tirpiklių poveikis .....	99
3.2.5.5. Slopiklių poveikis .....	100
3.2.5.6. Substratinis savitumas .....	102
3.2.5.7. Peptidų analizė.....	103
3.2.6. BtKER koduojančio geno klonavimas.....	104
3.2.6.1. Geno paieška ir bioinformatinė analizė .....	104
3.2.6.2. <i>btker</i> geno klonavimas ir raiška.....	109
3.3. Chimeriniai baltymai.....	112
3.3.1. Sintetinis homodimeras SynKer-TT .....	112
3.3.1.1. SynKer-TT klonavimas .....	112
3.3.1.2. SynKer-TT raiška ir gryninimas.....	114

3.3.1.3. SynKer-TT savybės .....	115
3.3.2. Sintetinis heterodimeras SynKer-TM .....	117
3.3.2.1. SynKer-TM klonavimas .....	117
3.3.2.2. SynKer-TM raiška .....	118
3.3.2.3. SynKer-TM savybės .....	119
3.4. Keratino hidrolizės proceso sukūrimas .....	121
3.4.1. Fermentų savihidrolizės nustatymas .....	121
3.4.2. Fermentų sinergistinio poveikio įvertinimas .....	122
3.4.3. Hidrolizės proceso temperatūros nustatymas.....	123
3.4.4. Hidrolizės proceso pH nustatymas.....	124
4. APIBENDRINIMAS .....	126
IŠVADOS .....	131
PUBLIKACIJŲ IR KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS.....	132
Publikacijos .....	132
Konferencijos .....	132
GYVENIMO APRAŠYMAS .....	135
FINANSINĖ PARAMA .....	137
PADĖKA .....	138
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	139

## SANTRUMPOS

- Å – (angl. *Angstrom*), ilgio vienetas, 0,1 nm;
- ACE – (angl. *Angiotensin-converting Enzyme*), angiotenziną konvertuojantis fermentas;
- ASR – atviro skaitymo rėmelis;
- BAKer – *Bacillus* sp. AD-AA3 kamieno keratinazė;
- BLAST – (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*), palyginių paieškos programa;
- BLASTn – (angl. *Nucleotide BLAST*), nukleotidų sekų palyginių paieškos programa;
- bp – bazių pora;
- BPKer – *Bacillus* sp. AD-W kamieno keratinazė;
- BSA – (angl. *Bovine Serum Albumin*), jaučio serumo albuminas;
- BtKER – *Bacillus* sp. AD-12 kamieno keratinazė;
- DEAE – dietilaminoetilas;
- DMF – dimetilformamidas;
- DMSO – dimetilsulfoksidas;
- DNR – deoksiribonukleorūgštis;
- dNTP – deoksinukleotidų trifosfatas;
- DTT – ditioneitolis;
- EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis;
- EGTA – etilenglikoliotetraacto rūgštis;
- ESI-LTQ – (angl. *Electrospray Ionization – Linear Quadrupole Trap*), elektropurkštuvinė jonizacija – linijinė kvadrupolinė gaudyklė;
- FMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;
- GEOker – *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno keratinazė;
- g – išcentrinė jėga;
- IMAC – (angl. *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*), imobilizuotų metalo jonų giminingumo chromatografija;
- IPTG – izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozidas;

kDa – kilodaltonas, 1000 Da;  
kfv – koloniją formuojantis vienetas;  
LB – mitybinė Luria-Bertani terpė;  
LC – (angl. *Liquid Chromatography*), skysčių chromatografija;  
mA – miliamperai;  
MW – (angl. *Molecular Weight*), molekulinė masė;  
MWCO – (angl. *Molecular weight cut-off*), molekulinės masės riba;  
NCBI – (angl. *National Center for Biotechnology Information*), JAV nacionalinis biotechnologinės informacijos centras;  
NDS – natrio dodecilsulfatas;  
NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;  
NJ – (angl. *Neighbour Joining*), kaimynų prijungimo metodas;  
o. v. – optinis vienetas;  
PDB ID – (angl. *Protein Data Bank Identification*), baltymų duomenų bazės identifikavimo numeris;  
PEG – polietilenglikolis;  
PGR – polimerazinė grandininė reakcija;  
RecGEOker – rekombinantinė *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno keratinazė;  
SRP – (angl. *Signal Recognition Particle*), signalą atpažįstanti molekulė;  
TAE – Tris-Acetatinis-EDTA buferinis tirpalas;  
TCA – trichloracto rūgštis;  
TE – Tris-EDTA buferinis tirpalas;  
TLC – (angl. *Thin-layer Chromatography*), plonasluoksnė chromatografija;  
U – aktyvumo vienetas;  
V – voltai;  
ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas;  
β-ME – β-merkaptioetanolis.

### **Aminorūgštys:**

A, Ala – alaninas;  
C, Cys – cisteinas;

D, Asp – asparto rūgštis;  
E, Glu – glutamo rūgštis;  
F, Phe – fenilalaninas;  
G, Gly – glicinas;  
H, His – histidinas;  
I, Ile – izoleucinas;  
Y, Tyr – tirozinas;  
K, Lys – lizinas;  
L, Leu – leucinas;  
M, Met – metioninas;  
N, Asn – asparaginas;  
P, Pro – prolinas;  
R, Arg – argininas;  
S, Ser – serinas;  
T, Thr – treoninas;  
W, Trp – triptofanas;  
V, Val – valinas;  
Q, Gln – glutaminas;  
X, xaa – bet kokia aminorūgštis sekoje.



## ĮVADAS

Biokonversinių procesų panaudojimas baltojoje ir kitose biotechnologijos srityse yra tiesiogiai susijęs su naujų fermentų paieška bei konstravimu, siekiant pakeisti ar sukurti naujus efektyvesnius procesus ir jų etapus. Vienas iš tokių potencialių objektų – keratiną gebantys skaidyti mikroorganizmai, leidžiantys panaudoti keratino turinčias gyvulininkystės ir paukštininkystės atliekas kaip atsinaujinančius žaliavų šaltinius<sup>1</sup>.

Keratino šaltinius gebančiais hidrolizuoti mikroorganizmais ir jų sintetinamais fermentais susidomėta išsiaiškinus, kad keratino hidrolizės produktai – bioaktyvūs peptidai, gali būti pritaikyti biologinių struktūrų regeneracijai ir prevencijai nuo aplinkos poveikio arba kaip žaliava biodujų gamybai<sup>2, 3</sup>. Taip pat nustatyta, kad keratino hidrolizės produktai gali būti naudojami kaip pašarai ar maisto papildai gyvūnams, nes biologinės keratino degradacijos metu yra išsaugomi mitybai reikalingi maisto komponentai, svarbios aminorūgštys ir peptidai<sup>4</sup>. Šie bioaktyvūs peptidai yra pagrindas naujos kartos inovatyvių produktų kūrimui ir pritaikymui biotechnologijoje.

Šiame darbe yra tiriami ir aprašomi keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai – keratinazės. Naujų keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų įvairovės, savybių ir pritaikymo galimybių pramonėje tyrimai yra būtini, siekiant sukurti šiuolaikinius ir ekonomiškai tvarius biokonversinius procesus. Inovatyvūs, lengvai kontroliuojami ir aplinkai draugiški biologiniai vienetai – keratinazės – tai naujos kartos, biologinę degradaciją vykdančios molekuliniai įrankiai. Šių įrankių pagalba tampa įmanoma pakeisti senus fizikinius ir cheminius atliekų apdirbimo ar perdirbimo metodus į natūralesnius, mažiau energijos ir resursų reikalaujančius metodus.

Baltymų inžinerija ir sintetinė biologija – sritys, leidžiančios neribotą gamtoje egzistuojančių baltymų modifikavimo galimybę. Dažnai, mikroorganizmų sintetinami fermentai nėra tokie efektyvūs arba nėra pritaikomi norimo proceso sukūrimui. Baltymų modifikacijos ar chimerinių

baltymų konstravimas, leidžia sukurti tokius fermentus, kurie natūraliai gamtoje neegzistuoja. Taip pat gali būti sukuriami bifunkciniai ar daugiafunkciniai fermentai, kurie pasižymi dviem ir daugiau skirtingų aktyvumų<sup>5</sup>. Šie metodai atveria neribotas galimybes sukurti biotechnologiškai svarbius biokatalizatorius.

### **Darbo tikslas:**

Įvertinti naujų keratinolizinių peptidazių pritaikymo galimybes baltyminės kilmės substratų degradacijos procesuose.

### **Darbo uždaviniai:**

- 1) Charakterizuoti termofilinių ir mezofilinių mikroorganizmų sintetinamų keratinolizinių peptidazių funkcinio veikimo sąlygas;
- 2) Įvertinti termofilinių ir mezofilinių mikroorganizmų sintetinamų keratinolizinių peptidazių gebėjimą hidrolizuoti baltyminius substratus;
- 3) Baltymų inžinerijos metodais sukurti chimerinius keratinolizinius biokatalizatorius;
- 4) Sukurti laboratorinio lygio keratino žaliavų biodegradacijos sistemą.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

- 1) Šiame darbe naujai identifikuotos keratinolizinės peptidazės RecGEOker (rekombinantinė *Geobacillus* sp. AD-11 keratinazė), BtKER (*Bacillus* sp. AD-12 keratinazė), BPKer (*Bacillus* sp. AD-W keratinazė) ir BAKer (*Bacillus* sp. AD-AA3 keratinazė) yra tinkamos biologinės degradacijos procesams;
- 2) Sintetinių baltymų konstravimo strategija leido sukurti biokatalizatorius, kurie pasižymi geresnėmis temperatūrinio stabilumo ir tirpumo savybėmis;
- 3) Sukurta laboratorinio lygio (mažo tūrio) biodegradacijos sistema gali būti panaudota baltyminės kilmės žaliavų degradacijai iki mažos molekulinės masės pridėtinę vertę turinčių peptidų.

### **Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė:**

Šiuolaikiniai moksliniai tyrimų metodai leidžia efektyviai identifikuoti ir analizuoti mūsų aplinkoje esančius mikroorganizmus. Nuolat aprašomos naujos mikroorganizmų rūšys yra puikūs tyrimų objektai, siekiant identifikuoti naujus molekulinis procesus ir šiuose procesuose veikiančius fermentus. Šiame darbe pirmą kartą išgryninta ir funkciškai charakterizuota *Bacillus thuringiensis* sekretuojama keratinolizinė peptidazė (BtKER). Charakterizuotos ir dar trys keratinolizinės peptidazės – *Geobacillus* sp. AD-11 keratinazė (GEOker (RecGEOker)), *Bacillus* sp. AD-W keratinazė (BPKer) ir *Bacillus* sp. AD-AA3 keratinazė (BAKER). Pademonstruota, kad visos tirtos peptidazės yra funkciškai aktyvios ir geba vykdyti biologinę keratino biodegradaciją. Nustatytas substratinis savitumas ir hidrolizės potencialas kito tipo fibriliniams ir globulininiams baltymams.

Pritaikius baltymų inžinerijos metodus, šiame darbe pirmą kartą sukurti keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys sulieti (chimeriniai) baltymai. Pademonstruota, kad baltymų suliejimas gali turėti įtakos substrato hidrolizės efektyvumui, baltymo erdvinei konformacijai ir tirpumui ląstelės citoplazmoje ar buferiniuose tirpaluose.

Šiuo metu yra siekiama kuo efektyviau panaudoti atsinaujinančias aplinkos žaliavas pramoninėje ir kitose biotechnologijos srityse. Neefektyvūs žaliavų perdirbimo metodai turi būti keičiami į efektyvius biologinius metodus. Šiame darbe sukurta biologinės degradacijos sistema, panaudojant keratinolizinių mikroorganizmų sekretominius baltymus. Pademonstruota, kad tinkamai parinkus hidrolizės sąlygas, galima gauti biotechnologiškai vertingus mažos molekulinės masės peptidus.

Šio darbo rezultatai papildė mokslines žinias apie termofilinių ir mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamas keratinolizines peptidazes ir jų įvairovę. Sukurtas keratino ir kitų baltyminės kilmės žaliavų degradacijos procesas ypač aktualus pramoninėje biotechnologijoje, kurioje siekiama antrines žaliavas panaudoti pridėtinės vertės produktų gamybai.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Mikroorganizmai – biokatalizatorių šaltinis

Remiantis biologinės įvairovės konvencija, biotechnologija ar mikroorganizmų biotechnologija yra apibrėžiama kaip bet kokia technologija ar procedūra, kurios veikimo principas yra paremtas biologinėmis sistemomis, gyvais organizmais ar jų modifikacijomis, siekiant sukurti naujus ar pakeisti jau esamus produktus <sup>6</sup>. Ypatingai greitai vystantis naujoms technologijoms ir šių technologijų pritaikymo galimybėms, šiuolaikiniam mokslininkui tampa sudėtinga suprasti terminą „biotechnologija“ plačiąja prasme. Dėl šios priežasties atsirado specifinis – spalvinis biotechnologijų skirstymo metodas (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Biotechnologijų sritys <sup>7</sup>.

Spalvinė biotechnologijų sritis	Pritaikymas
Mėlyna	Vandenyje esančios bioįvairovės panaudojimas kosmetikos, maisto ir pašarų pramonėse;
Žalia	Maisto pramonėje ir medicinoje naudojamų metabolitų ir makrojunginių sintezė augaluose ar atskirose augalo dalyse; augalų inžinerija;
Pilka	Biotechnologinių procesų panaudojimas užterštos aplinkos valymui;
Raudona	Medicinai ir asmens sveikatos priežiūrai skirtos technologijos;
Juoda	Karinei pramonei skirtos technologijos;
Balta	Pramoninė biotechnologija; klasikinę cheminę sintezę pakeičia biologinių sistemų technologijos.

Pramoninėje arba baltojoje biotechnologijoje naudojamos technologijos yra paremtos fermentų, ląstelių ekstraktų ar integralaus mikroorganizmo panaudojimu, siekiant gauti padidintos vertės plataus spektro produktus: degalus, maisto sudedamąsias dalis, cheminius junginius ir kitus panašios paskirties junginius <sup>7</sup>.

Šiuo metu baltoji biotechnologija yra viena iš svarbiausių technologinių sričių, siekiant sukurti atsinaujinančias žaliavas naudojančius procesus.

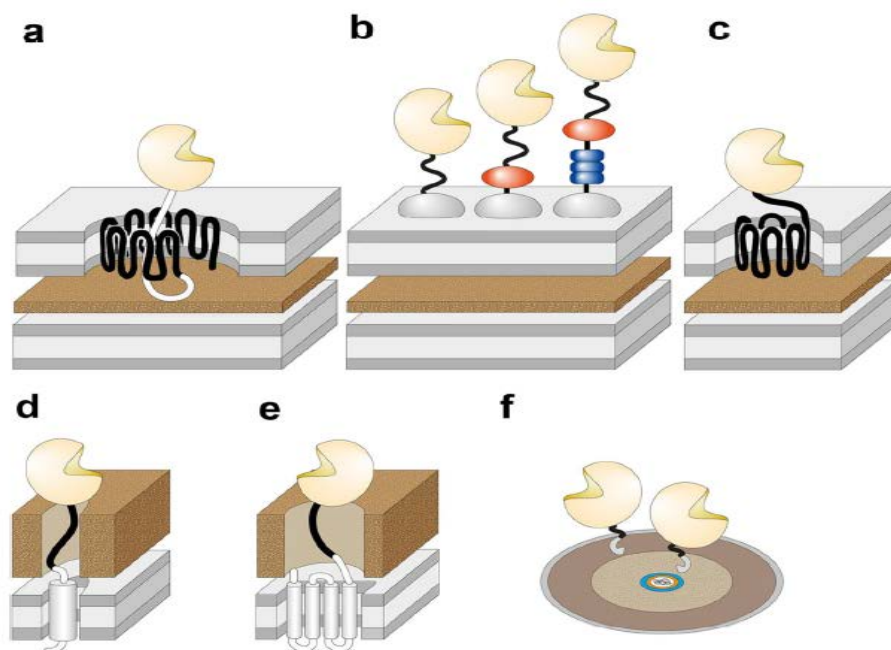
Remiantis Europos technologijų platforma „SusChem“, baltoji biotechnologija leis sukurti naujos kartos, aplinkai draugiškas technologijas. Šios technologijos įgalins perdirbti pramonines atliekas į pridėtinę vertę turinčius produktus, išsaugant visas maistingas medžiagas, sunaudojant mažiau energijos, išskiriant į aplinką mažiau anglies dioksido ir šalutinių produktų<sup>8</sup>.

Biokatalizatoriumi galima laikyti fermentą ar visą integralų mikroorganizmą. Šiuo metu daugiau nei 500 pramoniniu būdu sintetinamų produktų yra gauti panaudojant biologines sistemas ar fermentus<sup>9, 10</sup>. Mikroorganizmai yra vieni didžiausių ir dažniausiai naudojamų fermentų šaltinių<sup>11</sup>. Daugelis šiuo metu pramonėje naudojamų fermentinių technologijų turi tam tikrų trūkumų: žemas katalizinis aktyvumas, silpnai išreikštas enantiomerinis savitumas, reikalinga aukšta temperatūra, didelė vandenilio jonų koncentracija ir aukštas slėgis. Dėl šių priežasčių yra nuolat ieškoma naujų fermentų, kurių efektyvumas būtų maksimaliai išnaudojamas esant standartinėms aplinkos sąlygoms (vidutinė temperatūra ir vandenilio jonų koncentracija, atmosferos slėgis). Taip pat svarbu, kad fermentas būtų ilgą laiką stabilus ir nereikėtų papildomų cheminių junginių stabilumui palaikyti<sup>12</sup>. Tikslinių fermentų savybės gali būti modifikuojamos panaudojant genų ar baltymų inžineriją ir cheminę modifikaciją. Šių modifikacijų panaudojimas dažniausiai leidžia padidinti fermento stabilumą, substratinį savitumą ir savitąjį aktyvumą<sup>13</sup>.

### **1.1.1. Ląstelė-biokatalizatorius**

Siekiant efektyvios ir greitos norimo substrato hidrolizės, svarbiausia yra pasirinkti tinkamus biologinę degradaciją vykdančios sistemos komponentus<sup>14</sup>. Pagrindiniai veiksniai – ląstelės-biokatalizatoriaus aktyvumas arba savitumas tiksliniam substratui ir šios sistemos stabilumas<sup>15, 16</sup>. Biocheminės sintezės metu, fermentų arba ląstelės-biokatalizatoriaus stabilumas yra pagrindinis proceso efektyvumą nulemiantis faktorius. Šis stabilumas dažniausiai yra pasiekiamas imobilizuojant komponentus į arba ant

specialios matricos <sup>17</sup>. Pramonėje dažniausiai naudojama tam tikrų fermentų ekspozicija ant ląstelės paviršiaus <sup>18-21</sup> (1.1 pav.) arba rekombinantinių baltymų raiška heterologinės <sup>22-24</sup> ar homologinės <sup>25, 26</sup> sistemos pagrindu.



**1.1 pav.** Gramneigiamų (a-c) ir gramteigiamų (d-f) bakterijų paviršiaus ekspozicijos sistemos <sup>18</sup>.

Ląstelės-biokatalizatoriai gali būti panaudojami kaip metaboliškai aktyvūs arba metaboliškai neaktyvūs funkciniai vienetai. Šių vienetų aktyvumas priklauso nuo daugelio veiksnių: kofaktorių, kofermentų, maisto medžiagų pernašos, ląstelinio metabolizmo, baltymų sintezės ir ląstelės augimo <sup>16</sup>. Tokia sistema yra naudojama, kai substrato hidrolizės procesui reikalingas daugiau nei vienas fermentas (daugiafermentinė sistema) arba kai ypač sudėtinga gauti gryną fermentinį tirpalą <sup>27, 28</sup>. Biologinės hidrolizės metu gali būti naudojamos pigios ir lengvai įsisavinamos pramoninės atliekos, tačiau šios sistemos funkcionalumui užtikrinti yra reikalinga sudėtinga aparatūra ir nuolatinis monitoringas <sup>29</sup>. Tam tikros proceso valdymo klaidos gali lemti ląstelių metabolizmo pokyčius ir šalutinių produktų susidarymą. Šie produktai gali būti toksiški ląstelei ir būti sunkiai atskiriami nuo tikslinių hidrolizės produktų <sup>30</sup>.

### 1.1.2. Proteoliziniai fermentai

Proteazės (E.C. 3.4.) sudaro labai svarbią fermentų grupę, kuri turi platų pritaikymo spektrą farmacijoje ir/ar biomedicinoje, detergentų, odos, tekstilės ir maisto pramonėje. Maisto pramonėje proteazės dažniausiai naudojamos maiste esančių baltymų modifikacijoms, baltyminių hidrolizatų gavimui, mėsos produktų apdirbimui ir šių procesų metu gautų šalutinių produktų degradavimui<sup>1, 31</sup>. Dalinė hidrolizė modifikuoja produktuose esančių baltymų savybes: tirpumą, emulsifikavimo galimybę, putojimą ir stingimą, tuo tarpu pilna hidrolizė leidžia gauti produktus, praturtintus oligopeptidais ir/ar atskiromis aminorūgštimis<sup>32, 33</sup>.

Proteazės skiriasi savo veikimo specifiškumu ir yra skirstomos į endopeptidazes ir egzopeptidazes. Endopeptidazių skėlimo vieta yra vidinėje baltymo molekulės dalyje, tuo tarpu egzopeptidazės atakuoja baltymo molekulės galus<sup>34</sup>. Remiantis funkcinėmis grupėmis, esančiomis kataliziniame centre, proteazės skirstomos į asparto, glutamo, metalo, cisteino, asparagino, serino, treonino, mišraus tipo ir endopeptidazes su nežinomu kataliziniu mechanizmu<sup>35, 36</sup>.

Peptidinės jungties skėlimas negalimas, kai skėlimo vieta yra baltymo molekulės viduje ar nėra prieinama tol, kol neišlankstoma baltymo molekulė (pvz., po baltymo denatūracijos). Proteazių skėlimo efektyvumas priklauso nuo peptidines jungtis sudarančių aminorūgščių. Nespecifinės proteazės gali skelti peptidines jungtis nepriklausomai nuo jas sudarančių aminorūgščių, tuo tarpu specifinės proteazės skelia peptidinę jungtį, kurią sudaro tik tam tikros aminorūgštys<sup>37</sup>. Specifinės proteazių panaudojimo galimybės priklauso nuo katalizinio tipo. Cisteino proteazės slopina keletas reagentų, oksidantų ir metalų jonų, todėl siekiant išvengti slopinimo, mikroorganizmai dažniausiai sintetina serino ar metalo kataliziniam tipui priklausančias proteazes. Metalo proteazės taip pat gali būti inaktyvuojamos naudojant chelatuojančias medžiagas ar kitaip pašalinant baltymo struktūrai ir/ar aktyvumui būtinus metalų jonus<sup>37-39</sup>.

Termostabilios proteazės kaip ir kiti fermentai, kuriuos sintetina termofiliniai ar hipertermofiliniai mikroorganizmai, yra svarbios dėl jų stabilumo ir aktyvumo 60-70 °C bei aukštesnėje temperatūroje. Termofilinių mikroorganizmų sintetinami fermentai yra atsparesni organiniams tirpikliams, detergentams, mažoms ir didelėms pH reikšmėms, oksiduojančioms ir redukuojančioms medžiagoms labiau nei mezofilinių mikroorganizmų fermentai <sup>40</sup>. Termostabilių proteazių panaudojimas yra pranašus tuo, kad aukštoje temperatūroje denatūruoja substratų baltymai, tačiau proteazės lieka aktyvios ir gali lengviau hidrolizuoti jau denatūravusį ar dalinai išlankstytą baltyminį substratą. Proteazių atsparumas organiniams tirpikliams leidžia tokius fermentus panaudoti didelės molekulinės masės baltymų sintezėje, kuri vyksta mažai vandens turinčioje aplinkoje <sup>41</sup>.

Hipertermofilinių mikroorganizmų rekombinantinės proteazės gali būti lengvai išgryninamos naudojant termošoką, kuomet šių baltymų raiška yra vykdoma mezofilinėse bakterijose. Tokių proteazių panaudojimas pramonėje yra svarbus, kai reikia valdyti fermentų veikimą. Žemoje temperatūroje termozimai yra inaktyvuojami arba sumažinamas jų aktyvumas iki minimumo, todėl tampa įmanoma valdyti fermentinę reakciją keičiant (didinant ar mažinant) proceso temperatūrą. Pagrindinė problema naudojant termozimus yra galimas šalutinių produktų susidarymas ir temperatūrai jautrių produktų ar substratų degradavimas <sup>37</sup>.

Didelę reikšmę pramonei turi mezofilinių ir psichofilinių mikroorganizmų sintetinami fermentai (1.2 lentelė). Tokiuose procesuose, kuriuose substratai ir/ar produktai yra stabilūs tik žemoje temperatūroje, yra naudojami mezofilinių ar psichofilinių mikroorganizmų sintetinami fermentai.

Šiuo metu yra siekiama aukštoje temperatūroje vykstančius procesus modifikuoti taip, kad būtų galima juos vykdyti žemesnėje temperatūroje. Tokiu būdu sunaudojama mažiau energetinių resursų, pats procesas tampa lengviau valdomas ir reikalauja mažesnių kaštų <sup>42</sup>.



**1.2 lentelė.** Žemoje temperatūroje gebančių veikti fermentų panaudojimas <sup>42</sup>.

Pritaikomumas	Fermentai	Pranašumas
Detergentai	Proteazė, lipazė, celiuliazė	Veikimas tekančiame vandenyje
Maisto pramonė		
• Modifikacijos	Galaktozidazė, lipazė	Šviežumo išlaikymas
• Skonio/kvapo gerinimas	Proteazė, lipazė	Šviežumo išlaikymas
• Žuvų apdirbimas	Proteazė	Kokybės palaikymas
• Sulčių skaidrinimas	Pektinazė, celiuliazė	Aromato išlaikymas
• Konservavimas	Gliukozoksidazė	Ilgesnis vartojimo laikas
Fermentinė sintezė	Lipazė, nitrilhidratazė	Temperatūrinio stabilumo palaikymas
Nutekamieji vandenys	Katalazė	Mažesnis energijos sunaudojimas
Biotechnologija		
• Protoplastų formavimas	Ląstelės sienelę ardantys fermentai	Didelis išgyvenamumas
• Molekulinė biologija	Fosfatazė, uracil DNR glikozilazė	Temperatūrinis inaktyvavimas

**1.1.3. Keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai**

Keratinazės (E.C. 3.4.21/24/99.11) priskiriamos proteolizinių fermentų grupei, kuri pasižymi gebėjimu specifiškiau nei kitos proteazės hidrolizuoti netirpų keratiną ar keratino turintį substratą <sup>43-45</sup>.

Sintetinių keratinazių fizikinės-cheminės ir biocheminės savybės skiriasi priklausomai nuo jas sintetinančių mikroorganizmų rūšies. Dažniausiai keratinazės yra sekretuojamos į aplinką <sup>46, 47</sup>. Nustatyta, kad šie fermentai gali likti prikibę prie ląstelės sienelės ar būti viduląsteliniai <sup>2</sup>. Keletas pagrindinių keratinazes charakterizuojančių savybių pateikta 1.3 lentelėje. Daugelis keratinazių veikia neutraliame arba silpnai šarminiame pH <sup>48</sup>. Temperatūrinis veikimo intervalas taip pat varijuoja plačiose ribose ir priklauso nuo bakterijų natūralios augimo aplinkos. Iš termofilinių *Fervidobacterium pennavorans* bakterijų išskirtos keratinazės optimali veikimo temperatūra siekia 80 °C <sup>49</sup>, o iš *F. islandicum* AW-1 net 100 °C <sup>50</sup>. Mezofilinių *Xanthomonas maltophilia* bakterijų sekretuojama keratinazė veikia 40 °C temperatūroje <sup>51</sup>. Keratinazių molekulinė masė svyruoja nuo 18 iki 240 kDa, tačiau daugumos mikroorganizmų ji yra apie 30-40 kDa. Dauguma keratinazių yra monomerinės

struktūros, nors pasitaiko ir dimerizacijos produktų<sup>52</sup>. Didesnė fermento molekulinė masė dažniausiai yra būdinga termofilinių bakterijų ir metalo kataliziniam tipui priklausantiems fermentams<sup>53</sup>.

Siekiant nustatyti metalų ir slopiklių įtaką fermento aktyvumui ir stabilumui, į augimo terpę ar reakcijos mišinį įvairiomis koncentracijomis įdedami metalai ar slopikliai. Nustatyta, kad terpėje esant  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ir/ar  $\text{Mn}^{2+}$  yra padidinamas keratinazių aktyvumas<sup>54, 55</sup>. Manoma, kad šie metalai palaiko aktyvią fermento konformaciją ir stabilizuoja fermento-substrato kompleksą<sup>51</sup>. Metalų jonai gali apsaugoti fermentą nuo terminės denatūracijos<sup>3</sup>. Metalų jonų  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ir  $\text{Pb}^{2+}$  buvimas aplinkoje paprastai slopina keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus<sup>53, 56-58</sup>.

Nustatyta, kad organiniai tirpikliai, detergentai ir redukuojančios medžiagos skirtingai veikia tam tikras keratinazes. Redukuojančios medžiagos paprastai stimuliuoja keratinazių aktyvumą ir tai yra susiję su tuo, kad jos redukuoja substrato disulfidinius tiltelius tarp cisteinų dar prieš įvykstant fermentinei hidrolizei<sup>51</sup>. Serino kataliziniam tipui priklausančias keratinazes slopina FMSF ir benzamidinas<sup>59</sup>, metalo kataliziniam tipui – EDTA<sup>60, 61</sup>, o serino-metalo tipui – FMSF ir EDTA<sup>62</sup>.

Lyginant *Bacillus licheniformis* PWD-1 sekretuojamos keratinazės geno (*kerA*) seką su jau žinomomis duomenų bazėse esančiomis sekomis, nustatytas aukštas homologiškumas subtiliziniui, kuris yra tipinis serino katalizinio tipo proteazių atstovas<sup>63</sup>. *kerA* geno sekoje 222 pozicijoje esantis valinas pakeistas alaninu. Kadangi V222 yra arti katalizinio centro esančiai S220, manoma, kad vienos aminorūgšties pakeitimas kita yra susijęs su padidėjusiu keratinoliziniu aktyvumu<sup>64</sup>. *B. licheniformis* RPK sekretuojamą KerRP keratinazę sudaro 274 aminorūgštys. KerRP keratinazė homologiška *kerA* (99 %) ir subtiliziniui (98 %). KerRP keratinazė skiriasi 2 aminorūgštimis (144 ir 222 pozicijose) nuo *kerA* keratinazės ir 4 aminorūgštimis (102, 128, 144 ir 211 pozicijose) nuo subtilizino. Visos keratinazės išlaiko konservatyvias aktyvaus katalizinio centro aminorūgštis (D32, H63, S220)<sup>65</sup>.

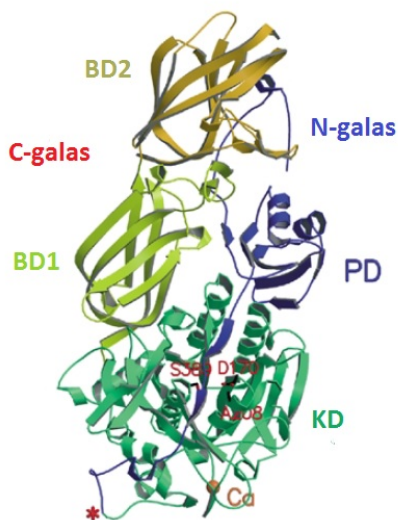
**1.3 lentelė.** Keratinolizinių mikroorganizmų įvairovė ir jų sekretuojamų keratinazių biocheminės savybės.

Mikoorganizmas	Katalizinis tipas	Molek. masė (kDa)	Opt. pH	Opt. temp. (°C)	Literatūra
<i>Bacillus</i> sp. SCB-3	Metalo	134	7	40	66
<i>Bacillus cereus</i> DCUW	Serino	80	8,5	40	67
<i>B. licheniformis</i> FK14	Serino	35	8,5	60	68
<i>B. licheniformis</i> MSK103	Serino	26	9-10	60-70	69
<i>B. licheniformis</i> PWD-1	Serino	33	7,5	50	63
<i>B. licheniformis</i> RPK	Serino	32	9	60	65
<i>Bacillus pumilus</i>	Serino	65	8	65	70
<i>Bacillus subtilis</i> KD-N2	Serino	30,5	8,5	55	71
<i>B. subtilis</i> DP1	Serino	97,4	10	37	72
<i>B. subtilis</i> RM-01	Serino	20,1	9	45	73
<i>B. subtilis</i> KS-1	Serino	25,4	7,5	-	74
<i>B. subtilis</i> MTCC (9102)	Metalo	69	6	40	75
<i>Bacillus tequilensis</i> Q7	Serino	28	7	30	46
<i>Brevibacillus brevis</i> US575	Serino	29	8	40	57
<i>Paenibacillus woosongensis</i> TKB2	Serino	190	9	50	58
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Metalo	42	7,5	50	76
<i>Caldicoprobacter algeriensis</i> TH7C1	Serino	33	7	50	47
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	28,7	8	55	77
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Metalo	64	8,5	50	60
<i>F. islandicum</i> AW-1	Serino	>200	9	100	50
<i>F. pennavorans</i>	Serino	130	10	80	49
<i>Kocuria rosea</i>	Serino	240	10	40	78
<i>Kytococcus sedentarius</i>	Serino	30-50	7-7,5	40-50	79
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Serino	35,2	7,8	40	51
<i>Streptomyces</i> sp. strain 16	Serino	KI: 203,2	9	50	52
	Serino	KII: 100,8	9	50	
	Serino	KIII: 31,8	9	50	
	Serino	KIV: 19,2	9	60	
<i>X. maltophilia</i>	Serino	36	8	60	80
<i>Acinetobacter</i> sp. R1	Metalo	25	11	50	56

Tiek *B. licheniformis*, tiek *B. subtilis* sekretuojamos keratinazės priklauso serino kataliziniam tipui. *B. subtilis* keratinazės geno *aprA* sekų analizė parodė, kad ji yra homologiška subtiliziniui. Esant nepakankamai informacijos apie *B. subtilis* keratinazę koduojančių genų sekas, jos priskirtos į subtiliziną panašių proteazių grupę<sup>2, 81</sup>. Iš *B. subtilis* KS-1 išskirtos keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčios proteazės N-galinių aminorūgščių sekos analizė parodė aukštą homologiškumą serino tipo proteazei iš *B. subtilis*<sup>74</sup>. Nustatyta, kad *B. subtilis* S14 kamieno keratinazės pasižymi aukštu

savitumu keratinui ir nehidrolizuoja kolageno. Šio fermento N-galinė aminorūgščių seka identiška subtilizinui E <sup>82</sup>, o vidinė aminorūgščių seka V-A-V-I-D-S-G-L-D-S-S-H-P-D-L-N-V-R identiška bakterinei šarminiai subtilizino vidinei sekai ir natokinazei <sup>83</sup>.

Iš termofilinių *F. pennavorans* bakterijų išskirta keratinoliziniu aktyvumu pasižyminti proteazė – fervedolizinas (1.2 pav.) Pirminė šį baltymą koduojančio geno *fls* sekos analizė parodė aukštą homologiškumą su į subtiliziną panašių proteazių grupe, tačiau N-galinių aminorūgščių seka skiriasi lyginant ją su subtilizino seka <sup>84</sup>.



**1.2 pav.** Fervedolizino kristalinė struktūra, 1,7 Å: katalizinis domenas (KD), pro-peptidinis domenas (PD) ir du *beta* domenai (DB1 ir DB2). Aktyvaus centro katalizinė triada sudaryta iš D170, H208 ir S389. Raudona žvaigždė žymi ribą tarp pro-peptidinio domeno (DP) ir katalizinio domeno (KD). Rutuliuku pažymėta kalcio prisijungimo vieta <sup>85</sup>. PDB ID: 1R6V.

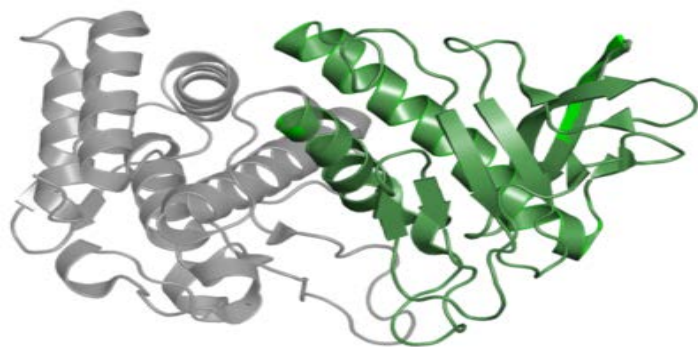
Tikslesnė analizė atlikta gavus fervedolizino kristalinę struktūrą <sup>85</sup>. Nustatyta, kad fervedolizinas sudarytas iš keturių domenų: katalizinis domenas (KD), du *beta* domenai (BD1 ir BD2), kurie yra sujungti vandenilniais ryšiais ir hidrofobine sąveika, ir vienas pro-peptidinis domenas (PD). Katalizinio domeno struktūra labai panaši į subtilizino struktūrą, o kalcio prisijungimo vieta, kuri yra kataliziniame domene, sudaro struktūrą, panašią į subtilizino E-pro-peptido domeninį kompleksą <sup>85</sup>. Remiantis fervedolizino kristalinės

struktūros analize yra iškelta hipotezė, kad keratinazės, kurių molekulinė masė siekia 35 kDa ir mažiau, gali būti sudarytos tik iš vieno katalizinio domeno<sup>53, 85</sup>.

*Bacillus* genties bakterijos geba sintetinti plataus veikimo spektro fermentus. Daugelis šių fermentų yra susiję su ląstelės sienelės sinteze ir integralumu, o ekstraląsteliniai fermentai – su aminorūgščių metabolizmu, judrumu, sporuliacija ir maisto medžiagų įsisavinimu. Tam tikra grupė ekstraląstelinių fermentų yra susiję su detoksikacija ir metabolizmu: deoksiribonukleazės, ribonukleazės, lipazės ir proteazės. Dalis šių fermentų yra pavojingi juos sintetinančioms ląstelėms, todėl turėjo išsivystyti natūralus apsaugos mechanizmas. Tokie fermentai įgauna natyvią struktūrą tik po sėkmingos sekrecijos į užląstelinę aplinką<sup>86</sup>. *Bacillus* ir *Geobacillus* genties bakterijos sintetina keletą tokių fermentų: šarminė proteazė<sup>87, 88</sup> ir metalo proteazė (neutrali proteazė, termolizinas ar į termoliziną panaši proteazė)<sup>89</sup>.

Sekretuojamos ekstraląstelinės proteazės yra sintetintos kaip Pre-Pro-fermentai. Pre-peptidas (signalinė seka) yra pašalinamas sekrecijos pro ląstelės sienelės struktūras metu. Pro-peptidas yra atsakingas už teisingą subrendusios fermento struktūros įgijimą užląstelinėje aplinkoje. Pro-peptidas veikia kaip vidumolekulinis šaperonas ir yra pašalinamas autokatalizės metu fermento brendimo pabaigoje<sup>90, 91</sup>.

Termolizinas yra vienas iš seniausių ir geriausiai ištirtų Pre-Pro-fermentų<sup>92</sup>. Struktūriškai šis fermentas sudarytas iš dviejų domenų<sup>86</sup> (1.3 pav.). Termolizino sekų analizė parodė, jog šį baltymą sudaro 28 aminorūgščių signalinis peptidas (Pre-peptidas), 204 aminorūgščių Pro-peptidas ir 316 aminorūgščių subrendęs fermentas<sup>93-97</sup>. Pramonėje termolizinas daugiausiai naudojamas dirbtinio saldiklio aspartamo sintezei<sup>98, 99</sup> ir nenatūralių aminorūgščių įterpimui<sup>100</sup>.



**1.3 pav.** Termolizino kristalinė struktūra 1,27 Å: pilka spalva pažymėtas N domenas (Pro-peptidas), žalia spalva – katalizinis domenas (C domenas; subrendęs fermentas)<sup>101</sup>. PDB ID: 5A3Y.

Grybų sekretuojamų keratinazių N-galinių sekų analizė parodė aukštą homologiškumą serino proteazėms<sup>102</sup>. Nustatyta, kad jos homologiškesnės subtiliziniui nei keratinazėms iš aktinomicetų, tačiau keratinazė iš *Streptomyces* yra artimesnė *Streptomyces griseus* proteazei B<sup>103</sup>.

## **1.2. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus sintetinantys mikroorganizmai**

Tik nedaugelis bakterijų, aktinomicetų, keratinolizinių grybų ir archėjų geba keratiną naudoti kaip vienintelį anglies, azoto, sieros ir energijos šaltinį<sup>3</sup>. Šie mikroorganizmai buvo išskirti iš įvairių aplinkos vietų: nuo Antarktidos ledynų iki karštųjų geizerių, įskaitant aerobines ir anaerobines sąlygas<sup>44</sup>.

Mikroorganizmai gali būti skirstomi į du tipus pagal jų gebėjimą hidrolizuoti keratiną – tikrieji keratinoliziniai ir potencialūs keratinoliziniai mikroorganizmai. Tikrieji keratinoliziniai mikroorganizmai visiškai hidrolizuoja netirpų keratiną, tuo tarpu potencialūs – tik pasižymi stipriomis proteolizinėmis savybėmis ir manoma, kad jie gali dalyvauti nekeratininių ar iš dalies keratininių substratų biokonversijoje<sup>53</sup>.

Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus sintetina nedaugelis bakterijų genčių. Dažniausiai tokie fermentai sutinkami *Bacillus* genties bakterijose ir sporų neformuojančiose *Stenotrophomonas*<sup>104, 105</sup>, *Fervidobacterium*<sup>49</sup> ir *Pseudomonas*<sup>106</sup> genties bakterijose. Keratinoliziniams

aktinomicetams priklauso tokios gentys kaip *Streptomyces* ir *Thermoactinomyces*<sup>107</sup>. Keratinolizinės *Bacillus* genties bakterijos ir aktinomicetai dažniausiai išskiriami iš paukščių plunksnų ir komposto<sup>108, 109</sup>. Keratinoliziniai grybai skirstomi į dermatofitinius ir nedermatofitinius. Dermatofitiniams grybams priklauso *Microsporum*, *Arthroderma* ir *Nanizzia*<sup>43</sup> genčių grybai, o nedermatofitiniams priklauso dvi gentys – *Chrysosporium* ir *Myceliophthora*<sup>53, 110</sup>. Prie keratinolizinių grybų priskiriami ir pelėsiniai grybai (*Aspergillus fumigatus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., ir kt.)<sup>2, 111</sup>. Tyrimų metu pademonstruota, kad šie pelėsiniai grybai, naudodami keratiną kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį, geba hidrolizuoti tik 20-40 % šio substrato. Tipiniai keratinoliziniai grybai, tomis pačiomis sąlygomis, visiškai hidrolizuoja keratininį substratą<sup>112</sup>. Silpnais keratinolizinais grybais laikomi tie, kurie geba hidrolizuoti ne daugiau kaip 40 % substrato per 8 savaites, o nekeratinolizinais – jei hidrolizuoja ne daugiau kaip 20 % substrato per tą patį laikotarpį<sup>113</sup>. Dauguma keratinolizinių grybų priskiriami mezofilams, keletas (*Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium tropicum*, *Aphanoascus fulvescens*, *Microsporum gypseum*) yra termotolerantiniai ir termofiliniai mikroorganizmai<sup>110, 114</sup>.

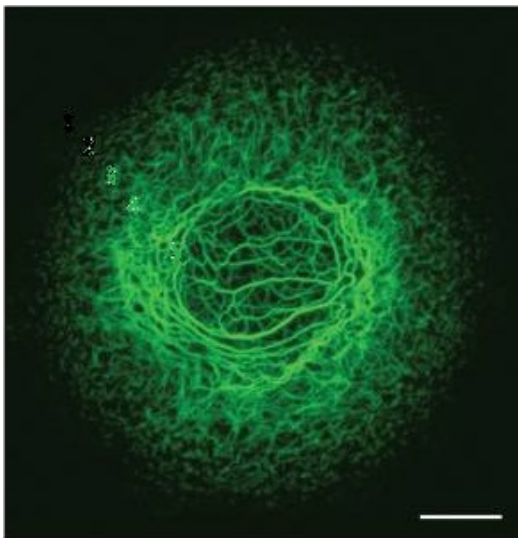
Aprašytos archėjos, kurios auga tokiomis aplinkos sąlygomis, kurios daugeliui kitų mikroorganizmų yra pražūtingos: aukšta temperatūra, ypač mažas ar didelis pH, didelės druskų koncentracijos, didelis slėgis. Dėl šios priežasties, archėjos yra potencialiai įdomūs tyrimo objektai, nes jų sintetiniai fermentai pasižymi ypatingomis savybėmis. Nustatyta, kad *Crenarchaeota* tipui priklausanti archėja sintetina keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčius fermentus. Šis mikroorganizmas gebėjo hidrolizuoti  $\alpha$ -keratiną 70 °C temperatūroje, esant pH 6<sup>3</sup>.

### 1.3. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų substratai

Yra žinoma, kad keratinazės pasižymi plačiu substratiniu savitumu ir geba hidrolizuoti ne tik keratiną ar keratino turinčius substratus, bet ir tokias biologinės kilmės medžiagas kaip kolagenas ar elastinas<sup>115-118</sup>.

#### 1.3.1. Keratinas

Keratinas yra sąlyginai tvirtas ir netirpus fibrilinės struktūros baltymas, sudarytas iš kompaktiškai supakuotų  $\alpha$ -spiralių ( $\alpha$ -keratinas, pvz., plaukai) ir/ar  $\beta$ -struktūrizuotų ( $\beta$ -keratinas, pvz., plunksnos) polipeptidinių grandinių, kurios suformuoja ypač tvirtą ir tankų tarpinių filamentinių gijų (TG) tinklą<sup>110, 119</sup> (1.4 pav.).



**1.4 pav.** Keratininis tarpinių filamentinių gijų suformuotas tinklas. Brūkšny – 10  $\mu\text{m}$   
<sup>120</sup>

Hill 2010 m. aprašė trečią keratino tipą –  $\gamma$ -keratiną<sup>121</sup>. Šis keratinas išskirtas iš plaukų ir yra charakterizuojamas, kaip nestruktūrinis, amorfinis, keratino tipui priskiriamas baltymas. Tankiai susipynusias gijas sudaro įterptinis spiralizuotas baltymo domenai ir nespiralizuoti galuose esantys amino ir karboksilo domenai<sup>122-124</sup>.

Keratinas priklauso I tipo (rūgštinis keratinas) ir II tipo (šarminis keratinas) tarpiniams filamentiniams baltymams, kurių molekulinė masė yra

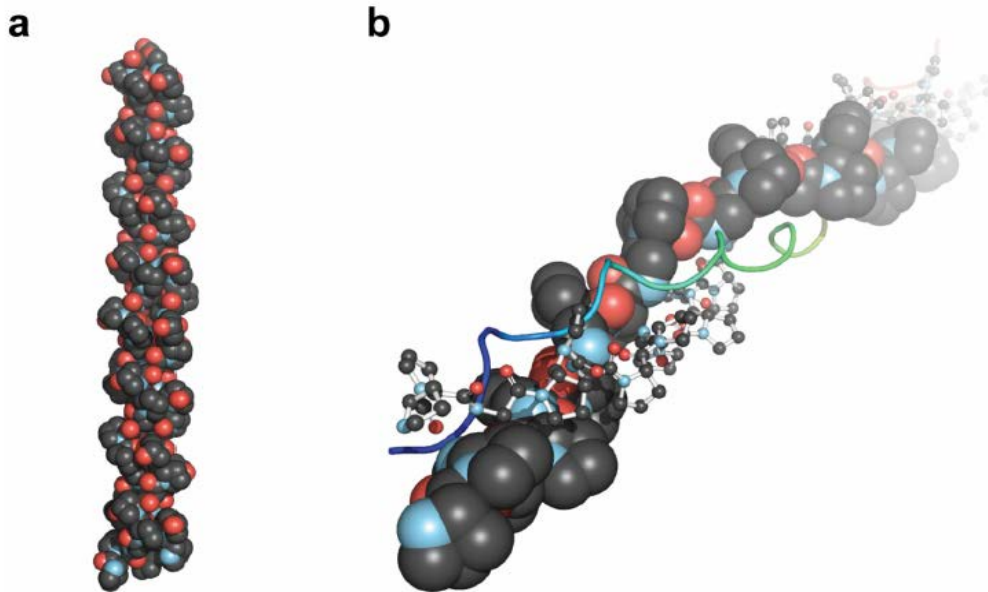


atitinkamai ~45 kDa ir ~55 kDa. Gamtoje yra maždaug apie 30 skirtingo tipo ir struktūros keratinų, kurie pagrindinai yra skirstomi į epitelinį keratiną (epitelinės ląstelės) ir trichocitinį keratiną (plaukai, nagai, ragai). Keratinas taip pat skirstomas į "kieta" (turintis ne daugiau kaip 5 % sieros) ir "minkštą" (turintis ne daugiau kaip 1 % sieros) keratiną <sup>125</sup>.

Didelis kiekis cisteino molekulių, reikalingų sudaryti disulfidinius tiltelius, yra skiriamoji keratino savybė, leidžianti jį atskirti nuo tokių baltymų, kaip kolagenas ir elastinas. Keratinas paprastai didžiąja dalimi sudarytas iš mažųjų aminorūgščių, tokių kaip glicinas (šoninė grupė turinti vandenilio atomą) ir alaninas (maža ir neturinti krūvio šoninė metilo grupė). Keratino stabilumas priklauso nuo aminorūgščių išsidėstymo viena kitos atžvilgiu, baltymo molekulinės konformacijos <sup>126</sup> ir vidumolekulinių disulfidinių tiltelių kiekio <sup>127</sup>. Yra žinoma, kad vandeniliniai ryšiai tarp molekulės amino ir karboksilo grupių lemia gretutinių peptidinių grandinių kompaktiškumą ir struktūrinį stabilumą <sup>126</sup>. Tretinę  $\beta$  tipo keratino struktūrą palaiko disulfidiniai tilteliai, vandeniliniai ryšiai ir hidrofobinė sąveika <sup>128, 129</sup>. Visos trys sąveikos lemia keratino mechaninį, cheminį ir fermentinį atsparumą <sup>130</sup>. Šios savybės ir lėmė, kad keratinas yra pagrindinė sudedamoji dalis tokių struktūrų, kurios natūraliai gamtoje yra nuolat veikiamos mechaninio, cheminio ir/ar fermentinio poveikio.

### **1.3.2. Kolagenas**

Kolagenas yra struktūrinis baltymas, aptinkamas visuose gyvūnuose. Šis baltymas sudaro 33 % visų žmogaus organizme esančių baltymų ir 75 % žmogaus odos sausosios dalies. Identifikuotos ir aprašytos 46 skirtingos polipeptidinės grandinės, kurios gali formuoti 28 skirtingo tipo kolageno struktūras (1.5 pav.) <sup>131, 132</sup>.

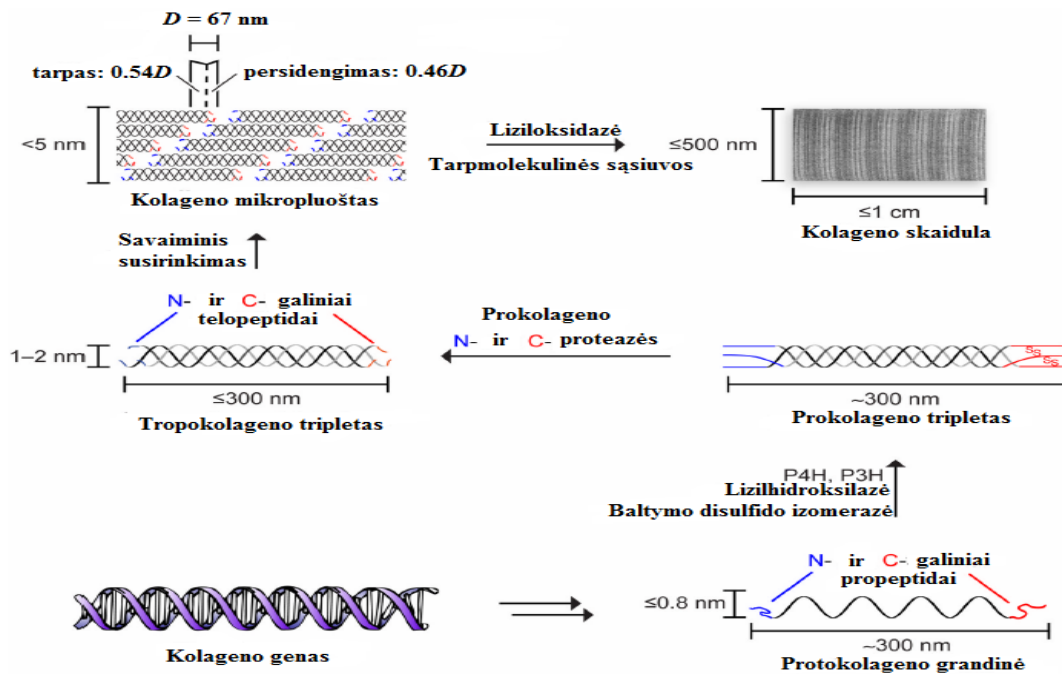


**1.5 pav.** Kolageno struktūra: a) kolageno tripleto kristalinė struktūra (PHypG)<sub>4</sub>-(PHypA)-(PHypG)<sub>5</sub>, PDB ID: 1CAG; b) (PPG)<sub>10</sub> kristalinė struktūra, kurioje struktūriškai pavaizduoti atomai ir ryšiai, sferinė struktūra, kaspino modelis. PDB ID: 1K6F<sup>133</sup>.

Kolagenas sudarytas iš trijų kairiojo sukimo polipeptidinių grandinių. Šios grandinės formuoja dešiniojo sukimo kolageno superspiralę – trimerą<sup>134</sup>. Kiekvienoje polipeptidinėje grandinėje kas trečia aminorūgštis yra glicinas ir toks tankus polipeptidinių grandinių susipakavimas lemia pasikartojantį aminorūgščių motyvą XaYaGly (Xa ir Ya – bet kokia aminorūgštis), kurioje glicino šoninė grupė yra nukreipta į superspiralės vidų<sup>135</sup>. Pirmoje motyvo pozicijoje dažniausiai sutinkamas prolinas (28 %), o antroje – 4-hidroksiprolinas (38 %). Motyvas PHypG yra dažniausiai pasitaikantis tripletas kolageno struktūroje<sup>133</sup>.

Gyvūnuose specifiniai kolageno trimerai (tropokolagenas) jungiasi hierarchiniu būdu vieni su kitais, formuodami makroskopines kolageno skaidulas ir tinklus audiniuose, kauluose ir membranose (1.6 pav.). Kolageno susidarymas yra sudėtingas, tačiau gerai ištirtas mechanizmas. Žinoma, kad šios struktūros savaiminis brendimas prasideda prokolageno N- ir C-proteazėms pašalinus prokolageno struktūroje esančius N- ir C-galinius pro-peptidus. C-galiniai pro-peptidai yra reikalingi prokolageno tripleto susidarymui, tačiau apsaugo nuo kolageno skaidulos savaiminio susirinkimo.

Proteazėms hidrolizavus pro-peptidus susidaro tropokolageno tripletas su galuose esančiais trumpais telopeptidais. Šie telopeptidai yra būtini savaiminiam kolageno brendimui.



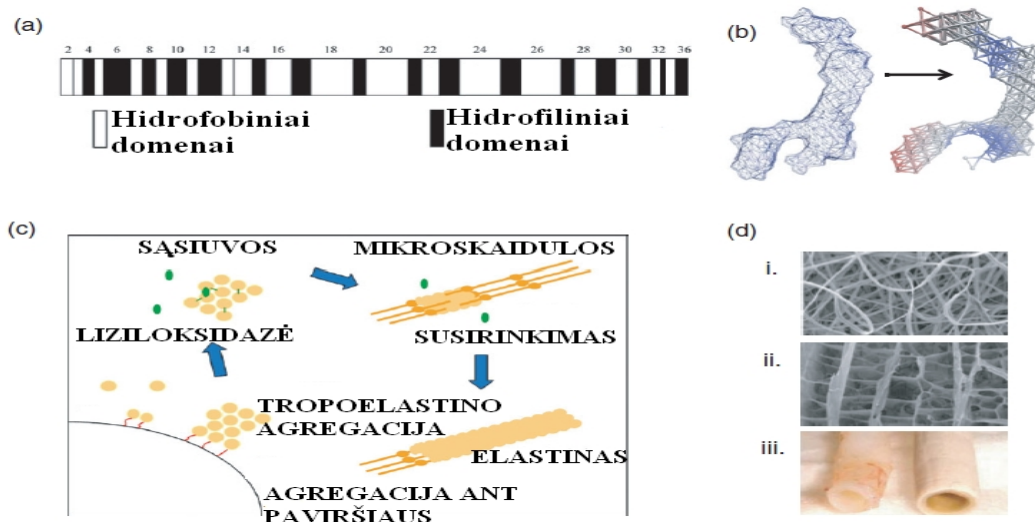
**1.6 pav.** Kolageno skaidulų biosintezės kelias. Dydis ir kompleksiškumas yra nulemiamas potransliacinių baltymo modifikacijų ir savaiminio susirinkimo proceso <sup>133, 136</sup>.

Želatina yra tirpi baltyminė medžiaga, kuri gaunama dalinai hidrolizavus kolageną <sup>137</sup>. Netirpus natyvus kolagenas pirmiausia turi būti modifikuotas, kad galėtų būti išskiriamas iš šio baltymo turinčių struktūrų. Modifikacija paprastai atliekama pakaitinus vandenyje, aukštesnėje nei  $45$  °C temperatūroje. Cheminės modifikacijos metu yra nutraukiamos nekovalentinės jungtys, kurios lemia kolageno brinkimą ir tirpumo padidėjimą. Ilgesnės trukmės kaitinimas lemia vandenilinių ir kovalentinių jungčių iširimą ir netirpaus kolageno vartimą į tirpią želatiną <sup>138</sup>. Kolagenas ir želatina yra plačiai pritaikomi ir naudojami maisto pramonėje, farmacijoje ir kosmetikos pramonėje dėl šių baltymų biosuderinamumo, biologinio suirimo ir mažo antigeniškumo <sup>137</sup>.

### 1.3.3. Elastinas

Skaidulų elastingumas yra svarbi jungiamojo audinio savybė, kurią nulemia baltymas elastinas ir daugiakomponentės mikroskaidulos. Šis elastingumas užtikrina tam tikrų audinių erdvinės konformacijos atstatymą po mechaninio poveikio<sup>139</sup>. Elastinas yra ypatingai netirpus ir hidrofobiškas baltymas. Elastiną sudarančių aminorūgščių įvairovė priklauso nuo rūšies. Glicinas sudaro apie 30 % visų aminorūgščių, randamų aukštesniųjų stuburinių elastine. Hidrofobinės aminorūgštys (glicinas, valinas, alaninas ir prolinas) gali sudaryti iki 75 % visų elastino aminorūgščių. Elastinas aptinkamas aortoje, daugelyje kraujagyslių, plaučiuose, sausgyslėse ir odoje<sup>140</sup>.

Elastinas sudarytas iš tropoelastino monomerų (1.7 pav.). Tropoelastinas yra biologiškai aktyvi molekulė, kuri geba vykdyti savaiminį susirinkimą ir asocijuotis su mikroskaidulomis formuodama elastiną<sup>141</sup>. Tropoelastinas yra sudarytas iš hidrofobinių ir hidrofiliųjų domenų. Žemoje temperatūroje tropoelastinas yra tirpus monomeras. Kylant temperatūrai, tropoelastino hidrofobiniai domenai pradeda jungtis tarpusavyje formuodami netirpią viskoelastinę fazę. Kovalentinių jungčių sudarymas tarp hidrofiliųjų domenų stabilizuoja susiformavusio elastino struktūrą<sup>139</sup>.



**1.7 pav.** Elastino biosintezė: a) žmogaus tropoelastino domeninė struktūra; b) tropoelastino struktūra, naudojant mažo kampo rentgeno spindulių sklaidos metodą (dešinė) ir mažo kampo neutronų sklaidos metodą (kairė); c) elastinių skaidulų susiformavimo mechanizmas; d) i. – sintetinės elastino gijos, ii. – sintetinis elastino hidrogelis, iii. – sintetinis elastino vamzdelis (kairė) ir žmogaus arterija (dešinė)<sup>142</sup>.

Sintetiniu būdu gautas elastinas ir į elastiną panašūs peptidai yra pritaikomi medicinoje. Elastino peptidai yra naudojami vaistų pernašos sistemų (tirpių makromolekulinių nešėjų, savaime susirenkančių nanodalelių, mikrodalelių ir koloidinių sistemų) sukūrimui. Šie peptidai plačiai pritaikomi biologiškai aktyvių cheminių junginių, radioaktyvių izotopų ir mažos molekulinės masės junginių pernašai <sup>143, 144</sup>.

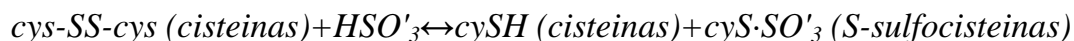
#### 1.4. Keratino hidrolizės mechanizmas

Keratinazės paprastai yra endopeptidazės, kurios pasižymi plačiu substratiniu savitumu. Dažniausiai tirpūs substratai (pvz., kazeinas) yra lengviau hidrolizuojami nei netirpūs (pvz., keratinas, kolagenas, elastinas), tačiau yra keletas keratinazių, kurios pasižymi didesniu aktyvumu hidrolizuojant netirpius substratus, lyginant su tirpiaisi <sup>145</sup>.

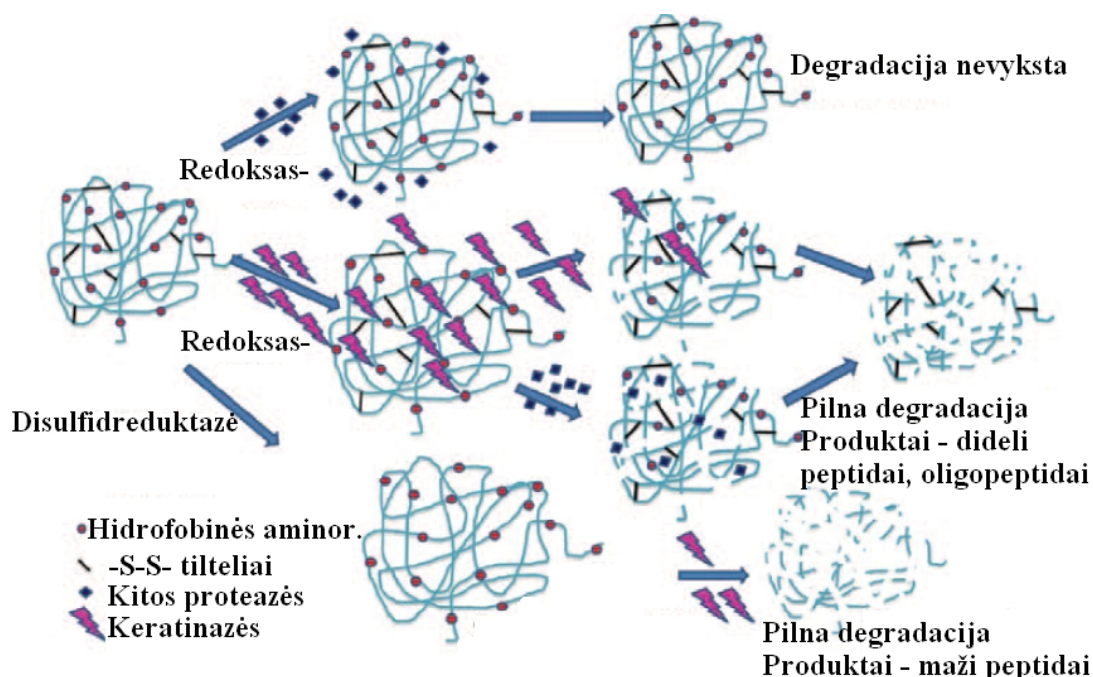
Struktūriškai stabilus ir sunkiai nespecifinių proteazių hidrolizuojamas keratinas gali būti degraduojamas tokių redukuojančių medžiagų, kaip tioglikolio rūgštis, kalio cianidas, natrio sulfitas ar natrio sulfidas, esant šarminei aplinkos terpei. Šios medžiagos nutraukia polipeptidines keratino grandines laikančius disulfidinius tiltelius. Oksiduojančios medžiagos – bromidas, permanganatas ir vandenilio peroksidas – taip pat gali destabilizuoti keratino struktūrą <sup>146</sup>.

Tikslus mikroorganizmų keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių proteazių veikimo mechanizmas nėra iki galo nustatytas. Nemažai hipotezių iškelta remiantis grybų sekretuojamų keratinazių keratino hidrolizės mechanizmo tyrimais. Dar šeštajame dešimtmetyje buvo iškelta hipotezė, kad keratinas ar keratino turintis substratas yra hidrolizuojamas vieno proceso metu <sup>147</sup>. Tačiau jau kitame dešimtmetyje, vykdant geofilinio dermatofito *M. gypseum* augimo ir sierą turinčių aminorūgščių metabolizmo tyrimus, terpėje esant vilnos, buvo nustatyta, kad keratino hidrolizės mechanizmą sudaro du etapai: sulfitolizė ir proteolizė <sup>148</sup>. Sulfitolizė gali būti nulemiama reduktazių, cheminių junginių ar ląstelės redokso sistemos <sup>104, 149, 150</sup>. Tarp polipeptidinių

grandinių keratino molekulėje esančių disulfidinių tiltelių hidrolizę lemia neorganinis sulfitas, kurį sekretuoja pats grybas. Po disulfidinių tiltelių redukcijos sekantis etapas – fermentinė hidrolizė, lemianti substrato denatūraciją. Schematinis sulfitolizės procesas:

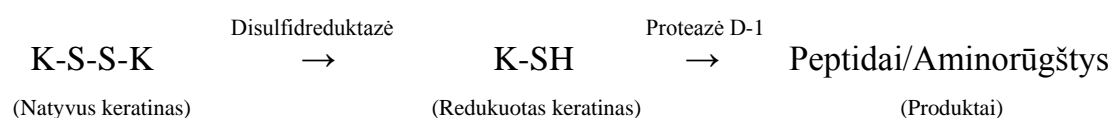


Sulfitolizės proceso metu susidaręs tarpinis produktas yra toliau veikiamas ir hidrolizuojamas ekstraląstelinių proteazių – endopeptidazių<sup>148</sup>. Manoma, kad abu procesai – sulfitolizė ir proteolizė – vyksta vienu metu – keratinolizės metu<sup>145</sup>. Sulfitolizės metu vyksta šarmėjimas, jis susijęs su deaminimu ir amonio jonų atsipalaidavimu<sup>148, 151</sup>. Remiantis mikromorfologinių, citocheminių ir biocheminių analizių rezultatais nustatyta, kad grybinė natyvaus keratino degradacija susijusi ne tik su fermentine hidrolize, bet ir su mechaniniu poveikiu<sup>113, 152</sup>. Prokariotiniai mikroorganizmai natyvų keratiną hidrolizuoja taip pat dviejų etapų – disulfidinių tiltelių redukcija ir fermentinė hidrolizė – metu (1.8 pav.)<sup>115, 153-155</sup>.



1.8 pav. Schematinis keratino degradacijos mechanizmas<sup>115</sup>.

Nustatyta, kad *Streptomyces pactum* ir *Streptomyces fradiae* degradojant keratiną reikalingi du fermentai, todėl išgrynintos keratinazės pasižymi labai silpnu aktyvumu<sup>52</sup>. 2002 metais buvo nustatyta, kad vienas iš šių fermentų yra panašus į disulfidreduktazę. Jis yra reikalingas disulfidinių tiltelių redukcijai<sup>104</sup>. Nustatyta, kad *Stenotrophomonas* sp. D-1 sekretuoja du ekstraląstelinis fermentus: serino proteazę ir į disulfidreduktazę panašų fermentą<sup>104</sup>. Buvo pateikta natyvaus keratino hidrolizės schema:



Pirmojo etapo metu į disulfidreduktazę panašus fermentas redukuoja keratino molekulėje esančius disulfidinius tiltelius ir susidaro tarpinis produktas – redukuotas keratinas. Antro etapo metu, veikiant specifinėms proteazėms, tarpinis junginys yra degraduojamas iki galutinių tirpių produktų – oligopeptidų ir/ar atskirų aminorūgščių<sup>145, 156</sup>.

Priklausomai nuo keratino struktūros ( $\alpha$  ar  $\beta$  keratinas), tam tikri mikroorganizmai skirtingai hidrolizuoja keratino turinčius substratus<sup>157</sup>. Nuo keratiną sudarančių polipeptidinių grandinių kompaktiškumo ir jas palaikančių disulfidinių tiltelių kiekio priklauso substratų hidrolizės efektyvumas. Nustatyta, kad *Chrysobacterium* sp. kr6 sekretuojama keratinazė geba hidrolizuoti substratus mažėjančio efektyvumo tvarka: žmogaus pėdos oda > kiaulės oda > vištų plunksnos > vištų nagai > vilna<sup>158</sup>.

Manoma, kad keratinazių katalizinis hidrolizės mechanizmas turi labai svarbią įtaką natūraliai gamtoje vykstantiems keratino turinčių produktų biodegradacijos procesams. Mikroorganizmų sekretuojamų keratinazių ir kitų fermentų sinergistinis veikimas leidžia pasiekti maksimalų natyvaus keratino hidrolizės efektyvumą lyginant su išgrynintais fermentais<sup>108 159</sup>. Po disulfidreduktazių ir keratinazių pirminio poveikio galimas antrinių, mažiau specifinių proteazių poveikis substratui, vedantis link visiškos keratininio substrato biodegradacijos<sup>145</sup>.

## 1.5. Keratino hidrolizės produktų biotechnologija

Plunksnų, ragų, plaukų ir kanopų pagrindinis sudedamasis struktūrinis komponentas yra keratinas <sup>160</sup>. Didžiausias kiekis šių žaliavų yra gaunamas kaip šalutinis paukštininkystės, skerdyklų ir odos perdirbimo pramonės produktas <sup>125, 161, 162</sup>, kuris gali būti perdirbamas į baltymais praturtintus pašarus ar trąšas <sup>145, 163</sup>.

Plunksnos pagrindinai sudarytos iš maždaug 90 % gryno  $\beta$  tipo keratino <sup>164</sup>. Plunksnų keratinas yra ypač stabilus dėl jį sudarančių  $\beta$  struktūrų <sup>165-167</sup> ir pasižymi dideliu atsparumu proteazėms <sup>168, 169</sup>. Mažas kiekis keratino yra nuolat natūraliai kaupiamas dirvožemyje. Pramonėje keratino turinčių šalutinių produktų kiekis skaičiuojamas milijonais tonų per metus. Gyvūnų šeriuose, plaukuose, pūkuose ir kanopose yra apie 15-18 % azoto, 2-5 % sieros, 1,27 % riebalų ir 3,2 % mikroelementų <sup>170</sup>. Dėl didelio kiekio baltymų (90 %) ir kitų naudingų medžiagų ir elementų, tokie šalutiniai produktai yra perdirbami į pašarus ir kitus pridėtinės vertės produktus <sup>56, 171</sup>.

Literatūroje yra aprašyta nemažai terminų, cheminių ir fermentinių keratino perdirbimo būdų. Vienas plačiausiai naudojamų – termohidrolizė. Tokio proceso metu, plunksnos yra perdirbamos iki plunksnų miltų. Šie miltai turi azoto, riebalų ir mikroelementų, tačiau mažai tokių aminorūgščių, kaip lizinas, metioninas ar histidinas. Terminio ar cheminio proceso metu yra sunaikinamos kai kurios aminorūgštys, ypač cisteinas <sup>145</sup>. Todėl atsirado poreikis ieškoti alternatyvių būdų, kaip perdirbti šalutinius produktus, nesunaikinant juose esančių mitybai svarbių ir būtinų komponentų.

Didžiausias dėmesys skiriamas mikroorganizmų sintetiniams keratinoliziniu aktyvumu pasižymintiems fermentams. Tokių fermentų panaudojimas biopramonėje prilygtų natūraliai gamtoje vykstančiai keratino turinčių atliekų biokonversijai <sup>172</sup>. Šiuo metu yra tiriamas keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų pritaikomumas maisto, pašarų, detergentų, odos, tekstilės, farmacijos, biomedicinos ir kosmetikos pramonėje <sup>2, 171</sup> (1.4 lentelė). Tokių keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų ir/ar



keratinolizinių mikroorganizmų panaudojimas leidžia efektyviai perdirbti šalutinius produktus, neprarandant svarbių mitybinių medžiagų ir iki minimumo sumažinant proceso nuostolius <sup>4, 173</sup>.

Didelis dėmesys skiriamas termofiliniams ir mezofiliniams mikroorganizmams ir/ar jų sintetiniams fermentams <sup>47</sup>: termofilinių mikroorganizmų fermentai yra termostabilūs aukštoje temperatūroje ir gali būti panaudoti pramonėje, kurioje dauguma procesų vyksta aukštesnėje nei 45 °C temperatūroje. Mezofilinių mikroorganizmų sintetiniai fermentai reikalauja mažesnių energetinių resursų <sup>4, 174</sup>.

**1.4 lentelė.** Potencialios keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų ir/ar juos sekretuojančių mikroorganizmų panaudojimo sritys <sup>53, 115, 175, 176</sup>.

Panaudojimo sritis	Pritaikomumas
Žemės ūkio pramonė	Pašarų gamyba, maistiniai papildai, biologinių insekticidų kūrimas, azotinių trąšų gamyba;
Farmacija/biomedicina	Prionų ir prioninių baltymų hidrolizė, vaistinių preparatų pernašos sistemos, dermatologinės priemonės, kosmetika;
Pramonė	Odos perdirbimas, tekstilės modifikacijos, detergentų gamyba, maiste esančių baltymų savybių modifikacijos, biopolimerų (bioplėvelių, apmušalų, klijų) gamyba, nutekamųjų vandenių valymas;
Bioenergija	Keratino turinčių medžiagų biokonversija iki metano ir/ar biovandenilio.

Biomedicinoje, farmacijoje ir kosmetikos pramonėje keratinazės gali būti panaudotos spuogų ar psoriazės gydymui, keratino turinčių nuospaudų ir keratininės odos šalinimui, depiliacijai, vakcinų nuo dermatofitozės kūrimui <sup>177</sup>. Taip pat tiriama keratinazių pritaikomumas ir veiksmingumas randų gydymui, odos epitelio regeneracijai ir gijimo proceso pagreitinimui <sup>178</sup>, bioaktyvių peptidų ir/ar oligopeptidų panaudojimo galimybės <sup>179, 180</sup>.

2005 metais pademonstruota, kad keratinoliziniu aktyvumu pasižymintis fermentas gali degraduoti prionus ar į prionus panašius baltymus <sup>181</sup>. *Nocardioopsis* genties bakterijų sintetinama keratinazė efektyviai degradavo

prioninį baltymą be jokių papildomų cheminių ar fizikinių veiksnių <sup>182</sup>. Prioninių baltymų degradacija, veikiant keratinazėms, ir pritaikymo galimybės šiuo metu yra intensyviai tiriamos <sup>183-186</sup>.

Maisto pramonėje yra naudojama dalinė proteolizė, siekiant pakeisti tam tikras produktuose esančių baltymų savybes. Veikiant keratinazėms keičiasi baltymų tirpumas, emulsifikavimo ir stingimo savybės <sup>187</sup>. Keratinazės, pasižyminčios plačiu temperatūrinio veikimo diapazonu, veikimu šarminėje aplinkoje, atsparumu surfaktantams ir detergentams yra naudojamos kaip priedai detergentų kūrimui <sup>52, 174</sup>. Mikroorganizmų sintetinės keratinazės ir/ar patys mikroorganizmai gali būti panaudoti vandens nuotekų valymo procese, nutekamųjų vamzdžių ir kitų su vandens tekėjimu susijusių įrenginių valymui <sup>188</sup>.

Viena iš naujausių keratinazių panaudojimo sričių – biodujų ir biokuro gamyba. Keratino turinčio šalutinio produkto hidrolizatas gali būti perdirbtas į metano dujas <sup>108</sup>. Taip pat toks hidrolizatas gali būti panaudotas biovandenilio gamybai <sup>189</sup>.

Pastarąjį dešimtmetį ypač susidomėta keratino hidrolizę gebančiais vykdyti mikroorganizmais. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių proteazių tyrimai susilaukė didelio dėmesio dėl jų panaudojimo potencialo pramoninėje biotechnologijoje ir kitose srityse. Iki šių dienų identifikuota ir aprašyta nedaug skirtingų keratinazių, o pats keratino hidrolizės mechanizmas nėra iki galo iširtas.

## **1.6. Bioaktyvūs peptidai – fermentinės hidrolizės produktai**

Bioaktyvūs peptidai – fermentinės hidrolizės proceso metu gauti hidrolizatai ar atskiri peptidai, kurie pasižymi biologiniu funkcinio aktyvumu <sup>190</sup>. Literatūroje yra išskiriamos kelios bioaktyvių peptidų grupės:

1. Receptorių ligandai;
2. Fermentų slopikliai;
3. Pernašos sistemų veiksniai;

4. Antimikrobiniai peptidai;
5. Antioksidaciniai peptidai.

Pademonstruota, kad 10-50 aminorūgščių ilgio bioaktyvūs peptidai, pasižymintys katijoninėmis ir hidrofobinėmis savybėmis, gali veikti kaip antimikrobinės medžiagos. Parodyta, kad šie peptidai veikia prieš daugelį gramteigiamų ir gramneigiamų patogeninių bakterijų, prieš virusus, grybus ir parazitus <sup>191</sup>. Peptidų poveikis prieš virusus buvo identifikuotas rapsų baltymus hidrolizuojant alkalaze. Dvi baltymų frakcijos pasižymėjo slopinančiu aktyvumu prieš ŽIV proteazę <sup>192</sup>. Slopinantis aktyvumas prieš herpes virusą buvo pademonstruotas naudojant peptidų frakciją, gautą Ramiojo vandenyno austres veikiant alkalaze ir bromelinu <sup>193</sup>.

Bioaktyvūs peptidai paprastai yra gaunami baltyminės kilmės medžiagas veikiant mikroorganizmais (proteolizinis mikroorganizmų aktyvumas) ar iš mikroorganizmų išskirtais fermentais *in vitro* (fermentinė hidrolizė) (1.5 lentelė). Yra keletas ir kitų būdų gauti bioaktyvius peptidus: mikroorganizmų metabolitai (pvz., bakteriocinai) ar cheminė sintezė.

**1.5 lentelė.** Bioaktyvių peptidų gamybos technologijos.

Baltymas	Peptidas	Aktyvumas	Fermentas/ Mikroorganizmas	Literatūra
α-zeinas	LRP	ACE slopiklis	Termolizinas	194
α-kazeinas	YKVPPEL	ACE slopiklis	Proteinazė iš <i>Lactobacillus helveticus</i> CP790	194
para-κ-kazeinas	FFSNK	Imunomodulatorius	Tripsinas	195
Lizocimas	Fragmentas	Antimikrobinis	Klostripainas	196
Ryžių albuminas	GYPMYPLR	Imunomodulatorius	Tripsinas	197
Ryžių krakmolas	VGVAL	Antioksidantas	<i>B. pumilus</i> AG1	198
β-laktoglobinas	LAFNPTQLE GWCH	Antioksidantas	<i>Bacillus</i> sp. P7 proteazė	199
Plunksnos	-	Antioksidantas	<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	200
Plunksnos	-	Antioksidantas	<i>B. pumilus</i> A1	201
Plunksnos	-	Antimikrobinis	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 6B	202
Albuminas	SLR	Slopiklis	Papainas	203
Kazeinas	HLPLP	Slopiklis	Corolase PP <sup>TM</sup>	204
Soja	-	Antioksidantas	Corolase PP <sup>TM</sup>	205
Ožkos pieno baltymai	-	Antimikrobinis	Alkalazė	206
Ovomucinas	-	Slopiklis	Papainas Alkalazė	207

Bioaktyvių peptidų produkcijai gali būti panaudoti daugelis maisto produktų, kurių didžiąją maisto medžiagų dalį sudaro baltymai. Bioaktyvūs peptidai taip pat gali būti gaminami panaudojant perdirbimo pramonės atliekas (žvynus, kaulus, išspaudas, mėsos atliekas, paukščių plunksnas). Tokių žaliavų panaudojimas sumažina išlaidas ir leidžia gauti padidintos vertės produktus<sup>208, 209</sup>.

Fermentai, naudojami bioaktyvių peptidų gamybai, yra išskiriami iš mikroorganizmų, augalų ir gyvūnų. Daugiausiai naudojami augalų ir mikroorganizmų fermentai:  $\alpha$ -chimotripsinas, papainas, neutrazė, termolizinas, pepsinas, alkalazė, pronazė, karboksipeptidazė A ir tripsinas<sup>209-211</sup>. Tačiau vis didesnę pagreitį įgauna mikroorganizmų sintetinių fermentų naudojimas bioaktyvių peptidų gamybai. Tai susiję su mažesnėmis mikroorganizmų auginimo išlaidomis, lyginant su gyvūnais ir augalais; paprastomis fermentų išskyrimo ir gryninimo procedūromis; didesne mikroorganizmų ir jų sintetinių fermentų įvairove aplinkoje<sup>212</sup>. Bioaktyvių peptidų skaičius, gaunamas baltymus veikiant proteazėmis, teoriškai yra neribotas. Tai yra susiję su galimybe naudoti įvairius fermentų kompleksus, įvairias mikroorganizmų rūšis ar jų kombinacijas.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Skyrelyje "Medžiagos ir metodai" yra pateikiamos biologinės medžiagos, reagentai ir metodai, naudoti šiame darbe. Naudojama dauguma klasikinės mikrobiologijos ir molekulinės mikrobiologijos, molekulinės biologijos, biochemijos, genų inžinerijos ir baltymų inžinerijos metodų. Daugelio metodų protokolai yra modifikuoti ir pritaikyti būtent šio darbo rezultatams pasiekti.

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Reagentai

Visi darbe naudojami reagentai yra pripažintos analizinės kokybės Merck, Sigma-Aldrich ir AppliChem gamintojų siūlomi produktai, jei nenurodyta kitaip. Visi naudojami fermentai yra iš Thermo Fisher Scientific, jei nenurodyta kitaip.

#### 2.1.2. Bakterijų kamienai

Visi šiame darbe naudoti bakterijų kamienai pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe naudotų bakterijų kamienų sąrašas.

Kamienas	Aprašymas	Šaltinis
AD-11	<i>Termofilinės Geobacillus bakterijos</i>	Šis darbas
AD-12	<i>Mezofilinės Bacillus bakterijos</i>	Šis darbas
AD-W	<i>Mezofilinės Bacillus bakterijos</i>	Šis darbas
AD-AA3	<i>Mezofilinės Bacillus bakterijos</i>	Šis darbas
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F</i> <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK</i> <sup>-</sup> , <i>mK</i> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>thi</i> <sup>-</sup> <i>1 gyrA96 relA1</i>	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> ( $\lambda$ DE3) [ <i>dcm</i> ] $\Delta$ <i>hsdS</i> $\lambda$ DE3 = $\lambda$ <i>sBamHI</i> $\Delta$ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21</i> $\Delta$ <i>nin5</i>	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	<i>F</i> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) <i>pLysSRARE (Cam<sup>r</sup>)</i>	Novagen
<i>E. coli</i> BW25113	<i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 <i>zzf::mini-Tn10</i> ( <i>Kan<sup>r</sup></i> )	Dovana (prof. dr. Edita Sužiedėlienė)

### 2.1.3. Vektoriai

Visi šiame darbe naudoti vektoriai pateikti 2.2 lentelėje.

**2.2 lentelė.** Darbe naudotų vektorių sąrašas.

Vektorius	Aprašymas	Šaltinis
pTZ57R/T	Klonavimo vektorius, Amp <sup>r</sup>	Thermo Fisher Scientific
pET-28c(+)	Raiškos vektorius, Kan <sup>r</sup>	Novagen
pET-28c/ker1	<i>Geobacillus</i> sp. AD-11 <i>geoker1</i> genas, klonuotas į pET-28c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas
pET-28c/ker2	<i>Geobacillus</i> sp. AD-11 <i>geoker2</i> genas, klonuotas į pET-28c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas
pET-28c/ker3	<i>Geobacillus</i> sp. AD-11 <i>geoker3</i> genas, klonuotas į pET-28c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas
pET-28c/ker4	<i>Geobacillus</i> sp. AD-11 <i>geoker4</i> genas, klonuotas į pET-28c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas
pET-21c(+)	Raiškos vektorius, Amp <sup>r</sup>	Novagen
pBAD30	Raiškos vektorius, Amp <sup>r</sup>	Dovana (prof. dr. Edita Sužiedėlienė)
pET-21c/BtKER	<i>Bacillus</i> sp. AD-12 <i>btker</i> genas, klonuotas į pET-21c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas
pET-28c/BtKER	<i>Bacillus</i> sp. AD-12 <i>btker</i> genas, klonuotas į pET-28c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas
pET-28cR/BtKER	<i>Bacillus</i> sp. AD-12 <i>btker</i> genas, klonuotas į pET-28c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus. Raiška vykdyta <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS kamiene	Šis darbas
pBAD30/BtKER	<i>Bacillus</i> sp. AD-12 <i>btker</i> genas, klonuotas į pBAD30 vektorių per <i>EcoRI</i> ir <i>XbaI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas
pET-28c/SynKer-TT	<i>Geobacillus</i> sp. AD-11 <i>geoker1</i> + <i>geoker1</i> genas, klonuotas į pET-28c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas
pET-28c/SynKer-TM	<i>Geobacillus</i> sp. AD-11 <i>geoker1</i> ir <i>Bacillus</i> sp. AD-12 <i>btker</i> genas, klonuotas į pET-28c(+) vektorių per <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos saitus	Šis darbas

## 2.1.4. Oligonukleotidai

Visi šiame darbe naudoti oligonukleotidai pateikti 2.3 lentelėje.

**2.3 lentelė.** Darbe naudotų oligonukleotidų sąrašas.

Pavadinimas	Seka (5' → 3')	Taikinys
27F	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	16S rDNR
1495R	CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA	16S rDNR
GeoKer-proF	GGA AAG CCG CAA AGA GGG AAA AAC GGA AA	<i>geoker</i>
GeoKer-proR	CGG GAC GCG TGA CGT CAG AAA CTT AA	<i>geoker</i>
GeoKerF	<u>CAT ATG</u> AAG GAA AGA TCA ATG GTG TGG GGC ( <i>NdeI</i> )	<i>geoker</i>
GeoKerR	<u>CTC GAG</u> TTA ATA CAC TCC AAC CGC ATT GAA ( <i>XhoI</i> )	<i>geoker</i>
GeoKer2F	AAA <u>ACA TAT</u> GGT CGC CGG CGC GTC GAC G ( <i>NdeI</i> )	<i>geoker2</i>
GeoKer3F	<u>CAT ATG</u> ATT TTT ACG TAT GAC GGA CGA AAC CGC ( <i>NdeI</i> )	<i>geoker3</i>
GeoKer4F	<u>CAT ATG</u> AAA AAT GTG CAC GGC CGG ( <i>NdeI</i> )	<i>geoker4</i>
BtKER-proF	ATA TAG TTG AAA AGG AAT GCG ACA TT	<i>btker</i>
BtKER-proR	GTA ATA TAG TTT GTA AGA AGG AGA GCC	<i>btker</i>
BacKerNde32F	GCG <u>CCA TAT</u> GGA AAC ATC ATC TAC TGA TTA CG ( <i>NdeI</i> )	<i>btker</i>
BacKerSTOPXho31R	GCG <u>CCT CGA</u> GTT AAG AGG CTT TAT TTT CTT G ( <i>XhoI</i> )	<i>btker</i>
BacKerXho31R	GCG <u>CCT CGA</u> GAG AGG CTT TAT TTT CTT GTA A ( <i>XhoI</i> )	<i>btker</i>
BacKerEcoR31F	GCG <u>CGA ATT</u> CGA AAC ATC ATC TAC TGA TTA C ( <i>EcoRI</i> )	<i>btker</i>
BacKerSTOPXba31R	GCG <u>CTC TAG</u> ATT AAG AGG CTT TAT TTT CTT G ( <i>XbaI</i> )	<i>btker</i>
TT2	GCG <u>CGA GCT</u> CAC TTC CTC CAT ACA CTC CAA GCG CAT T ( <i>SacI</i> )	<i>geoker</i>
TT3	GCG <u>CGA GCT</u> CAA GGA AAG ATC AAT GGT GTG G ( <i>SacI</i> )	<i>geoker</i>
TM1	GCG <u>CGA GCT</u> CGA AAC ATC ATC TAC TGA TTA C ( <i>XhoI</i> )	<i>btker</i>

Pabraukti nukleotidai žymi restrikcijos endonukleazių atpažinimo vietas.

### 2.1.5. Bakterijų auginimo terpės

Visos šiame darbe naudotos bakterijų auginimo terpės pateiktos 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Darbe naudotos bakterijų auginimo terpės.

Auginimo terpė	Sudėtis
LB	1 % peptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl, (agarizuotai terpei – 1,5 % agaras);
A	0,3 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,05 % NaCl, 0,1 % NH <sub>4</sub> Cl, 0,25 % gliukozė, 0,6 % Tris, 0,5 % mielių ekstraktas, 1,5 % peptonas, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> , (agarizuotai terpei – 1,5 % agaras);
B	0,05 % NH <sub>4</sub> Cl, 0,05 % NaCl, 0,03 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,03 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,01 % mielių ekstraktas, 0,1 % keratinas (TCI Europe), 2 mM MgSO <sub>4</sub> , (agarizuotai terpei – 1,5 % agaras);
B (modifikuota)	0,05 % NH <sub>4</sub> Cl, 0,05 % NaCl, 0,03 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,03 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,01 % mielių ekstraktas, 0,1 % keratinas, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7, (agarizuotai terpei – 1,5 % agaras);

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Mitybinių terpių ruošimas

Reikalingi terpių komponentai sveriami elektroninėmis svarstyklėmis ir tirpinami nedideliame kiekyje distiliuoto vandens. Reikiamas terpės pH privedamas naudojant 5 M HCl, 5 M NaOH ar 4 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> tirpalus. Pripylus reikiamą kiekį distiliuoto vandens, indai uždengiami aliuminio folija ir sterilizuojami autoklave 121 °C ar 110 °C temperatūroje 15 ar 30 min., atitinkamai. Po sterilinimo, aseptinėmis sąlygomis laminarinėje spintoje sumaišomi visi reikalingi terpės komponentai. Standžios terpės po sterilinimo išpilstomos į Petri lėkšteles po 25-30 mL, kuomet jų temperatūra ne aukštesnė kaip 48-50 °C. Prieš užsėjant kultūrą, terpės džiovinamos (10-20 min.) sterilioje aplinkoje.

### 2.2.2. Suminės DNR skyrimas

Laštelės mikrobiologine kilpele nuo Petri lėkštelės užsėjamos į 50 mL LB terpės ir auginamos atitinkamoje temperatūroje iki eksponentinės augimo fazės pabaigos maišant 180 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu. Po augimo laštelės atvėsina



ledo vonioje ir surenkamos centrifuguojant 10 min.  $4000 \times g$  greičiu,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ląstelės praplaunamos steriliu vandeniu ir surenkamos centrifuguojant 15 min.  $4000 \times g$  greičiu,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Surinktos ląstelės suspenduojamos 5 mL TE buferiniame tirpale su lizocimu (pagal gamintojo rekomendacijas). Inkubuojama 30 min.  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Po inkubacijos įpilama 10 % NDS tirpalo iki galutinės 1 % koncentracijos. Įpilama proteinazės K iki galutinės  $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  koncentracijos (pagal gamintojo rekomendacijas). Inkubuojama 60 min.  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Po inkubacijos įpilama 1/2 mėginio tūrio fenolio ir 1/2 mėginio tūrio chloroformo. Kelis kartus pavartoma ir centrifuguojama 30 min.  $12000 \times g$  greičiu. Viršutinė frakcija atsargiai perkeliama į švarų mėgintuvėlį ir įpilama 1 mėginio tūris chloroformo. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Viršutinė frakcija perkeliama į švarų mėgintuvėlį ir DNR išsodinama įpilus 2 mėginio tūrius ledo šaltumo 96 % etanolio. DNR surenkama centrifuguojant 30 min.  $12000 \times g$  greičiu. Nupilamas supernatantas, likę supernatanto lašai išgarinami. DNR tirpinama 0,5 mL TE buferiniame tirpale ir saugoma  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Išskirtos DNR kiekis nustatoma DNR elektroforezės agaroziniame gelyje metodu (2.2.3.).

### **2.2.3. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje**

DNR fragmentų analizei naudojamas 0,8 % agarozinis gelis. Reikiamas kiekis agarozės užpilamas  $1\times$  TAE buferiniu tirpalu (40 mM Tris-acetatas, 0,1 mM EDTA, pH 8,3) ir virinamas keletą minučių, kol tampa skaidrus ir homogeniškas. Tuomet pridodamas nugaravęs vandens kiekis, tirpalas vėsinamas iki  $40\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūros ir įdedama etidžio bromido iki galutinės  $0,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  koncentracijos. Pamaišoma ir supilama į gelio formavimo talpą. Sustingęs gelis perkeliamas į elektroforezės vonelę ir užpilamas  $1\times$  TAE buferiniu tirpalu. Analizuojami mėginiai sumaišomi su  $6\times$  užnešimo dažų ir įnešami į gelio šulinėlius. Į atskirą šulinėlį įnešamas DNR ilgio standartų mišinys (GeneRuler DNA Ladder Mix, 100-10000 bp, Thermo Fisher Scientific). Elektroforezė vykdoma esant  $10\text{ V cm}^{-1}$  tol, kol dažas nueina 2/3

gelio ilgio. Po to gelis vizualizuojamas ir fotografuojamas apšvietus UV šviesa (MiniBIS Pro).

#### **2.2.4. Polimerazinė grandininė reakcija**

DNR fragmento pagausinimui paruošiamas mišinys iš šių komponentų: 10× *Taq* buferinis tirpalas, pradmenys po 0,5 μM, 2 mM dNTP mišinys po 0,2 mM kiekvieno dNTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 ng matricinės DNR, *Taq* polimerazės 2,5 U/100 μL reakcijos mišinio ir vandens iki 100 μL. Paruošti mišiniai patalpinami į termociklerį (Bio-Rad) ir reakcija vykdoma pagal tokią programą:

1. Pradinis grandinių atskyrimas: 95 °C 2 min.;
2. Grandinių atskyrimas: 95 °C 1 min.;
3. Pradmenų prilydymas:  $T$  °C (priklausomai nuo pradmenų lydymosi temperatūros) 1 min.;
4. Grandinės ilginimo reakcija: 72 °C  $t$  min. (priklausomai nuo PGR produkto ilgio);
5. Pilnas reakcijos užbaigimas: 72 °C 7 min.

2-4 stadijos kartojamos 29 ciklus. Po reakcijos iki analizės mėginiai laikomi 4 °C temperatūroje <sup>213</sup>. Gauti DNR fragmentai analizuojami DNR elektroforezės agaroziniame gelyje metodu (2.2.3.).

#### **2.2.5. PGR produktų analizė**

Gautas DNR fragmentas (2.2.4.) po elektroforezės (2.2.3.) išskiriamas iš agarozinio gelio, naudojantis DNR skyrimo rinkiniu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) arba valomas tiesiogiai iš PGR reakcijos mišinio GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkiniu. DNR fragmentas nusekvenuojamas VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre. Gauti sekoskaitos rezultatai naudojami filogenetiniam giminingumui nustatyti (16S rDNR), sekų analizei (genai) ar klonavimo

darbams vykdyti. 16S ribosominės DNR (rDNR) ir genų sekų analizė atliekama naudojant BLAST algoritmą (NCBI).

### **2.2.6. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis ir defosforilinimas**

Reakcijos tūris parenkamas priklausomai nuo norimo sukarchyti DNR kiekio, kurio koncentracija reakcijos mišinyje neturėtų viršyti  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Reakcijos mišinį sudarantys komponentai:  $10\times$  buferinis tirpalas (priklausomai nuo restriktažės), restrikcijos endonukleazė (fermento kiekis priklauso nuo norimo sukarchyti DNR kiekio), DNR,  $\text{H}_2\text{O}$  iki reikiamo reakcijos tūrio. Komponentai sumaišomi ir inkubuojami  $t$  min.  $T$  °C temperatūroje (priklausomai nuo naudojamų restrikcijos endonukleazių). Norint defosforilinti gautų fragmentų 5'-galus (ruošiant vektorius klonavimo darbams), po reakcijos į reakcijos mišinį įdedama FastAP šarminė fosfatazė. Reakcija vykdoma pagal gamintojo rekomendacijas (Thermo Fisher Scientific).

### **2.2.7. Ligavimas**

Ligavimo mišinio komponentai: paruošas defosforilintas plazmidinis vektorius (nuo 10 iki 100 ng), liguojamas DNR fragmentas (molinis santykis atitinkamai 1:3-5),  $10\times$  T4 ligavimo buferinis tirpalas, T4 DNR ligazė (5 U/20  $\mu\text{L}$ ) ir  $\text{H}_2\text{O}$  iki 20  $\mu\text{L}$ . Reakcija vykdoma 90 min. kambario temperatūroje arba 16 val. 4 °C temperatūroje, remiantis gamintojo rekomendacijomis (Thermo Fisher Scientific).

### **2.2.8. Elektrokompentinių ląstelių paruošimas**

Į 50 mL LB terpės mikrobiologine kilpele nuo standžios terpės užsėjamas reikiamas bakterijų kamienas. Ląstelės auginamos per naktį 37 °C temperatūroje, maišant 200 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu. Į 150 mL LB terpės inokuliuojama 5 % naktinės kultūros. Ląstelės auginamos tol, kol kultūra pasiekia apie 0,4 optinio vieneto tankį (matuojama spektrofotometru esant 600 nm bangos ilgiui). Auginimas nutraukiamas ląsteles perkeliant į ledų vonią ir

visos tolimesnės procedūros atliekamos 4 °C temperatūroje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. 1000 × g greičiu. Ląstelės praplaunamos šaltu H<sub>2</sub>O ir surenkamos tomis pačiomis sąlygomis. Ląstelės praplaunamos 10 % glicerolio tirpalu ir surenkamos centrifuguojant 15 min. 1000 × g greičiu. Ląstelės suspenduojamos GYT (10 % glicerolio, 0,125 % mielių ekstrakto, 0,25 % triptono) terpėje tokiame tūryje, kad matuojant 100 kartų skiestos suspensijos optinio vieneto tankis būtų apie 1,0 (matuojama spektrofotometru esant 600 nm bangos ilgiui). Suspensija išpilstoma į atskirus mėgintuvėlius po 40 µL ir laikoma -70 °C temperatūroje.

### **2.2.9. Elektrotransformacija**

40 µL kompetentinių *Escherichia coli* ląstelių sumaišoma su 1-5 µL mišinio, gauto po ligavimo (2.2.7.). Šis mišinys perkeliamas į elektroporacijos kiuvetę ir veikiant elektros laukui (12000 V; elektroporatoriuje; Eppendorf) DNR patenka į ląsteles. Po elektroporacijos, ląstelės suspenduojamos 1 mL SOC (2 % triptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM gliukozė) ir inkubuojamos 60 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės išsėjamos ant selektyvios terpės su atitinkamu antibiotiku.

### **2.2.10. Plazmidinės DNR skyrimas**

Kolonija nuo selektyvios agarizuotos terpės užsėjama į 5 mL LB terpės su atitinkamu antibiotiku ir auginama 12-16 val. 37 °C temperatūroje. Plazmidinės DNR išskyrimui iš *E. coli* ląstelių naudojamas rinkinys Zyppy<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Visos procedūros atliekamos remiantis gamintojo rekomendacijomis.

### 2.2.11. Pasėjamosios medžiagos paruošimas

Geobacillus sp. AD-11 kamieno ląstelės mikrobiologine kilpele nuo Petri lėkštelės užsėjamos į 5 mL A terpės (pH 7,8). Ląstelės auginamos 14-16 val. 55 °C temperatūroje, maišant 200 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu.

Bacillus sp. AD-12 kamieno ląstelės užsėjamos į 50 mL LB terpės ir auginamos 12-16 val. 30 °C temperatūroje, maišant 150 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu.

Bacillus sp. AD-W ir Bacillus sp. AD-AA3 kamienų ląstelės užsėjamos į 50 mL LB terpės ir auginamos 12-16 val. 30 °C temperatūroje, maišant 180 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu.

### 2.2.12. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų produkcija

Geobacillus sp. AD-11: Į 100 mL A terpės supilama 1 % ( $3 \times 10^5$  kfv mL<sup>-1</sup>) naktinės kultūros (2.2.11.) ir auginama 12-14 val. 60 °C temperatūroje, maišant 180 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu. Po 12-14 val. auginimas stabdomas kolbas perkeliant į ledų vonią. Ląstelės pašalinamos centrifuguojant du kartus po 15 min. 8500 × g, 4 °C temperatūroje.

Geobacillus sp. AD-11: Į 100 mL B terpės (pH 7,8) supilama 1 % naktinės kultūros ( $3 \times 10^5$  kfv mL<sup>-1</sup>) (2.2.11.) ir auginama 80-92 val. 60 °C temperatūroje, maišant 180 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu. Po 80-92 val. auginimas stabdomas kolbas perkeliant į ledų vonią. Ląstelės pašalinamos centrifuguojant du kartus po 15 min. 8500 × g, 4 °C temperatūroje.

Bacillus sp. AD-12: Į 100 mL B terpės (pH 7) supilama 1 % naktinės kultūros (2.2.11.) ir auginama 80-96 val. 30 °C temperatūroje, maišant 180 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu. Po 80-96 val. auginimas stabdomas kolbas perkeliant į ledų vonią. Ląstelės pašalinamos centrifuguojant 15 min. 8500 × g, 4 °C temperatūroje.

Bacillus sp. AD-W: Į 100 mL B terpės (pH 8) supilama 1 % naktinės kultūros (2.2.11.) ir auginama 48 val. 30 °C temperatūroje, maišant 150 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu. Po 48 val. auginimas stabdomas kolbas perkeliant į ledų vonią. Ląstelės pašalinamos centrifuguojant 15 min. 8500 × g, 4 °C temperatūroje.

Bacillus sp. AD-AA3: Į 100 mL B terpės (pH 7) supilama 1 % naktinės kultūros (2.2.11.) ir auginama 48 val. 30 °C temperatūroje, maišant 150 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu. Po 48 val. auginimas stabdomas kolbas perkeliant į ledų vonią. Laštelės pašalinamos centrifuguojant 15 min. 8500 × g, 4 °C temperatūroje.

### **2.2.13. Baltymų išsodinimas**

Į supernatantą, gautą po centrifugavimo (2.2.12.), maišant magnetine maišykle 4 °C temperatūroje lėtai sudedamas amonio sulfatas iki atitinkamo galutinio įsotinio laipsnio. Po 60 min. išsėdę baltymai surenkami centrifuguojant 20000 × g, 40 min. 4 °C temperatūroje. Gautos baltyminės nuosėdos tirpinamos Tris-HCl pH 7,8 buferiniame tirpale ir laikomos 4 °C temperatūroje (su nežymiomis modifikacijomis<sup>214</sup>).

### **2.2.14. Baltymų dializė**

Grubus baltymų ekstraktas (2.2.13.) supilamas į dializės membraną SnakeSkin<sup>TM</sup> Dialysis Tubing 3,5k MWCO (Thermo Fisher Scientific). Membrana panardinama į 10× didesnę 50 mM Tris-HCl pH 7,8 buferinio tirpalo tūrį nei dializės membranoje esantis grubaus baltymų ekstrakto tūris. Inkubuojama 24 val. kas 8 val. pakeičiant seną buferinį tirpalą nauju.

### **2.2.15. Baltymų koncentravimas**

Po dializės (2.2.14.) tirpalas su ištirpusiomis baltyminėmis nuosėdomis koncentruojamas PEG 35000 iki reikiamo sukcentravimo lygio. Po koncentracijos grubus baltymų preparatas laikomas 4 °C ar -20 °C temperatūroje.

### **2.2.16. Mėginių paruošimas baltymų elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis**

Baltymų mėginiui elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis paruošti naudojamas 4× baltymų užnešimo buferinis tirpalas (40 % glicerolis, 240 mM Tris-HCl pH 6,8, 8 % NDS, 0,04 % bromfenolio mėlynasis).

### **2.2.17. Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis.**

*Glicininė elektroforezė.* Baltymų analizė atliekama vertikaliame elektroforezės aparate, naudojant Laemmli buferinių tirpalų ir gelių sistemą<sup>215</sup>. NDS-poliakrilamidinis gelis suformuojamas tarp dviejų stiklų, kuriuos skiria 0,75 mm arba 1 mm storio tarpinė. Pirmiausia paruošiamas ir užpilamas 12 % frakcionuojantis gelis (375 mM Tris-HCl, 0,1 % NDS, pH 8,8), ant jo viršaus užpilama distiliuoto vandens ir laikoma 30-40 min. kambario temperatūroje. Geliui sustingus, vanduo atsargiai nupilamas ir užpilamas 5 % koncentruojantis gelis (125 mM Tris-HCl, 0,1 % NDS, pH 6,8), ir įstatomos šukos, kurios geliui sustingus yra atsargiai ištraukiamos. Naudojamas akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido santykis 37,5:1. Sustingęs gelis perkeliamas į elektroforezės aparatą ir užpilamas Tris-glicino-NDS elektroforezės buferiniu tirpalu (25 mM Tris-HCl, 190 mM glicinas, 0,1 % NDS, pH 8,3). Į šulinėlius įnešamas analizei reikalingas baltymo kiekis (2.2.16.), į atskirą šulinėlį įnešama 5-10 µL baltymų standartų mišinio. Elektroforezė vykdoma esant 20 mA srovės stipriui, o kai bromfenolio dažas pereina koncentruojantį gelį – 40 mA. Bromfenolio dažui pasiekus gelio apačią, elektroforezė yra stabdoma. Po elektroforezės išfrakcionuoti baltymai dažomi: gelis 3 kartus po 10 min. plaunamas distiliuotu vandeniu. Po to gelis užpilamas PageBlue<sup>TM</sup> Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific) dažu ir paliekamas per naktį dažytis. Po dažymo nesurištas dažas nuplaunamas vandeniu, o nudažytas gelis fotografuojamas (MiniBIS Pro).

*Tricininė elektroforezė.* Gelių paruošimas ir elektroforezė vykdoma pagal glicininės elektroforezės aprašymą. Naudojamas 4 % koncentruojantis

gelis (750 mM Tris-HCl, 0,075 % NDS, pH 8,45), akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido santykis 32:1 ir 16 % frakcionuojantis gelis (1 M Tris-HCl, 0,1 % NDS, 3 % glicerolis, pH 8,45), akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido santykis 32:1. Baltymų mėginiai sumaišomi 1:3 su mėginio buferiniu tirpalu (150 mM Tris-HCl, 12 % NDS, 30 % glicerolis, pH 7). Elektroforezės buferinių tirpalų sudėtis: anodo buferis – 100 mM Tris-HCl, pH 8,9; katodo buferis – 100 mM Tris-HCl, 100 mM tricinas, 0,1 % NDS, pH 8,25.

*Tricininė elektroforezė su etilenglikoliu.* Gelių paruošimas ir elektroforezė vykdoma pagal glicininės elektroforezės aprašymą. Naudojamas 5 % koncentruojantis gelis (750 mM Tris-HCl, 0,1 % NDS, pH 8,45), akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido santykis 29:1 ir 18 % frakcionuojantis gelis (750 mM Tris-HCl, 0,1 % NDS, 19,2 % etilenglikolis, pH 8,45), akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido santykis 19:1. Baltymų mėginiai sumaišomi 1:1 su mėginio buferiniu tirpalu (30 mM Tris-HCl, 10 % NDS, 20 % glicerolis, pH 8,5). Elektroforezės buferinio tirpalo sudėtis: 100 mM Tris-HCl, 100 mM tricinas, 0,1 % NDS, pH 8,45.

### **2.2.18. Aktyvumo gelyje įvertinimas – zimografija**

Po baltymų elektroforezės (2.2.17.), siekiant atplauti NDS ir renatūruoti baltymus, gelis inkubuojamas 50 mM Tris-HCl pH 7,8 buferiniame tirpale su 2,5 % Triton X-100. Po to gelis 30 min. dar kartą inkubuojamas tame pačiame buferiniame tirpale be Triton X-100. Po baltymų renatūracijos gelis užpilamas agarizuota B terpe ir paliekamas per naktį atitinkamoje temperatūroje iki kol bus galima vizualiai identifikuoti skaidrias zonas (su nežymiomis modifikacijomis<sup>216</sup>).

### **2.2.19. Keratinolizinio aktyvumo nustatymas**

Fermentas inkubuojamas tinkamos pH reikšmės Tris-HCl buferiniame tirpale (galutinis reakcijos tūris – 1 mL) su 4 mg keratino azūro arba vilnos



keratino atitinkamoje temperatūroje 60 min. 1100 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu, naudojant Biosan termomikserį. Reakcija stabdoma pridodant 400 µL 10 % TCA. Mėginiai inkubuojami 4 °C temperatūroje 15 min. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 16000 × g greičiu 5 min. Matuojamas supernatanto optinis tankis: keratino azūras – 595 nm bangos ilgis, vilnos keratinas – 280 nm bangos ilgis. Vienu keratinazės aktyvumo vienetu laikomas 0,001 optinio tankio pokytis per 60 min. (su nežymiomis modifikacijomis<sup>217</sup>).

#### **2.2.20. Temperatūros įtakos aktyvumui ir stabilumui nustatymas**

Optimalios fermento veikimo temperatūros nustatymui reakcija vykdoma standartinėmis sąlygomis (2.2.19.) skirtingose temperatūrose. Po reakcijos matuojamas optinis tankis.

Siekiant nustatyti temperatūros įtaką baltymo aktyvumui, fermentinis tirpalas inkubuojamas pasirinktose temperatūrose 4 val., kas valandą paimant mėginį ir įvertinant liekamąjį fermentinį aktyvumą vykdant standartinę (2.2.19.) reakciją. Kaip kontrolė naudojamas neinkubuotas baltymų ekstraktas.

#### **2.2.21. pH įtakos aktyvumui ir stabilumui nustatymas**

Optimalaus pH nustatymui reakcija vykdoma standartinėmis sąlygomis (2.2.19.) skirtingų pH buferiniuose tirpaluose (50 mM piperazinas pH 5-6; 50 mM Tris-HCl pH 7-9; 50 mM natrio bikarbonatas pH 10-11; 50 mM kalio chloridas/NaOH pH 12). Po reakcijos matuojamas optinis tankis.

Siekiant nustatyti pH įtaką baltymo aktyvumui fermentinis tirpalas inkubuojamas 60 min. kambario temperatūroje skirtinguose pH (5-12). Po inkubacijos liekamasis fermentinis aktyvumas įvertinamas vykdant standartinę (2.2.19.) reakciją. Kaip kontrolė naudojamas neinkubuotas baltymų ekstraktas.

### **2.2.22. Metalų jonų, detergentų, organinių tirpiklių ir slopiklių įtakos nustatymas**

Siekiant nustatyti metalų jonų ( $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ), detergentų (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Triton X-100, Triton X-305, Brij 35, Brij 58, NDS), organinių tirpiklių (DMF, DMSO, metanolis, propanolis, metanolis) ir slopiklių (leupeptinas, fenantrolinas, Pefabloc<sup>®</sup> SC, EDTA, EGTA, DTT,  $\beta$ -merkaptobenatolis) įtaką fermento aktyvumui, fermentinis tirpalas kartu su tiriamuoju veiksmu inkubuojamas 60 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos liekamasis fermentinis aktyvumas įvertinamas vykdant standartinę (2.2.19.) reakciją. Kaip kontrolė naudojamas neinkubuotas baltymų ekstraktas.

### **2.2.23. Substratinio savitumo nustatymas**

Siekiant nustatyti substratinį savitumą, fermentinė reakcija vykdoma standartinėmis sąlygomis (2.2.19.) naudojant tirpius (BSA, Na-kazeinatas, želatina (Bio-Rad)) ir netirpius (vilnos keratinas ir kolagenas (Proteina)) substratus, kurių galutinė koncentracija reakcijos tirpale yra  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ . Po reakcijos matuojamas supernatanto optinis tankis: ( $A_{595}$ ) substratu naudojant keratino azūrą; ( $A_{280}$ ) substratu naudojant BSA, Na-kazeiną, želatiną, vilnos keratiną ir kolageną. Vienu keratinazės aktyvumo vienetu laikomas 0,001 ( $A_{595}$  ar  $A_{280}$ ) optinio tankio pokytis.

### **2.2.24. Tikslinių genų klonavimas**

Gauti tiksliniai PGR produktai (2.2.4.) išvalyti naudojant PGR produktų valymo rinkinį ir tiesiogiai liguoti į pTZ57R/T klonavimo vektorių (2.2.7.) (Thermo Fisher Scientific). Ligavimo reakcija vykdyta pagal gamintojo rekomendacijas. Po reakcijos gautas ligato mišinys inaktyvuotas karščiu ir elektroporacijos būdu transformuotas į elektrokompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$  ląsteles (2.2.9.). Po transformacijos ląstelės išsėtos ant selektyvios standžios LB terpės su keratinu ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ), ampicilinu ( $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ir X-gal ( $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ )

<sup>1</sup>). Teigiami klonai atrinkti pagal mėlynų/baltų kolonijų metodą. Plazmidės pagausintos ląsteles užsėjant į 5 mL skystos LB terpės su ampicilinu ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (2.2.10.). Plazmidės išskirtos naudojant plazmidžių skyrimo rinkinį ir patikrintos DNR elektroforezės agaroziniame gelyje metodu (2.2.3.).

Išskirtos plazmidės patikrintos restrikcinės analizės būdu (2.2.6.). Linearizuota naudojant vieną restrikcijos endonukleazę *XhoI* ir dvi restrikcijos endonukleazes (dviguba restrikcija, iškerpant įterptą fragmentą) *NdeI* ir *XhoI*.

Po dvigubos restrikcijos gauti DNR fragmentai išskirti iš gelio ir liguoti į ligavimo reakcijai paruoštą (sukarpytas *XhoI* ir *NdeI* restriktazėmis ir defosforilintas (2.2.6.)) pET-28c(+) raiškos vektorių. Po reakcijos gautas ligato mišinys elektroporacijos būdu transformuotas į elektrokompetentines *E. coli* DH5a ląsteles (2.2.9.). Po transformacijos ląstelės išsėtos ant selektyvios standžios LB terpės su keratinu ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) ir kanamicinu ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Užaugusių transformantų kolonijos užsėtos į 5 mL skystos LB terpės su kanamicinu ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Plazmidės išskirtos naudojant plazmidžių skyrimo rinkinį (2.2.10.) ir patikrintos DNR elektroforezės agaroziniame gelyje metodu (2.2.3.).

Gautos plazmidės linearizuotos *XhoI* restriktaze (2.2.6.). Patikrintos plazmidės kitame etape transformuojamos elektroporacijos būdu į raiškai skirtą *E. coli* BL21 (DE3) kamieną (2.2.9.). Šis kamienas turi T7 RNR polimerazę, kuri atpažįstą pET-28c(+) vektoriuje esantį T7 promotorių.

### **2.2.25. Tikslinių genų raiška**

*E. coli* BL21 (DE3) ir *E. coli* Rosetta DE3 pLysS transformantai, turintys pET raiškos sistemos vektorių su tiksliniu klonuotu genu yra auginami LB terpėje su atitinkamu antibiotiku 12-16 val.  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje, maišant  $180 \text{ aps. min.}^{-1}$  greičiu. Po auginimo 1 % ląstelių suspensijos yra perkeliamas į šviežią LB terpę su atitinkamu antibiotiku. Ląstelės auginamos tomis pačiomis sąlygomis iki kol pasiekia 0,4 o. v. tankį (600 nm bangos ilgis) (jei nenurodyta kitaip). Pasiekus reikiamą ląstelių tankį, įpilama IPTG iki galutinės 0,01-5 mM

koncentracijos (indukcijos pradžia). Po indukcijos ląstelės auginamos 5 val. (jei nenurodyta kitaip). Kas valandą nuo indukcijos pradžios imami indukuotų ir neindukuotų ląstelių pavyzdžiai taip, kad ląstelių kiekis nulinę valandą (indukcijos pradžioje) ir analizuojamą valandą būtų vienodas.

## **2.2.26. Baltymų gryninimas**

### **2.2.26.1. Rekombinantinių baltymų gryninimas**

Šiame darbe aprašytų rekombinantinių baltymų gryninimas vykdomas taikant imobilizuotų metalų jonų giminingumo chromatografiją (Profinity IMAC, Bio-Rad). Gryninimui *E. coli* BL21 (DE3) transformantai, turintys geną, klonuotą į pET šeimos vektorius, auginami LB terpėje su atitinkamu antibiotiku. Indukcija vykdoma nustatytais optimaliomis sąlygomis. Ląstelės surenkamos centrifuguojant  $8500 \times g$  15 min. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos ir praplaunamos 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 7,8). Ląstelės surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis ir suspenduojamos 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 7,8) santykiu 1:4 (ląstelės:buferinis tirpalas). Vėliau ląstelės centrifuguojamos  $8000 \times g$  15 min., praplaunamos 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 8), vėl nucentrifuguojamos, suspenduojamos anksčiau minėtame buferiniame tirpale ir ardomos ultragarsu 15 min. naudojant 10 sek. : 20 sek. (ardymas:šaldymas) intervalą (Sonics). Po ardymo mėginys centrifuguojamas  $15000 \times g$  10 min. – taip atskiriamos tirpi ir netirpi baltymų frakcijos. Gryninimas atliekamas naudojant frakciją, kurioje identifikuotas rekombinantinis baltymas (2.2.19.).

Baltymų gryninimui iš netirpių baltymų frakcijos naudojami buferiniai tirpalai, kurių sudėtyje yra 6 M karbamido. Gautos baltyminės nuosėdos suspenduojamos su plovimo buferiniu tirpalu A1 (50 mM Tris-HCl, 1 % Triton X-100, pH 8) santykiu 1:10 ir inkubuojama 60 min. kambario temperatūroje. Baltyminės nuosėdos surenkamos centrifuguojant  $12000 \times g$  10 min. ir suspenduojamos su plovimo buferiniu tirpalu A2 (50 mM Tris-HCl, pH 8) santykiu 1:10. Po inkubacijos (60 min. kambario temperatūroje) baltyminės

nuosėdos surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis ir tirpinamos buferiniame tirpale A3 (50 mM Tris-HCl, 6 M karbamido, pH 8) 60 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos tirpių baltymų frakcija atskiriama centrifuguojant  $12000 \times g$  10 min. Paruoštas tirpių baltymų gryninimo mėginys filtruojamas ir naudojamas chromatografijai. Gryninimas atliekamas pagal gamintojo rekomendacijas (Bio-Rad) su nežymiomis modifikacijomis. Gryninimui naudojama 50 mM Tris-HCl (pH 8) buferinis tirpalas, papildytas imidazolu ir karbamidu. Imidazolo koncentracija plovimo buferiniame tirpale – 10 mM, eliucijos – nuo 50 mM iki 500 mM.

### **2.2.26.2. Natyvių baltymų gryninimas**

Grubus sekretomo baltymų ekstraktas (2.2.15.) filtruojamas pro  $0,22 \mu\text{m}$  (porų dydis) membraną, siekiant pašalinti netirpius kompleksus. Paruošiama jonų mainų kolonėlė ( $2,5 \text{ cm} \times 12 \text{ cm}$ ), kuri užpildoma DEAE sefarozės sorbentu (GE Healthcare). Chromatografinė kolonėlė lygsvarinama  $10 \times$  kolonėlės tūrių buferiniu tirpalu B (25 mM Tris-HCl, pH 8). Eliucija vykdoma laiptiniu gradientu, naudojant buferinį tirpalą B su NaCl (100 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM, 1000 mM). Gautos aktyvios baltymų frakcijos apjungiamos, dializuojamos ir koncentruojamos. Sukoncentruotas baltymų tirpalas naudojamas gel-filtracijoje.

Gel-filtracijai paruošiama kolonėlė ( $1 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ ), kuri užpildoma Bio-Gel P-60 sorbentu (Bio-Rad). Chromatografinė kolonėlė lygsvarinama  $10 \times$  kolonėlės tūrių buferiniu tirpalu B1 (50 mM Tris-HCl, pH 8). Chromatografija vykdoma naudojant buferinį tirpalą B1. Aktyvios frakcijos apjungiamos, dializuojamos ir koncentruojamos.

### **2.2.26.3. Plonasluoksnė chromatografija**

Fermentas ar sekretomo baltymai inkubuojami tinkamos pH reikšmės 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (galutinis reakcijos tūris – 1 mL) su 10 mg vilnos keratino atitinkamoje temperatūroje 12 val.  $1100 \text{ aps. min.}^{-1}$  greičiu, naudojant Biosan termomikserį. Gauti mėginiai sumaišomi su fluorescaminu (1

mg mL<sup>-1</sup>) santykiu 9:1. Paruošti mėginiai užnešami ant chromatografinės plokštelės (ProteoChrom<sup>®</sup> HPTCL, Merck) stikliniu kapiliaru (5, 10, 20 µL). Naudojama tirpiklių sistema: 2-butanolis/piridinas/acto r./vanduo (santykis 30:20:6:24)<sup>218-220</sup>. Chromatografija vykdoma pagal gamintojo rekomendacijas. Po chromatografijos, mėginiai analizuojami plokštelę apšvietus ultravioletiniais spinduliais (MiniBIS Pro).

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe yra tiriami ir aprašomi keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai – keratinazės. Naujų keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų įvairovės, savybių ir pritaikymo galimybių pramonėje tyrimai yra būtini, siekiant sukurti šiuolaikinius ir ekonomiškai tvarius biodegradacijos procesus.

Ilgą laiką baltymų inžinerija yra laikoma pagrindiniu įrankiu biotechnologijoje, siekiant sukurti gamtoje neegzistuojančius ar patobulintus fermentus. Šie fermentai yra pritaikomi tiek pramoninėje biotechnologijoje, tiek ir kitose srityse.

Šalia termofilinių mikroorganizmų fermentų pramoninėje biotechnologijoje taip pat didelis dėmesys skiriamas fermentams, gebantiems veikti žemesnėse temperatūrose. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčios peptidazės iš *Bacillus* genties, gebančios hidrolizuoti substratus žemesnėse temperatūrose, galėtų būti pritaikytos keratino turinčių substratų hidrolizei iki peptidų ar aminorūgščių.

#### 3.1. Termofilinių mikroorganizmų sekretuojamos keratinolizinės peptidazės

*Geobacillus* genties bakterijos pasižymi dideliu biotechnologiniu potencialu ir gali būti šaltinis naujų keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų paieškai. Šių bakterijų optimali augimo temperatūra yra ~60 °C, todėl iš jų išskirti fermentai pasižymi stabilumu ir aktyvumu aukštoje temperatūroje. Šios išskirtinės savybės leidžia tokius baltymus panaudoti pramoninėje biotechnologijoje, kurioje dauguma procesų vyksta aukštesnėje nei 45 °C temperatūroje<sup>221</sup>.

### **3.1.1. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų paieška**

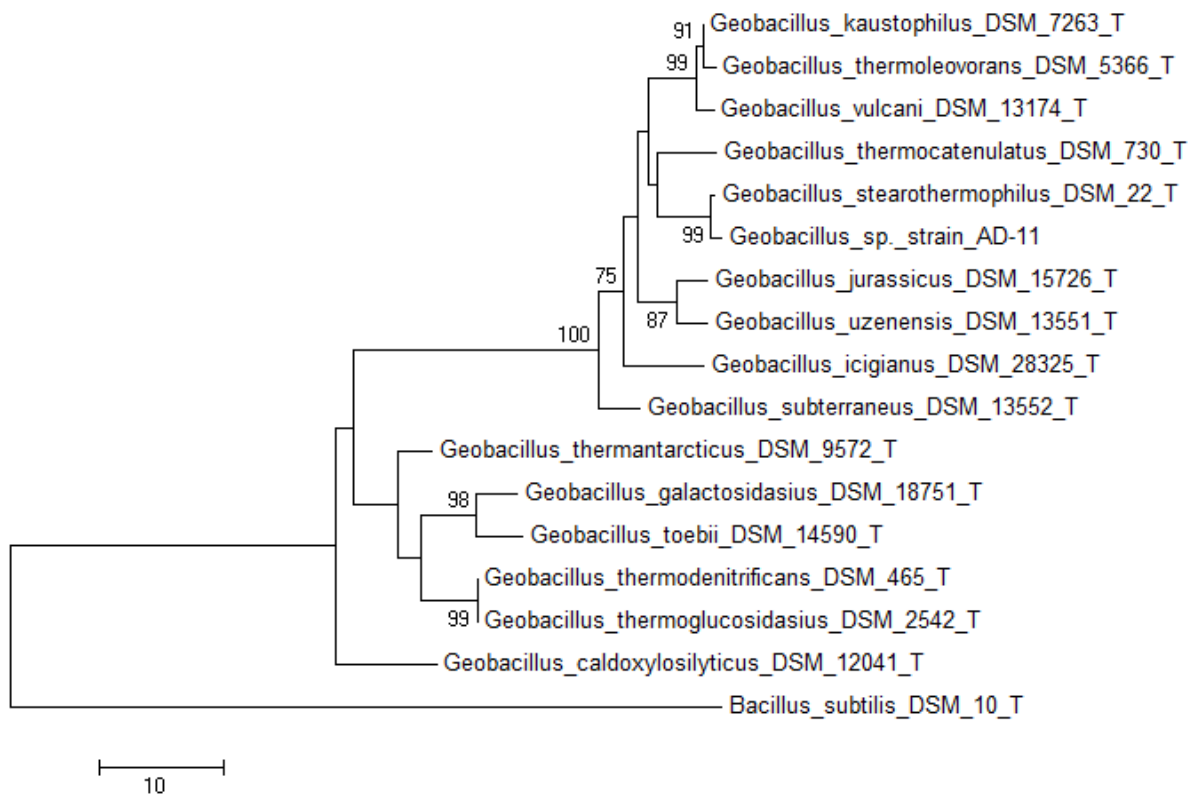
Naujų, keratinazes sekretuojančių termofilinių mikroorganizmų identifikavimui, buvo patikrinti 57 termofiliniai Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros (GMF, VU) mikroorganizmų kolekcijos kamienai. Naudota selektyvi mitybinė B terpė, kurioje vilnos keratinas yra pagrindinis anglies, azoto ir energijos šaltinis. Būtent tokios terpės sudėties naudojimas leidžia efektyviai identifikuoti keratinolizinius mikroorganizmus. Vienas pagrindinių atrankos kriterijų – aplink koloniją susidariusios skaidrios zonos dydis. Šios zonos atsiranda netirpų vilnos keratiną hidrolizuojant iki tirpių produktų. Įvertinus gautus rezultatus buvo pasirinktas vienas termofilinis kamienas (AD-11), kuris demonstravo efektyviausiai veikiančią keratino hidrolizės mechanizmą.

### **3.1.2. Termofilinio AD-11 kamieno identifikavimas**

Siekiant identifikuoti ir priskirti genčiai AD-11 kamieną, buvo užauginta bakterijų biomasė ir išskirta jų suminė DNR. Polimerazinės grandininės reakcijos metu, naudojant universalius 16S rDNR pradmenis (27F ir 1495R) buvo pagausintas kamieno 16S rDNR genas. Atlikus gautų sekoskaitos rezultatų analizę, naudojant BLASTn algoritmą (NCBI), nustatytas AD-11 kamieno giminingumas *Geobacillus stearothermophilus* rūšiai (99 % panašumas)<sup>222, 223</sup>. *Geobacillus* sp. AD-11 16S rDNR seka pateikta į NCBI duomenų bazę (GenBank: KJ783443.1).

Siekiant nustatyti *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno filogenetinę padėtį tarp kitų *Geobacillus* genties bakterijų, nubraižytas filogenetis medis naudojant tipinius geobacilų kamienus (3.1 pav.). Filogenetinio medžio rezultatų analizė patvirtina AD-11 kamieno priklausomybę geobaciloms ir rodo didžiausią panašumą tipinei *G. stearothermophilus* DSM 22<sup>T</sup> rūšiai.





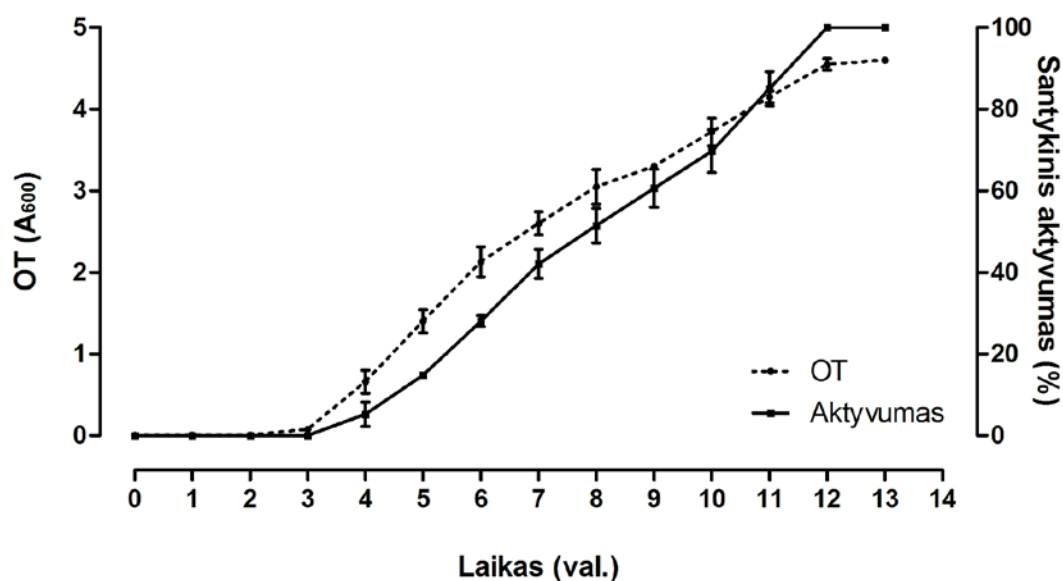
**3.1 pav.** *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno filogenetinė padėtis, remiantis 16S rDNR sekų analize. Brūkšnys žymi 10 nukleotidų pasikeitimą 1000 nukleotidų. Naudotas MEGA 7.0 programinis paketas, NJ metodas<sup>224-227</sup>.

Norint priskirti AD-11 kamieną *G. stearothermophilus* rūšiai yra reikalingi papildomi polifazinės taksonomijos tyrimai<sup>228, 229</sup>. Didesnis nei 97 % 16S rDNR sekų panašumas teoriškai leidžia priskirti kamieną rūšiai, tačiau artimai giminingų rūšių atveju, kai jų 16S rDNR sekų panašumas yra didesnis nei 97 %, yra būtina DNR-DNR hibridizacija ir šiuo metodu gauti rezultatai yra lemiantys. Pagrindinis šio darbo tikslas yra fermentų – keratinazių paieška ir analizė, todėl dalinio AD-11 kamieno giminingumo geobaciloms pakanka.

### 3.1.3. AD-11 kamieno augimo dinamikos analizė

Dažniausiai keratinazės yra sekretuojamos į augimo terpę, tačiau yra nustatyta, kad šie fermentai gali likti prikibę prie ląstelės sienelės ar būti viduląsteliniai<sup>2</sup>. Taip pat yra aprašytos keratinolizinės peptidazės, kurios yra indukuojamos terpėje esančių komponentų ar sintetamos nuolat

(nepriklausomai nuo terpėje esančių komponentų). Buvo siekiama išsiaiškinti: fermento sintezės ir sekrecijos pradžia; fermento koncentraciją (aktyvumą); fermento degradaciją (stabilumą); auginimo terpės įtaką fermento sintezei; augimo pabaigos laiką. Šių faktorių nustatymui buvo pasirinktos dvi mitybinės terpės: kompleksinė A (3.2 pav.) ir sintetinė B (3.3 pav.). Terpės sudarytos remiantis literatūroje esančiomis rekomendacijomis su nežymiomis modifikacijomis<sup>46, 56, 163</sup>.

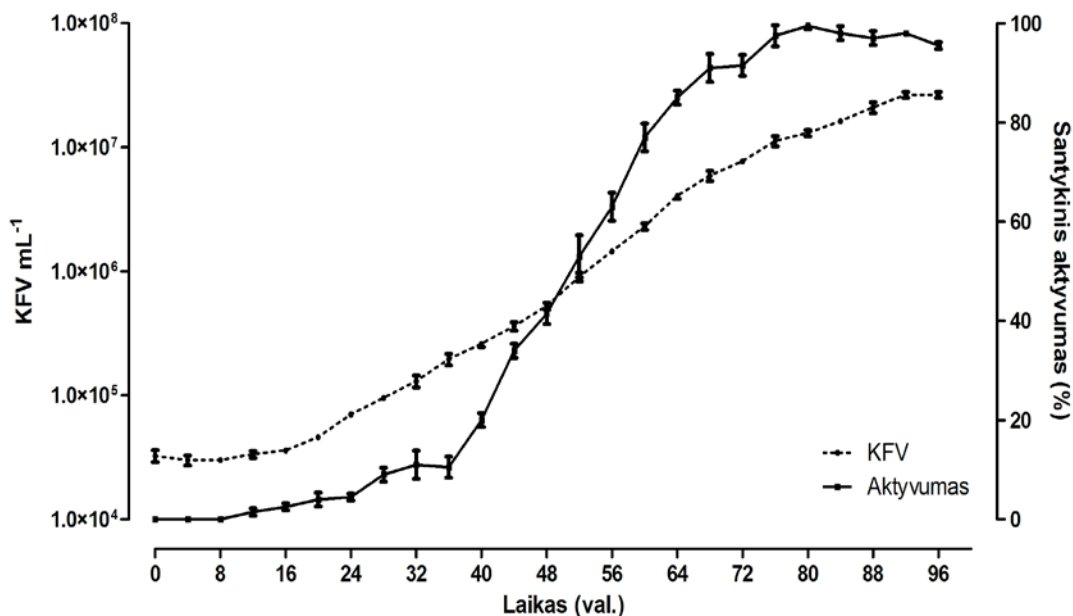


**3.2 pav.** AD-11 kamieno augimo dinamika kompleksinėje A terpėje. 100 % santykinis aktyvumas –  $211 \pm 2$  U mL<sup>-1</sup>.

Iš 3.2 pav. matyti, kad ląstelės į stacionarią fazę pereina 12 augimo valandą. Tuo metu pasiekiamas didžiausias ląstelių optinis tankis – 4,6 o. v. ( $7,5$  g L<sup>-1</sup> drėgnos biomasės). Keratinolizinis aktyvumas visą ląstelių augimo laiką tolygiai didėja ir 12 augimo valandą pasiekiamas maksimalus fermentinis aktyvumas. Tokie rezultatai leidžia teigti, kad keratinolizinė peptidazė gali būti sintetinama nuolat ir jos kiekis augimo terpėje tiesiogiai priklauso nuo ląstelių skaičiaus. Ląstelių auginimas turėtų būti nutraukiamas vos tik ląstelėms perėjus į stacionarią fazę – 12 augimo valandą, nes po to gali sekti ląstelių lizė ir proteazių kiekio padidėjimas terpėje, o tai galėtų lemti tikslinio fermento kiekio sumažėjimą (jo degradaciją). Apibendrinant:

- Fermento sintezės ir sekrecijos pradžia – fermentinis aktyvumas detektuojamas praėjus 4 valandoms po inokuliavimo;
- Fermento aktyvumas – maksimalus fermento aktyvumas pasiekiamas 12 augimo valandą;
- Fermento degradacija (stabilumas) – tikėtina, kad fermentas gali būti degraduojamas po 12 augimo valandos, nes 13 augimo valandą detektuojamas mažesnis fermentinis aktyvumas;
- Augimo terpės įtaka fermento sintezei – nenustatyta terpės komponentų įtaka fermento sintezei, nes fermentinis aktyvumas tolygiai auga didėjant ląstelių skaičiui. Fermentas gali būti sintetinamas nuolat, tačiau šios hipotezės patikrinimui, ląstelės turi būti auginamos sintetinėje terpėje;
- Augimo pabaigos laikas – auginimas turėtų būti nutraukiamas 12-14 augimo valandą. Tokios valandų ribos siūlomos atsižvelgiant į 3.2 pav. matomą 2-3 valandų *lag* ląstelių augimo fazę. Rekomendacija: auginimo procesą nutraukti įvertinus ląstelių augimo dinamiką arba pasiekus maksimalų optinį tankį ~4,6 o. v.

Dažnai vykdant fermentines reakcijas yra naudojamas kultūros supernatantas. Tokiu atveju yra svarbu, kad supernatante būtų kuo mažiau šalutinių produktų – terpės komponentų. Šiuo atveju yra siūloma naudoti sintetines augimo terpes, sudarytas iš bazinės dalies – neorganinių druskų ir žinomo kiekio anglies šaltinio. Remiantis rekomendacijomis buvo sukurta sintetinė terpė B<sup>44</sup>. AD-11 kamieno augimo dinamika pateikta 3.3 pav.



**3.3 pav.** AD-11 kamieno augimo dinamika sintetinėje B terpėje. 100 % santykinis aktyvumas –  $291 \pm 13,5 \text{ U mL}^{-1}$ .

AD-11 kamienas auginamas indukuojamoje sintetinėje terpėje B pagal literatūroje esančias rekomendacijas. Terpė papildyta vilnos keratinu, kaip pagrindiniu anglies, azoto, sieros ir energijos šaltiniu. Ląstelių augimas buvo įvertintas skaičiuojant KFU, kadangi terpėje naudojamas netirpus keratinas, kuris iškraipo spektrofotometru matuojamus rezultatus.

3.3 pav. matyti, kad ląstelių stacionari fazė pasiekama 88-92 augimo valandą, esant  $\sim 2,05 \times 10^7$  ląst.  $\text{mL}^{-1}$ . Fermentinis aktyvumas intensyviai pradeda didėti nuo 36 augimo valandos ir maksimalų aktyvumą (100 %) pasiekia 80 augimo valandą. Fermentinio aktyvumo padidėjimas stebimas ląstelių eksponentinės fazės pradžioje ir viduryje. Šie rezultatai nestebina, nes ląstelių augimui ir dalijimuisi reikalinga keratinazė ar proteolizinių fermentų kompleksas, kuris efektyviai hidrolizuotų netirpų keratiną iki lengvai įsisavinamų peptidų ar oligopeptidų<sup>230, 231</sup>. Apibendrinant:

- Fermento sintezės ir sekrecijos pradžia – fermentinis aktyvumas detektuojamas praėjus 12 valandų po inokuliavimo;
- Fermento aktyvumas – maksimalus fermento aktyvumas pasiekiamas 80 augimo valandą;

- Fermento degradacija (stabilumas) – tikėtina, kad fermentas yra silpnai degraduojamas arba natūraliai praranda savo natyvią konformaciją, nes vertinant augimo laikotarpį tarp 80 val. ir 96 val. – prarandama tik apie 3 % aktyvumo;
- Augimo terpės įtaka fermento sintezei – nustatyta, kad vilnos keratinas veikia indukuojančiai; fermento kiekis nėra tiesiogiai proporcingas ląstelių skaičiui.
- Augimo pabaigos laikas – auginimas turėtų būti nutraukiamas 80-92 augimo valandą. Rekomendacija: ląsteles galima auginti 3 arba 4 paras. Tokios auginimo sąlygos leidžia lengviau planuoti ilgalaikius eksperimentus.

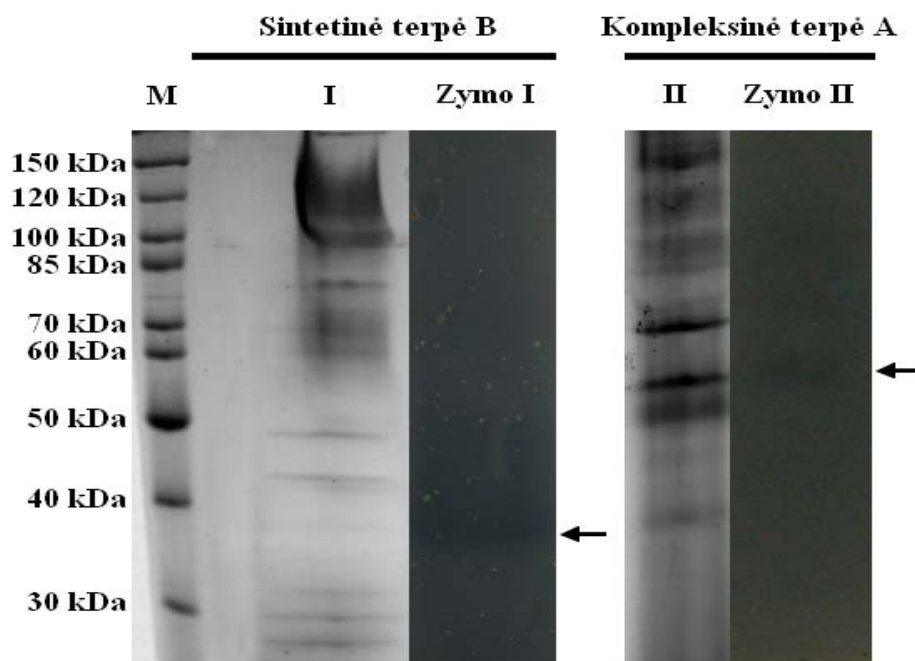
Auginant ląsteles kompleksinėje A terpėje, per 12 val. yra pasiekiamas  $211 \pm 2$  U mL<sup>-1</sup> fermentinis aktyvumas, o sintetinėje B terpėje per 80 val. –  $291 \pm 13,5$  U mL<sup>-1</sup> fermentinis aktyvumas. Sintetinė terpė mums leidžia gauti 38 % daugiau fermento, tačiau per 6,7 karto ilgesnį laiko tarpą. Rekomendacija: siekiant gauti grynesnį keratinolizinį fermentą ar komerciškai naudoti kultūros supernatantą, siūloma AD-11 kamieną auginti sintetinėje B terpėje. Tokiu būdu išvengiama terpės priemaišų ir sunaudojama mažiau resursų, reikalingų paruošti didelį kiekį mitybinės terpės.

### **3.1.4. AD-11 kamieno sekretuojamos keratinazės produkavimas**

Siekiant dalinai charakterizuoti AD-11 sintetinamą keratinolizinę peptidazę, AD-11 kamienas buvo auginamas pagal anksčiau nustatytas optimalias keratinazės produkavimo sąlygas (3.1.3.). Gautas ląstelių kultūros supernatantas naudotas baltymų išsodinimui (2.2.13.). Išsodinti baltymai tirpinti 50 mM Tris-HCl pH 7,8 buferiniame tirpale. Vykdyta dializė (2.2.14.) ir koncentravimas (2.2.15.). Sukoncentruoti grubūs baltymų ekstraktai išfrakcionuoti NDS-PAGE (2.2.17.).

Analizuojant gautus baltymų profilius (3.4 pav.) nustatyta, kad didesnis baltymų kiekis ir įvairovė gaunama AD-11 kamieną auginant kompleksinėje A terpėje. Šie rezultatai gali būti susiję su tuo, kad terpė yra praturtinta organinės kilmės mitybinėmis medžiagomis. Vykdamas baltymų išsodinimą, kartu išsėda ir baltyminės kilmės terpės komponentai. Analizuojant zimogramas, ties maždaug 36 kDa (3.4 pav. Zymo I) ir 57 kDa (3.4 pav. Zymo II) baltymų molekulinės masės žymeniu (sugretinus zimogramą su poliakrilamidiniu geliu) matomos skaidrios zonos, kurios leidžia identifikuoti keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčius baltymus.

Svarbu pastebėti, kad naudojant skirtingas auginimo terpes yra gaunami du skirtingo dydžio baltymai. Identifikuoti fermentai pavadinti NatGEOker36 (natyvi *Geobacillus* keratinazė) ir NatGEOker57. Literatūroje yra aprašyta keletas mikroorganizmų rūšių, kurios geba sintetinti skirtingas keratinolizines peptidazes<sup>52, 79, 232, 233</sup>.



**3.4 pav.** Baltymų elektroforezė ir zimograma. M – baltymų standartų mišinys PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); I – sekretomas, gautas naudojant B terpę; II – sekretomas, gautas naudojant A terpę; Zymo I ir Zymo II – zimogramos; Juodos rodyklės žymi skaidrias zonas. Naudota 200 mL kultūros supernatanto. Sukoncentruota iki 2 mL galutinio tūrio.

Gauti rezultatai ir jų dalinė analizė neleidžia teigti, kad *Geobacillus* sp. AD-11 kamienas geba sintetinti ir sekretuoti dviejų tipų skirtingas keratinolizines peptidazes. Tokių duomenų literatūroje nėra, tačiau yra aprašyti mikroorganizmai, kurių keratinazės gali formuoti funkciškai aktyvius dimerus<sup>234</sup> ar oligomerus<sup>50</sup>. Šiuo atveju negalima teigti, kad NatGEOker gali formuoti dimerinę struktūrą ir būti sintetinamas terpėje esant tam tikrų organinės kilmės medžiagų, nes baltymo NatGEOker57 molekulinė masė neatitinka dviejų NatGEOker36 suminės molekulinės masės (jei NatGEOker36 laikysime monomeru). Iškeltos hipotezės:

- NatGEOker gali formuoti dimerinį struktūrinį vienetą;
- NatGEOker36 ir NatGEOker57 baltymai yra transliuojami nuo vieno transkripto;
- NatGEOker36 ir NatGEOker57 baltymai yra transliuojami nuo dviejų skirtingų transkriptų;
- Mitybinės terpės komponentai lemia NatGEOker36 arba NatGEOker57 baltymo sintezę.

Tam, kad patvirtinti arba paneigti išsikeltas hipotezes, reikalingi išsamesni proteominiai NatGEOker36 ir NatGEOker57 tyrimai.

### **3.1.5. Proteominiai NatGEOker baltymų tyrimai**

Proteominiai tyrimai buvo atlikti bendradarbiaujant su Masių spektrometrijos laboratorijos mokslininkas (Biochemijos ir Biofizikos institutas, Lenkijos mokslų akademija, Varšuva, Lenkija). Tiksliniai baltymai, lokalizuoti poliakrilamidiniame gelyje, paveikti tripsinu. Gauti peptidai buvo frakcionuoti skysčių chromatografijos būdu (nano-LC) ir analizuoti ESI-LTQ-Orbitrap masių spektrometru. Baltymų identifikacija vykdyta naudojantis Mascot (Matrix Science) paieškos platforma. Gauti rezultatai pateikti 3.1 lentelėje.

### 3.1 lentelė. Masių spektrometrijos rezultatai.

Baltymas	Peptidai
NatGEOker57 (A mėginys)	TVLPGSLWADVDNQFFASYDAAAVDAHYYAGVVYDYK YHGIPVYGAVLVAHVNDGELSSLSGTLIPNLDK YINTTYSSYYGYYYLQDNTR FLTPVPGNWIYMIDAADGK ALVYYLTPTS NFSQLR QTDELGHTVMR TPSFVSGPLLK STVHYGR NVHGR FEQR
NatGEOker36 (B mėginys)	AACVQAAADLYGSTSQENVSVK AAYLLSQGGVHYGVSVTGIGR NPDWEIGEDIYTPGIAGDALR YTGTQDNGGVHTNSGIINK GVVYDYKKNVHGRLSY SSYYGYYYLQDNTRGS ALVYYLTPTS NFSQLR VAGASTVGVGR NESGAINAMS YGDGDGQTF

Proteominiams tyrimams atlikti buvo pateikti nevalyti baltymų A ir B mėginiai. Dėl šios priežasties mėginyje A nustatyti 138 hipotetiniai baltymai, o mėginyje B – 73 hipotetiniai baltymai. Gautų peptidų analizė parodė, kad A ir B mėginiuose su dideliu patikimumu identifikuojami du proteoliziniai fermentai: 99 % panašumas į termolizaną (M04.001; GeneBank: M21663.1) ir 98 % panašumas į bacilolizaną (M04.014; GeneBank: CP008934.1). Termolizinas jau yra aptartas literatūros apžvalgos 1.1.3. skyrelyje. Bacilolizinas yra *Bacillus* genties bakterijų sintetinas fermentas. Šis fermentas, kaip ir termolizinas, yra priskiriamas metalo proteazių šeimai<sup>235, 236</sup>.

Žinoma, kad termolizinas ir bacilolizinas yra sintetiniami kaip Pre-Pro-fermentai. Termolizino ar į termolizaną panašių baltymų sintezės ir brendimo mechanizmas yra gerai išaiškintas<sup>86</sup>. Teorinė visiškai subrendusio termolizino molekulinė masė yra 35 kDa, o Pro-fermento molekulinė masė – 57 kDa. Eksperimentiškai gauti NatGEOker36 ir NatGEOker57 baltymų dydžiai atitinka teorinius subrendusio termolizino baltymo ir Pro-baltymo dydžius. Masių spektrometrijos rezultatų analizė leidžia teigti, kad A ir B mėginiuose



identifikuotas tas pats, bet skirtingos brendimo stadijos proteolizinis fermentas – termolizinas. 3.1.4 skyrelyje iškeltų hipotezių apibendrinimas:

- NatGEOker gali formuoti dimerinį struktūrinį vienetą – eksperimentų rezultatai patvirtina, kad NatGEOker57 nėra dimerinis baltymas. Dalis A mėginyje gautų peptidų sutampa su Pro-peptido aminorūgščių sekomis;
- NatGEOker36 ir NatGEOker57 baltymai yra transliuojami nuo vieno transkripto – literatūros ir eksperimentų duomenys patvirtina, kad Pre-Pro-fermentas yra transliuojamas nuo vieno transkripto;
- NatGEOker36 ir NatGEOker57 baltymai yra transliuojami nuo dviejų skirtingų transkriptų – hipotezė paneigta;
- Mitybinės terpės komponentai lemia NatGEOker36 arba NatGEOker57 baltymo sintezę – galima teigti, kad šių baltymų sintezė priklauso nuo mitybinės terpės komponentų. Terpės komponentai lemia baltymo brendimo efektyvumą ir/ar sintezės greitį.

Nustačius, kad *Geobacillus* AD-11 kamienas sintetina vieno tipo keratinolizinę peptidazę, jai suteiktas GEOker (*Geobacillus* keratinazė) pavadinimas.

### **3.1.6. GEOker koduojančio geno klonavimas**

#### **3.1.6.1. Klonavimas ir sekų analizė**

Norint sėkmingai vykdyti *geoker* geno raišką, reikalingas geno klonavimas ir jo bioinformatinė analizė. Šiuo tikslu, remiantis NCBI duomenų bazėje esančiomis termolizino ir į termolizina panašių proteazių genų sekomis, buvo sukurti GeoKer-proF ir GeoKer-proR pradmenys. Šie pradmenys skirti pagausinti GEOker koduojantį geną kartu su priešsrovinėmis ir pasrovinėmis sritimis. Gautas DNR fragmentas ir jo analizė pateikta 3.5 pav.

Visos DNR fragmento bioinformatinės analizės ir sekos manipuliacijos atliekamos naudojantis Lasergene 7.1 (DNASTAR, JAV) programos paketais

(*Editseq*, *SeqMan*, *SeqBuilder*). Sėkmingai pagausinus DNR fragmentą ir atlikus jo sekoskaitą nustatyta, kad gautas 1823 bp ilgio fragmentas.

```

5'   GGA AAG CCG CAA AGA GGG AAA AAC GGA AAA TAG GCT GCC GGA TCA GGC CGC ATG TCG CCC GAT CAT   66
      GeoKer-proF
1   TTT CCC AAT ACC CAA TCA AAA TAT ATT GTA ATA AAA TTT TTA TTA GAA TAA ATA ATT TGA AAA TAT   132
1   Pre
5'   AAG AAA GGG GTA AAG GGA ATG AAC AAA CGG GCG ATG CTT GGC GCG ATT GGG TTG GCG TTT GGA TTG   198
      M N K A M L G A I G L A F G L
1   ATG GCT TGG CCG CTC GGG GCT TCA GCG AAG GAA AGA TCA ATG GTG TGG AAC GAA CAG TGG AAG ACG   264
      M A W P L G A S A K E R S M V W N E Q W K T
1   CCA TCG TTC GTT TCT GGT CCG CTG TTA AAA GGC GAG GAT GCT CCG GAA GAA TTG GTT TAC CGT TAT   330
      P S F V S G P L L K T E A P E E L V R Y
1   CTT GAT CAA GAG AAG AAT ACG TTC CAG CTT GGT GGA CAA GCC CGC GAA CGG CTG AGC TTG ATT GGC   396
      L D Q E K N T F Q L G G Q A R E R L S L I G
1   AAA CAA ACG GAT GAA CTC GGC CAT ACG GTC ATG CGT TTT GAA CAG CGC TAT CAC GGC ATC CCA GTG   462
      K Q T D E L G H T V M R F E Q R Y H G I P V
1   TAT GGC GCC GTG CTC GTT GCC CAT GTC AAC GAT GGC GAA TTG TCC TCT TTG TCG GGT ACG CTC ATT   528
      Y G A V L V A D A V T K E R P A A E E G K P T
1   CCG AAT TTG GAC AAA CGA ACG TTG AAA ACA GAA GCT GCC ATT TCC GTT CAA CAA GCG GAA ATG ATC   594
      P N L D K R T L K T E A A I S V Q Q A E M I
1   GCG AAA CAA GAT GTG GCT AAT GCG GTG ACG AAA GAA CGG CCG GCG GCC GAA GAG GGA AAA CCA ACG   660
      A K Q D V A D A V T K E R P A A E E G K P T
1   CGG CTT GTC ATC TAT CCG GAT GGG GAG ACC CCG CGC CTC GCC TAT GAA GTC AAT GTC CGC TTT TTA   726
      R L V I Y P D G E T P R L A Y E V N V R F L
1   ACC CCT GTC CCA GGC AAC TGG ATC TAC ATG ATC GAT GCC GCG GAC GGA AAC GTG TTG AAC AAA TGG   792
      T P V P G N W I Y M I D A A D G N V L N K W
1   AAC CAA ATG GAC GAG CCG AAG CCG GGC GGC GGC CAG TCG GTC GCC GGC GCG TCG ACG GTC GGC GTG   858
      N Q A M D E A K P G G G C Q S V A G A S T V G V
1   GGC CGC GGT GTG TTG GGG GAT CAG AAA TAT ATC AAT ACG ACG TAT TCC TCG TAT TAC GGC TAC TAC   924
      G R G V L G D Q K Y I N T T Y S S Y Y G Y Y
1   TAT TTG CAA GAC AAT ACG CGC GGC AGC GGC ATT TTT ACG TAT GAC GGA CGA AAC CGC ACC GTT TTG   990
      Y L Q D V N T R G S G G C I F T Y D G R N R T V L
1   CCC GGC AGC TTG TGG GCC GAT GGC GAC AAC CAA TTT TTC GCC AGC TAT GAC GCG GCG GCC GTG GAC   1056
      P G S L W A D G D N Q F F A S Y D A A A V D
1   GCC CAT TAT TAC GCC GGC GTC GTG TAT GAT TAC TAC AAA AAT GTG CAC GGC CGG CTG AGC TAT GAC   1122
      A H Y Y A G V Y D Y Y K N V H G R L S Y D
1   GGC AGC AAC GCC GCC ATC CAT TCG ACC GTC CAT TAC GGC CGC GGC TAC AAC AAC GCG TTT TGG AAC   1188
      G S N A A I H S T V H Y G R G Y N N A F W N
1   GGT TCG CAA ATG GTG TAC GGC GAT GGC GAC GGA CAG ACG TTT TTG CCG TTT TCC GGC GGC ATT GAC   1254
      G S Q M V Y G D G D G Q T F L P F S G G I D
1   GTC GTT GGG CAT GAG CTG ACC CAT GCG GTG ACG GAT TAT ACG GCC GGG CTT GTT TAC CAA AAC GAA   1320
      V V G H E L T H A V T D Y T A G L V Y A N E
1   TCC GGC GCC ATC AAT GAA GCG ATG TCC GAT ATT TTC GGC ACG CTC GTG GAG TTC TAC GCC AAC CGC   1386
      S G A I N E A M S D I F G T L V E F Y A N R
1   AAC CCG GAC TGG GAG ATC GGC GAA GAC ATT TAC ACG CCT GGG ATC GCC GGC GAT GCG CTC CGC TCG   1452
      N P D W E I G E D I Y T P G I A G D A L R S
1   ATG TCC GAC CCG GCG AAA TAC GGC GAT CCG GAT CAT TAT TCC AAA CGG TAC ACC GGA ACG CAA GAC   1518
      M S D P A K Y G D P D H Y S K R Y T G T Q D
1   AAC GGC GGC GTC CAT ACA AAC AGC GGC ATC ATC AAT AAA GCG GCG TAT TTG CTC AGC CAA GGC GGC   1584
      N G G V H T N S G I I N K A A Y L L S Q G G
1   GTC CAT TAC GGC GTG AGC GTC ACC GGC ATC GGC GAC AAA ATG GGG AAA ATT TTC TAC CGG GCG   1650
      V H Y G V S V T G I G R D K M G K I F Y R A
1   CTT GTC TAC TAT TTG ACG CCG ACG TCG AAC TTC AGC CAG CTG CGC GCC GCC TGC GTG CAA GCG GCC   1716
      L V Y Y L T P T S N F S Q L R A A C V Q A A
1   GCT GAT TTG TAC GGG TCG ACA AGC CAA GAA GTC AAC TCG GTG AAA CAG GCG TTC AAT GCG GTT GGA   1782
      A D L Y G S T S Q E V N S V K Q A F N A V G
1   GTG TAT TAA GAC GAA TTA AGT TTC TGA CGT CAC GCG TCC CG
      V Y
      GeoKer-proR

```

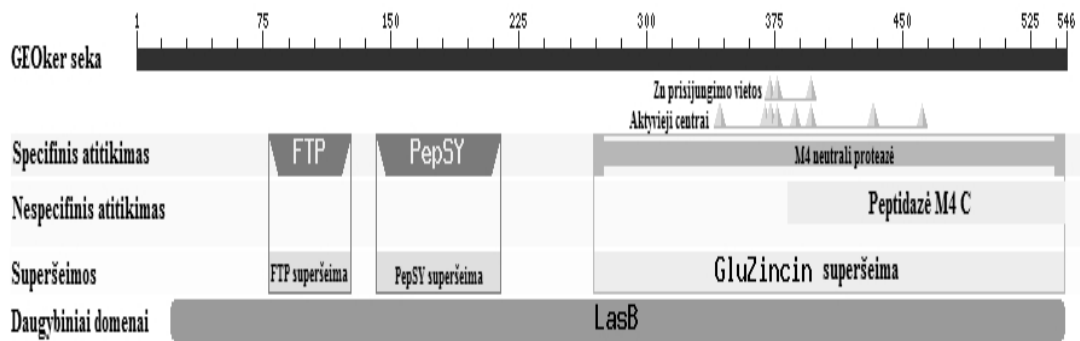
**3.5 pav.** *geoker* geno nukleotidų ir jo koduojamų aminorūgščių sekos. Pre-Pro-fermento (Pre), Pro-fermento (Pro) ir subrendusio fermento (Fermentas) pradžios aminorūgštys pažymėtos laužtinėmis rodyklėmis. Tiesios rodyklės žymi tiesioginio ir atvirkštinio pradmens prisijungimo vietas. Punktyrinė linija pažymėta promotoriaus seka. Rėmelis žymi cinko prisijungimo motyvą. Pilki kvadratai žymi kataliziškai svarbias aminorūgštis.

Priešsrovinių DNR sekų analizei pasinaudota internete esančia promotorių analizės programa ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html))<sup>237</sup>. Nustatyta statistiškai patikimiausia promotoriaus seka: AAT TTT TAT TAG AAT AAA TAA TTT GAA AAT ATA AGA AAG GG. Paskutinis nukleotidas (guaninas) žymi transkripcijos pradžios vietą.

*In silico* analizė leido identifikuoti 1641 bp ilgio atviro skaitymo rėmelį (ASR), kuris koduoja 546 aminorūgščių baltymą, kurio nustatyta molekulinė masė yra 59761,72 Da. Remiantis SignalP 4.1 programa ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)), kuri skirta baltymų signalinių peptidų analizei, nustatyta jog GEOker baltymas turi 25 aminorūgščių signalinį peptidą (Pre-seka)<sup>238</sup>. Signaliniam peptidui būdinga konservatyti ASA aminorūgščių seka, kuri yra atpažįstama SRP molekulės<sup>239</sup>. Pašalinus signalinį peptidą yra gaunamas 521 aminorūgšties Pro-baltymas. Šio baltymo molekulinė masė 57231,60 Da, o izoelektrinis taškas (pI) 5,386. Remiantis internetinėmis duomenų bazėmis (MEROPS)<sup>240</sup>, (NCBI)<sup>241</sup>, (UniProt)<sup>242</sup>, (RCSB PDB)<sup>243</sup> nustatyta, kad baltymo Pro-seka sudaryta iš 202 aminorūgščių. Ši seka sudaro atskirą baltymo domeną, kuris po autokatalizės yra pašalinamas. Baltymui visiškai subrendus – įgavus natyvią konformaciją – Pro-peptidas yra pašalinamas. Visiškai subrendęs baltymas sudarytas iš 319 aminorūgščių, jo molekulinė masė 34685,03 Da, o izoelektrinis taškas (pI) 5,47.

Analizuojant GEOker baltymo seką buvo nustatytas cinko prisijungimo motyvas H<sup>372</sup>ELTH<sup>376</sup>. Šis motyvas patvirtina, kad baltymas priklauso metalo proteazių šeimai<sup>96</sup>. Taip pat identifikuotos fermento katalizinį aktyvumą nulemiančios aminorūgštys: 373-oje pozicijoje esanti glutamo rūgštis ir 461-oje pozicijoje esantis histidinas (pozicijos surašytos remiantis Pre-Pro-fermento aminorūgščių seka).

Baltymai paprastai yra priskiriami tam tikrai baltymų šeimai ar tipui pagal specifines aminorūgštis ar specifinį katalizinės reakcijos mechanizmą. Svarbu nustatyti ne tik sekų panašumus ar motyvus, bet ir konservatyvius baltymo domenų. Identifikuoti konservatyvūs domenai ir sekos pavaizduotos 3.6 pav.



**3.6 pav.** Konservatyvūs domenai ir jų padėtis GEOker baltyme. Analizė atlikta NCBI konservatyvių domenų analizės įrankiu <sup>244</sup>.

*Specifinis atitikimas FTP superšeimai:* 78-126 aminorūgščių padėtis. Fungalizino/termolizino Pro-peptido motyvas. Šis specifinis motyvas yra aptinkamas bakterinės kilmės M4 baltymų šeimos proteazių Pro-peptiduose ir grybinės kilmės M36 baltymų šeimos Pro-peptiduose. Funkcija nėra iki galo išaiškinta, tačiau nustatyta, kad šis motyvas gali veikti slopinančiai – neleisti baltymui pasiekti galutinės brendimo stadijos arba veikti kaip šaperonas <sup>244-246</sup>.

*Specifinis atitikimas PepSY superšeimai:* 141-214 aminorūgščių padėtis. Peptidazės pro-peptidas ir YPEB domenas (pavadinimas kilęs iš *B. subtilis* YpeB baltymo). Manoma, kad šis domenas pasižymi proteazę slopinančiu poveikiu <sup>244, 247-249</sup>.

*Specifinis atitikimas Gluzincin superšeimai:* 269-545 aminorūgščių padėtis. Gluzincin peptidazės šeima (į termoliziną panašios peptidazės), kurią sudaro M1, M2, M3, M4, M13, M32 ir M36 peptidazės. Šiai superšeimai priklauso keletas nuo cinko jonų priklausomų metalo proteazių. Išskirtinė proteazių savybė – HExxH ir ExxxD (x – bet kokia aminorūgštis) motyvai. Visos šiai superšeimai priklausančios proteazės prisijungia vieną cinko joną, kuris ypač svarbus katalizinei reakcijai <sup>244</sup>.

*Specifinis atitikimas M4 neutraliai proteazei:* 262-545 aminorūgščių padėtis. M4 peptidazės šeima, kuriai priklauso termolizinas, proteolizinas, aureolizinas ir neutrali proteazė. Šios proteazės turi dviejų domenų struktūrą <sup>244, 250</sup>.

*Specifinis atitikimas LasB*: 21-545 aminorūgščių padėtis. Nuo cinko priklausoma metalo proteazė<sup>244, 251-253</sup>.

*Nespecifinis atitikimas peptidazei M4 C*: 383-545 aminorūgščių padėtis. Termolizino metalo peptidazės  $\alpha$ -spiralinis domenas<sup>244</sup>.

Siekiant identifikuoti ir nustatyti aminorūgščių skirtumus GEOker sekoje, buvo atlikta 4 panašiausių sekų, nustatytų NCBI duomenų bazėje, lyginamoji analizė. Analizės rezultatai pateikti 3.7 pav. Gauti rezultatai patvirtina aukštą GEOker sekos panašumą su proteazėmis iš *Geobacillus* ir *Bacillus* genties bakterijų. Nustatyti skirtumai:

- Signalinis peptidas – skiriasi 2 aminorūgštys (N2D, L21F) nuo termolizino ir 2 aminorūgštys (F14V, L21F) nuo bacilolizino (*Geobacillus thermocatenulatus*);
- Pro-seka – skiriasi 1 aminorūgštis (N209K) nuo bacilolizino (*G. stearothermophilus*), 5 aminorūgštys (R28K, P45S, H100R, V142I, N209K) nuo termolizino, 5 aminorūgštys (R28K, P45S, H100R, V142I, N209K) nuo šarminės metaloproteazės ir 25 aminorūgštys (R28K, M30I, T38M, P45S, D52E, E55Q, T85V, T124A, R132Q, E137K, M147R, A154V, K159N, R161W, A164F, E166V, P169S, T180D, P181A, I203A, A206T, N209R, N212D, G223D, S227P) nuo bacilolizino (*G. thermocatenulatus*);
- Subrendęs baltymas – skiriasi 3 aminorūgštys (A231T, G288V, H331R) nuo bacilolizino (*G. stearothermophilus*), 2 aminorūgštys (A231T, H331R) nuo termolizino, 3 aminorūgštys (A231T, H331R, G347C) nuo šarminės metaloproteazės ir 7 aminorūgštys (A231T, Y255D, V279T, G288S, A298T, H331R, G371A) nuo bacilolizino (*G. thermocatenulatus*).

Didžiausi aminorūgščių skirtumai identifikuoti Pro-sekoje. Literatūros apžvalgoje buvo aptarta, kad ši baltymo dalis atsakinga už teisingą baltymo subrendimą, todėl nėra reikalingas griežtas konservatyvumas.

Pre → Pro → Fermentas

1 10 20 30 40 50 60

GEOker MNKRAMLGAIGLAFLGLMAWPLGASAKERSMVWNEQWKTPSFVSGP.LLKGE#APEELVYRY  
gi|696468741 MNKRAMLGAIGLAFLGLMAWPLGASAKERSMVWNEQWKTPSFVSGP.LLKGE#APEELVYRY  
gi|37088170 MDKRAMLGAIGLAFLGLMAWPLGASAKEKSMVWNEQWKTPSFVSGP.LLKGE#APEELVYRY  
gi|893712617 MNKRAMLGAIGLAFLGLMAWPLGASAKERSMVWNEQWKTPSFVSGP.LLKGE#APEELVYRY  
gi|647687896 MNKRAMLGAIGLAFLGLMAWPLGASAKEKSIWVWNEQWKTPSFVSGP.LLKGE#APEELVYRY  
consensus>70 M#KRAMLGAIGLAFLGLMAWPLGASAKE.SmVWNEQWKtPSFVSG.LLKGE#APE#LVYRY

70 80 90 100 110 120

GEOker LDQEKNTFOLGGQARERLSLIGKQTDDELGHTVMRFEQRYHGIPVYGAVLVAHVNDGELSS  
gi|696468741 LDQEKNTFOLGGQARERLSLIGKQTDDELGHTVMRFEQRYHGIPVYGAVLVAHVNDGELSS  
gi|37088170 LDQEKNTFOLGGQARERLSLIGKQTDDELGHTVMRFEQRYHGIPVYGAVLVAHVNDGELSS  
gi|893712617 LDQEKNTFOLGGQARERLSLIGKQTDDELGHTVMRFEQRYHGIPVYGAVLVAHVNDGELSS  
gi|647687896 LDQEKNTFOLGGQARERLSLIGKQTDDELGHTVMRFEQRYHGIPVYGAVLVAHVNDGELSS  
consensus>70 LDQEKNTFOLGGQARERLSLIGKQTDDELGHTVMRFEQRY.HGIPVYGAVLVAHVNDGELSS

130 140 150 160 170 180

GEOker LSGTLIPNLDKRTLKTAAAISSVQQAEMIAKQDVADAVTKERPAAE#GKFTRLVIYDPDGET  
gi|696468741 LSGTLIPNLDKRTLKTAAAISSVQQAEMIAKQDVADAVTKERPAAE#GKFTRLVIYDPDGET  
gi|37088170 LSGTLIPNLDKRTLKTAAAISSVQQAEMIAKQDVADAVTKERPAAE#GKFTRLVIYDPDGET  
gi|893712617 LSGTLIPNLDKRTLKTAAAISSVQQAEMIAKQDVADAVTKERPAAE#GKFTRLVIYDPDGET  
gi|647687896 LSGALIPNLDKRTLKTAAAISSVQQAEMIAKQDVADAVTKERPAAE#GKFTRLVIYDPDGET  
consensus>70 LSGtLIPNLDKRTLKTAAAISSVQQAEMIAKQDVADAVTKERPAAE#GKpTRLVIYDPDGET

190 200 210 220 230 240

GEOker PRLAYEVNVRFLTPVPGNWIYMDAADGKVLNKNWQDEAKP#GGGQPVAGTSTVGVGRGV  
gi|696468741 PRLAYEVNVRFLTPVPGNWIYMDAADGKVLNKNWQDEAKP#GGGQPVAGTSTVGVGRGV  
gi|37088170 PRLAYEVNVRFLTPVPGNWIYMDAADGKVLNKNWQDEAKP#GGGQPVAGTSTVGVGRGV  
gi|893712617 PRLAYEVNVRFLTPVPGNWIYMDAADGKVLNKNWQDEAKP#GGGQPVAGTSTVGVGRGV  
gi|647687896 ARLAYEVNVRFLTPVPGNWIYMDADGRVLDKNWQDEAKPDGGQPVAGTSTVGVGRGV  
consensus>70 PRLAYEVNVRFLTPVPGNWIYMDAaDG.VL#KNWQDEAKP#GGQpVAGtSTVGVGRGV

250 260 270 280 290 300

GEOker LGDQKYINTTYSYVGYYYLQDNTRGSGIFTYDGRNRTVLPSSLWAD#DNQFFASYDAAA  
gi|696468741 LGDQKYINTTYSYVGYYYLQDNTRGSGIFTYDGRNRTVLPSSLWAD#DNQFFASYDAAA  
gi|37088170 LGDQKYINTTYSYVGYYYLQDNTRGSGIFTYDGRNRTVLPSSLWAD#DNQFFASYDAAA  
gi|893712617 LGDQKYINTTYSYVGYYYLQDNTRGSGIFTYDGRNRTVLPSSLWAD#DNQFFASYDAAA  
gi|647687896 LGDQKYINTTYSYVGYYYLQDNTRGSGIFTYDGRNRTVLPSSLWAD#DNQFFASYDAAA  
consensus>70 LGDQKYINTTYSYyGYYYLQDNTRGSGIFTYDGRNRTvLPSSLWAD.DNQFFASYDAAA

310 320 330 340 350 360

GEOker VDAHYYAGVVYDYKKNVHGRLSYDGSNAAIRSTVHYGRGYNNAFWNGSOMVYGDGDGQTF  
gi|696468741 VDAHYYAGVVYDYKKNVHGRLSYDGSNAAIRSTVHYGRGYNNAFWNGSOMVYGDGDGQTF  
gi|37088170 VDAHYYAGVVYDYKKNVHGRLSYDGSNAAIRSTVHYGRGYNNAFWNGSOMVYGDGDGQTF  
gi|893712617 VDAHYYAGVVYDYKKNVHGRLSYDGSNAAIRSTVHYGRGYNNAFWNGSOMVYGDGDGQTF  
gi|647687896 VDAHYYAGVVYDYKKNVHGRLSYDGSNAAIRSTVHYGRGYNNAFWNGSOMVYGDGDGQTF  
consensus>70 VDAHYYAGVVYDYKKNVHGRLSYDGSNAAIRSTVHYGRGYNNAFWNGSOMVYGDGDGQTF

370 380 390 400 410 420

GEOker LFFSGGIDVV#HELTHAVTDYTAGLVYQNESGAIN#EAMSDIFGTLVEFYANRNPDWEIGE  
gi|696468741 LFFSGGIDVV#HELTHAVTDYTAGLVYQNESGAIN#EAMSDIFGTLVEFYANRNPDWEIGE  
gi|37088170 LFFSGGIDVV#HELTHAVTDYTAGLVYQNESGAIN#EAMSDIFGTLVEFYANRNPDWEIGE  
gi|893712617 LFFSGGIDVV#HELTHAVTDYTAGLVYQNESGAIN#EAMSDIFGTLVEFYANRNPDWEIGE  
gi|647687896 LFFSGGIDVV#HELTHAVTDYTAGLVYQNESGAIN#EAMSDIFGTLVEFYANRNPDWEIGE  
consensus>70 LFFSGGIDVV#HELTHAVTDYTAGLVYQNESGAIN#EAMSDIFGTLVEFYANRNPDWEIGE

430 440 450 460 470 480

GEOker DIYTPGIAGDALRMSDPAKYGDPPDHYSKRYTGTQDNGGVHTNSGIN#KAAAYLLSOGGVH  
gi|696468741 DIYTPGIAGDALRMSDPAKYGDPPDHYSKRYTGTQDNGGVHTNSGIN#KAAAYLLSOGGVH  
gi|37088170 DIYTPGIAGDALRMSDPAKYGDPPDHYSKRYTGTQDNGGVHTNSGIN#KAAAYLLSOGGVH  
gi|893712617 DIYTPGIAGDALRMSDPAKYGDPPDHYSKRYTGTQDNGGVHTNSGIN#KAAAYLLSOGGVH  
gi|647687896 DIYTPGIAGDALRMSDPAKYGDPPDHYSKRYTGTQDNGGVHTNSGIN#KAAAYLLSOGGVH  
consensus>70 DIYTPGIAGDALRMSDPAKYGDPPDHYSKRYTGTQDNGGVHTNSGIN#KAAAYLLSOGGVH

490 500 510 520 530 540

GEOker YGVSVTGIGRDKMGKIFYRALVYLYLTPTSNFSQLRAACVQAAADLYGSTS#QEVNSVKQAF  
gi|696468741 YGVSVTGIGRDKMGKIFYRALVYLYLTPTSNFSQLRAACVQAAADLYGSTS#QEVNSVKQAF  
gi|37088170 YGVSVTGIGRDKMGKIFYRALVYLYLTPTSNFSQLRAACVQAAADLYGSTS#QEVNSVKQAF  
gi|893712617 YGVSVTGIGRDKMGKIFYRALVYLYLTPTSNFSQLRAACVQAAADLYGSTS#QEVNSVKQAF  
gi|647687896 YGVSVTGIGRDKMGKIFYRALVYLYLTPTSNFSQLRAACVQAAADLYGSTS#QEVNSVKQAF  
consensus>70 YGVSVTGIGRDKMGKIFYRALVYLYLTPTSNFSQLRAACVQAAADLYGSTS#QEVNSVKQAF

GEOker NAVGVY  
gi|696468741 NAVGVY  
gi|37088170 NAVGVY  
gi|893712617 NAVGVY  
gi|647687896 NAVGVY  
consensus>70 NAVGVY

3.7 pav. GEOker aminorūgščių sekos palyginys. gi|696468741 – bacilolizinas (*G. stearothermophilus*); gi|37088170 – termolizinas, termostabili neutrali proteinazė (*Bacillus caldolyticus*); gi|893712617 – šarminė metaloproteazė (*B. subtilis*); gi|647687896 – bacilolizinas (*G. thermocatenulatus*). Pre-Pro-fermento (Pre), Pro-fermento (Pro) ir subrendusio fermento (Fermentas) pradžios aminorūgšties pažymėtos laužtinėmis rodyklėmis. Konsensus seka: didžioji raidė – 100 % panašumas; mažoji raidė – >50 % panašumas; ! – I arba V; # – bet kuris iš N, D, Q, E. Paruošta su ESPrpt 3.0 <sup>254</sup>.

Subrendusio baltymo dalis, kuri yra atsakinga už katalizinę reakciją, pasižymi konservatyvumu. Nustatytos 8 pozicijos, kuriose pastebimi aminorūgščių pokyčiai ir tik dviuose pozicijose (231 ir 331) GEOker seka skiriasi nuo visų kitų tirtų proteazių sekų. Tokių aminorūgščių identifikavimas yra pagrindas baltymų inžinerijai. Konservatyvių baltymo vietų aminorūgščių tikslinė mutagenezė gali leisti gauti rekombinantinius baltymus su pakitusiomis fizikinėmis ar cheminėmis savybėmis, kurios efektyviau būtų išnaudojamos biotechnologijos srityse.

### 3.1.6.2. GEOker baltymo variantų klonavimas

Išsami *geoker* geno sekos ir jos koduojamos keratinolizinės peptidazės aminorūgščių sekos *in silico* analizė leido suformuoti tolimesnius uždavinius, skirtus rekombinantinių baltymų heterologinės raiškos eksperimentams.

Remiantis NCBI, MEROPS, RCSB PDB ir UniProt duomenų bazėmis buvo sukurti keturi GEOker baltymo variantai (3.8 pav. ir 3.9 pav.):

- GEOker1 – Pro-fermentas (baltymas be signalinio peptido), 521 aminorūgštys; Naudoti pradmenys: GeoKerF ir GeoKerR;
- GEOker2 – subrendęs baltymas (fermentas), 319 aminorūgščių; Naudoti pradmenys: GeoKer2F ir GeoKerR;
- GEOker3 – subrendęs baltymas (fermentas), 278 aminorūgštys; Naudoti pradmenys: GeoKer3F ir GeoKerR;
- GEOker4 – subrendęs baltymas (fermentas), 232 aminorūgštys; Naudoti pradmenys: GeoKer4F ir GeoKerR.

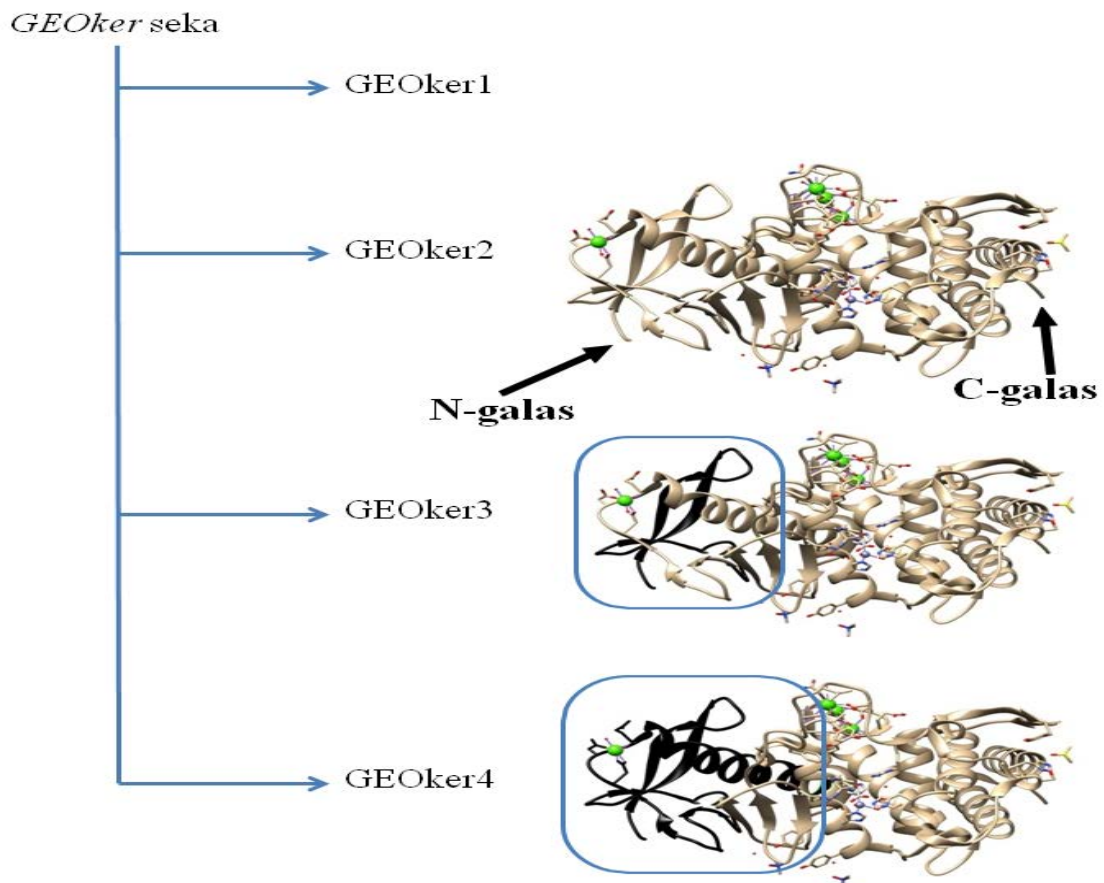
Visų GEOker baltymo variantų gavimui buvo atliktas klasikinis arba *Touchdown* PGR (TD-PGR) <sup>255-257</sup>, kaip matricą naudojant *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno genomine DNR. Atlikus PGR nustatyta, kad gauti visi 4 tiksliniai PGR produktai, atitinkantys teorinius PGR produktų dydžius. Vykdyta tikslinių produktų sekoskaita ir patikrintas sekų identiškumas.

GEOker1 →

MNKRAMLGAIGLAFGLMAWPLGASAKERSMVVNEQWKTPSFVSGPLLKGEDAPEELVYRY  
 LDQEKNTFQLGGQARERLSLIGKQTDELGHTVMRFEQRYHGIPVYGAVLVAHVNDGELSSLS  
 GTLIPNLDKRTLKTEAAISVQQAEMIAKQDVADAVTKERPAAEEGKPTRLVIYDPDGETPRLAY  
 EVNVRFLTPVPGNWTYMIDAADGNVNLNKWNQMDEAKPGGGQSVAGASTVGVGRGVLGDQ  
 KYINTTYSSYYGYYYLQDNTRGSGIFTYDGRNRTVLPGLSWADGDNQFFASYDAAAVDAHY  
GEOker4 → GEOker3 → GEOker2 →

YAGVVYDYKYNVHGRLSYDGSNAAIHSTVHYGRGYNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFLPFS  
 GGIDVVGHETHAVTDYTAGLVYQNESGAINAAMSDIFGTLVEFYANRNPDWEIGEDIYTPGI  
 AGDALRSMSPAKYGDPDHYSKRYTGTQDNGGVHTNSGIINKAAAYLLSQGGVHYGVSVTGI  
 GRDKMGKIFYRALVYYLTPTS NFSQLRAACVQAAADLYGSTSQEVNSVKQAFNAVGVY

**3.8 pav.** GEOker baltymo variantai. Rodyklės žymi kiekvieno baltymo pradžios vietą.



**3.9 pav.** GEOker baltymo variantų 3D struktūros. Juodos rodyklės žymi baltymo N ir C galus. Mėlynos spalvos stačiakampiai žymi baltymo regionus, kuriuose buvo pašalintos juoda spalva pažymėtos struktūros GEOker3 ir GEOker4 baltimuose. Žalios spalvos rutuliukai žymi  $\text{Ca}^{2+}$  jonus.

Klonavimo darbai atlikti pagal 2.2.24. metodiką. Taip paruošti visi genų variantai raiškos analizei:

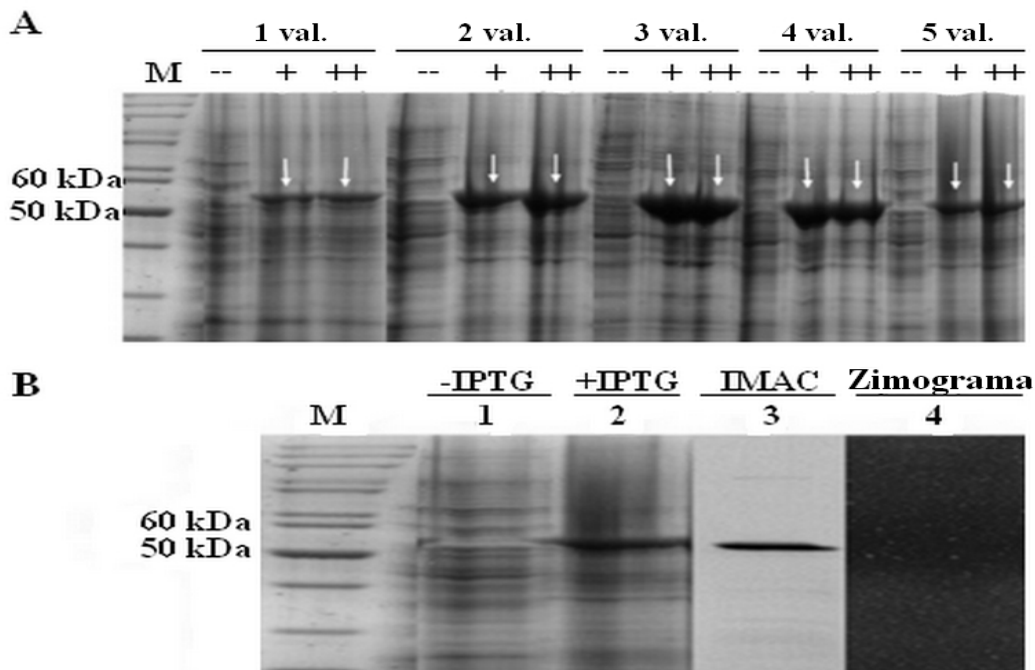


- pET-28c/ker1 - GEOker1 produktas;
- pET-28c/ker2 - GEOker2 produktas;
- pET-28c/ker3 - GEOker3 produktas;
- pET-28c/ker4 - GEOker4 produktas.

### 3.1.7. GEOker geno variantų raiška, raiškos analizė ir gryninimas

#### 3.1.7.1. GEOker1 raiška ir gryninimas

pET-28c/ker1 raiška atliekama pagal standartinę metodiką (2.2.25.). Tikslinio geno raiška indukuojama naudojant 0,5 mM ir 1 mM IPTG. Ląstelės po indukcijos pradžios auginamos 30 °C temperatūroje, maišant 180 aps min.<sup>-1</sup> greičiu 5 val. Gauti rezultatai pateikti 3.10 pav.



**3.10 pav.** GEOker1 raiškos analizė ir gryninimas. (A) -- – neindukuotų ląstelių mėginys. + – ląstelės indukuotos naudojant 0,5 mM IPTG. ++ – ląstelės indukuotos naudojant 1 mM IPTG. M – PageRuler™ Unstained Protein Ladder. Baltos rodyklės žymi rekombinantinį baltymą. (B) M – PageRuler™ Unstained Protein Ladder. -IPTG – neindukuotų ląstelių baltymų profilis. +IPTG – indukuotų ląstelių baltymų profilis. IMAC – baltymų profilis po gryninimo. Zimograma – išgryninto rekombinantinio baltymo aktyvumas zimogramoje. Eliucija su 100 mM imidazolo.

Remiantis gautais rezultatais (3.10 pav. A) nustatyta, kad praėjus vienai valandai nuo indukcijos pradžios jau yra stebimas tikslinio rekombinantinio baltymo atsiradimas. Rekombinantinio baltymo dydis (~57 kDa) atitinka teorinį *in silico* apskaičiuotą baltymo dydį. Didžiausias kiekis tikslinio baltymo yra gaunamas 3 auginimo valandą (nuo indukcijos pradžios). Nuo 4 auginimo valandos baltymo kiekis ima mažėti. Baltymo kiekio mažėjimas gali būti susijęs su *E. coli* baltymų raiškos sistema, kuri negali tinkamai sulankstyti didelio kiekio rekombinantinio baltymo ir jis yra degraduojamos ląstelės šeimininkės proteazių<sup>258</sup>. Vertinant naudojamą IPTG induktoriaus koncentraciją nenustatyta tiesioginė priklausomybė tarp induktoriaus koncentracijos ir baltymo kiekio. Apibendrinant:

- Naudotos standartinės ląstelių auginimo sąlygos (30 °C temperatūra, 180 aps. min.<sup>-1</sup> maišymas) po indukcijos yra tinkamos GEOker1 baltymo raiškai;
- Didžiausias tikslinio rekombinantinio baltymo kiekis gaunamas praėjus 3 val. nuo indukcijos pradžios;
- Optimali IPTG koncentracija – 0,5 mM.

Siekiant įvertinti rekombinantinio baltymo aktyvumą, buvo atliekamas baltymų gryninimas naudojant Ni<sup>2+</sup> giminingumo chromatografiją. Gryninimo procedūra paremta N baltymo gale esančių šešių histidino aminorūgščių liekanų inkaro sąveika su Ni<sup>2+</sup> jonais, kurie yra imobilizuoti per iminodiacto rūgštį ant sferinių dalelių. Baltymo gryninimo efektyvumas analizuotas NDS-PAGE ir zimografijos metodais.

GEOker1 rekombinantinis baltymas buvo kaupiamas *E. coli* ląstelių citoplazmoje netirpių baltyminių kūnelių pavidalu, todėl reikėjo eksperimentiškai nustatyti tinkamiausias sąlygas šių kūnelių tirpinimui. Tirpinimo procedūrą sudaro du etapai: 1 – tinkamas ląstelių nuolaužų ir kitų baltymų pašalinimas nuo netirpių kūnelių; 2 – tinkamos buferinės sistemos

paruošimas. Literatūroje yra nemažai metodų, aprašančių netirpių kūnelių atplovimą<sup>259-263</sup>. Šiame darbe naudotos plovimo ir tirpinimo sistemos:

- Plovimo sistemos:
  - 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 % Triton X-100;
  - 50 mM Tris-HCl (pH 8).
  
- Tirpinimo sistemos:
  - 50 mM natrio fosfatas (pH 7,5), 0,3 M NaCl, 4 M karbamidas;
  - 25 mM Tris-HCl (pH 8), 4 M karbamidas;
  - 50 mM Tris-HCl (pH 8), 6 M karbamidas;
  - 20 mM Tris-HCl (pH 8), 2 M NaCl, 6 M karbamidas;
  - 0,1 M NaOH.

Baltyminiai kūneliai yra tirpinami pasirinktose tirpinimo sistemose pagal 2.2.26.1. metodiką. Sistemos tinkamumas buvo parinktas atsižvelgiant į ištirpusių baltymų kiekį ir baltymo aktyvumą. Nustatyta, kad buferinio plovimo tirpalo sudėtis neturėjo didelės įtakos bendram ištirpusių baltymų kiekiui ir aktyvumui. Geriausiai netirpūs kūneliai buvo tirpinami 50 mM Tris-HCl (pH 8), 6 M karbamidas. Pastebėta, kad buferiniame tirpale esant NaCl yra dalinai prarandamas baltymo aktyvumas, o 0,1 M NaOH tirpale – visiškai prarandamas baltymo aktyvumas.

Nustatyta (3.10 pav. B), kad tinkamai parinkus gryninimo sąlygas gautas pakankamo švarumo rekombinantinis baltymas. Gryninimo eiga pateikta 3.2 lentelėje. Zimogramos analizė patvirtino, kad rekombinantinis GEOker1 baltymas yra aktyvus. Šiam baltymui suteiktas RecGEOker pavadinimas.

**3.2 lentelė.** RecGEOker gryninimo eiga.

Gryninimo stadija	Bendras baltymo kiekis (mg)	Bendras aktyvumas (U)	Savitasis aktyvumas (U mg <sup>-1</sup> )	Išgryninimas	Išeiga (%)
Grubus ekstraktas	25,3±1,5	5875±23	232,2±4,1	1	100
IMAC	2,5±0,3	3594±14	1437,6±7,5	6,2	61,2

RecGEOker produktas yra Pro-baltymas. Jau aptarta, kad Pro-seka veikia kaip vidumolekulinis šaperonas ir subrendus baltymui šis šaperonas autokatalizės būdu yra pašalinamas. Mūsų gauti rezultatai leidžia teigti, kad Pro-seka neturi arba turi mažai įtakos baltymo funkcionalumui.

### 3.1.7.2. GEOker2, GEOker3 ir GEOker4 raiška

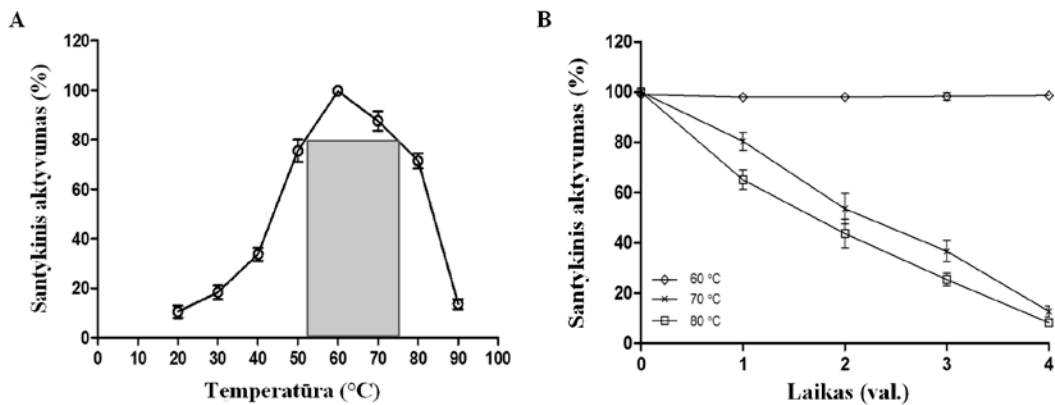
pET-28c/ker2, pET-28c/ker3 ir pET-28c/ker4 raiška buvo atliekama pagal standartinę metodiką (2.2.25.). Raiškos metu nebuvo gautas nei vienas iš šių produktų. Negavus teigiamų rezultatų, buvo siekiama optimizuoti raiškos proceso parametrus: indukcijos pradžią (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,5, 2 (o. v.)), induktoriaus koncentraciją (0,01, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 (mM)) indukuotų ląstelių auginimo temperatūrą (15, 20, 25, 30, 37 (°C)) ir indukcijos laiką (iki 24 val.). Modifikuojant raiškos parametrus nebuvo pasiektas teigiamas rezultatas. Manoma, kad tirti GEOker variantai *E. coli* ląstelėje yra degraduojami dėl netinkamai įgaunamos tretinės struktūros. Taip pat didelę įtaką gali turėti Pro-seka, kuri GEOker2, GEOker3 ir GEOker4 variantuose yra pašalinta. Logiška teigti, kad Pro-seka gali lemti GEOker1 baltymo savybę formuoti netirpius baltyminius kūnelius. Tokie netirpūs kūneliai ląstelės viduje yra dalinai apsaugomi nuo ląstelės šeimininkės proteazių<sup>264, 265</sup>.

### 3.1.8. RecGEOker baltymo fizikinių ir cheminių savybių nustatymas

Viena iš svarbiausių peptidazes apibūdinančių analizių yra fizikinių ir cheminių savybių nustatymas. Tokių tyrimų metu yra išsiaiškinami temperatūriniai ir pH veikimo optimumai ir diapazonai, įvairių medžiagų ir reagentų slopinamasis ir stimuliuojamasis poveikis fermentiniam aktyvumui. Tokia informacija leidžia tarpusavyje lyginti tų pačių rūšių ir ganėtinai nutolusių rūšių ar genčių sintetintamas peptidazes. Galiausiai leidžia įvertinti tinkamų peptidazių pritaikomumą pramoninėje biotechnologijoje ar optimizuoti jau vykstančius procesus ir taip pasiekti maksimalų proceso efektyvumą.

### 3.1.8.1. Temperatūros įtakos fermento aktyvumui ir stabilumui nustatymas

Temperatūrinis fermentinio aktyvumo diapazonas yra vienas iš svarbiausių fermentus apibūdinančių kriterijų. *Geobacillus* sp. AD-11 kamienas yra termofilinis mikroorganizmas, todėl logiška manyti, kad RecGEOker turėtų veikti aukštesnėje nei 45 °C temperatūroje. Siekiant nustatyti optimalią temperatūrą ir temperatūrinės ribas, išgrynintas RecGEOker fermentas buvo analizuojamas vykdant standartinę fermentinę reakciją (2.2.19.). Gauti rezultatai pateikti 3.11 pav.



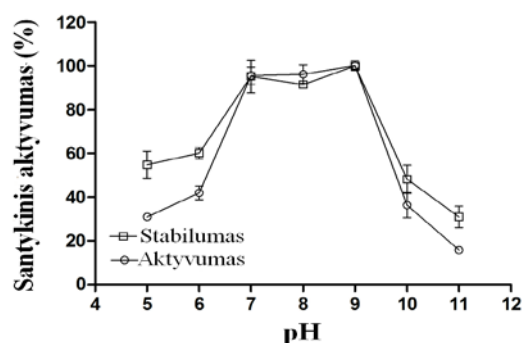
**3.11 pav.** Temperatūros įtaka RecGEOker aktyvumui (A) ir stabilumui (B). Pilkas stačiakampis žymi didesnę nei 80 % aktyvumą.

Remiantis gautais rezultatais (3.11 pav., A) nustatyta, kad didžiausias keratinolizinės peptidazės RecGEOker aktyvumas yra reakciją vykdant 60 °C temperatūroje. Literatūroje yra aprašyta keratinolizinė peptidazė (termolizinas) iš *G. stearothermophilus* (ATCC 31197<sup>T</sup>), kurios temperatūrinis veikimo optimumas yra 75 °C<sup>266</sup>. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad RecGEOker temperatūrinio veikimo optimumas atitinka ir *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno augimo temperatūrą. Pastebėta, kad RecGEOker išlaiko didesnę nei 80 % fermentinį aktyvumą 52-75 °C temperatūros intervale. Tokios aukštoje temperatūroje gebančios veikti keratinolizinės peptidazės svarbios pramoninėje biotechnologijoje, kurioje dauguma procesų vyksta aukštesnėje nei 45 °C temperatūroje.

Siekiant nustatyti temperatūros įtaką RecGEOker stabilumui, fermentas buvo inkubuotas pasirinktose tikrinimo temperatūrose 4 val. Kas valandą paimamas mėginys ir liekamasis fermentinis aktyvumas įvertinamas vykdant standartinę (2.2.19.) reakciją. Gauti rezultatai pateikti 3.11, B paveiksle. RecGEOker buvo inkubuotas 4 val. 60 °C, 70 °C ir 80 °C temperatūrose. Nustatyta, kad 60 °C temperatūroje fermentas išlieka maksimaliai aktyvus visas 4 inkubavimo valandas, tačiau visose kitose temperatūrose aktyvumas mažėja. Lyginant aktyvumus po inkubacijos 70 °C ir 80 °C temperatūrose, galima teigti, kad liekamasis aktyvumas išlieka maždaug vienodas po 2, 3 ir 4 inkubacijos valandų. Pagrindinis skirtumas matyti po pirmos inkubacijos valandos, kur 70 °C temperatūroje aktyvumas išlieka 80 %, o 80 °C temperatūroje – 65 %. Po 4 val. inkubacijos tiek 70 °C, tiek 80 °C temperatūroje aktyvumas sumažėja iki ~12 %. RecGEOker fermentą galime laikyti dalinai termostabiliu, nes savo optimalioje temperatūroje išlieka stabilus, tačiau praranda aktyvumą inkubuojant aukštesnėse temperatūrose.

### 3.1.8.2. pH įtakos aktyvumui ir stabilumui nustatymas

Optimalaus pH nustatymui reakcija vykdyta standartinėmis sąlygomis (2.2.19.) skirtingų pH buferiniuose tirpaluose (50 mM piperazinas pH 5-6; 50 mM Tris-HCl pH 7-9; 50 mM natrio bikarbonatas pH 10-11). Gauti rezultatai pateikti 3.12 pav.



3.12 pav. pH įtaka RecGEOker aktyvumui ir stabilumui.

Remiantis gautais rezultatais (3.12 pav.) nustatyta, kad optimalus pH intervalas fermentiniam RecGEOker aktyvumui pasireikšti apima pH 7-9. Literatūroje aprašomos keratinazės dažniausiai taip pat yra veiklios neutraliame ar silpnai šarminiame pH <sup>53</sup>. Fermentinis aktyvumas ženkliai sumažėja esant pH reikšmėms 6 (40 %) ir 10 (37 %).

Siekiant nustatyti pH įtaką RecGEOker stabilumui fermentas buvo inkubuojamas 60 min. kambario temperatūroje skirtingose pH (5-11). Po inkubacijos liekamasis fermentinis aktyvumas įvertintas vykdant standartinę reakciją (2.2.19.). Remiantis 3.12 pav. pateiktais rezultatais galima teigti, kad pH stabilumas sutampa su optimalaus pH nustatymo rezultatais. RecGEOker išlaiko maksimalų (~100 %) liekamąjį aktyvumą optimaliose pH reikšmėse (pH 7-9).

### 3.1.8.3. Metalų jonų įtakos keratinoliziniam aktyvumui įvertinimas

Siekiant nustatyti metalų jonų ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) įtaką RecGEOker aktyvumui fermentas kartu su tiriamu metalu buvo inkubuojamas 60 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos liekamasis fermentinis aktyvumas įvertintas vykdant standartinę reakciją (2.2.19.). Gauti rezultatai pateikti 3.3 lentelėje.

**3.3 lentelė.** Metalų jonų įtaka RecGEOker aktyvumui ir stabilumui.

Metalas	Koncentracija (mM)	Liekamasis aktyvumas (%)
Kontrolė	-	100
$Mn^{2+}$	1	68,9±1,5
	10	<b>116,6±1,9</b>
$Mg^{2+}$	1	<b>112,6±2,8</b>
	10	52,6±1,6
$Ca^{2+}$	1	101,7±1,9
	10	66,9±1,2
$Fe^{2+}$	1	80±1,2
	10	74,9±2,5
$Li^+$	1	80±2,2
	10	68,6±1,8
$Cu^{2+}$	1	72±1,2
	10	78,3±2,8
$Co^{2+}$	1	84±2,5
	10	67,4±1,5

K <sup>+</sup>	1	53,1±1,8
	10	80±2,3
Zn <sup>2+</sup>	1	58,3±2,2
	10	52±1,8
Ni <sup>2+</sup>	1	<u>45,7±1,2</u>
	10	54,9±2,2

Teigiamas efektas pažymėtas paryškintu šriftu. Neigiamas efektas (daugiau kaip 50 %) pažymėtas pabrauktu šriftu.

Įvertinus metalų jonų įtaką RecGEOker fermentui nustatyta, kad teigiamą poveikį fermentiniam aktyvumui turi Mg<sup>2+</sup> (1 mM) ir Mn<sup>2+</sup> (10 mM). Visi kiti naudoti metalai turi neigiamą poveikį. Apie 50 % fermentinio aktyvumo RecGEOker prarado aplinkoje esant 10 mM Mg<sup>2+</sup>, 1 mM K<sup>+</sup>, 1 mM Zn<sup>2+</sup>, 10 mM Zn<sup>2+</sup>, 1 mM Ni<sup>2+</sup> ir 10 mM Ni<sup>2+</sup>. Mažiausias liekamasis aktyvumas gautas fermentą inkubuojant su 1 mM Ni<sup>2+</sup> jonais – 45,7±1,2 %.

Kaip jau minėta, terpėje esant Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ir/ar Mn<sup>2+</sup> jonų yra padidinamas keratinazių aktyvumas. Manoma, kad šie metalai palaiko aktyvią fermento konformaciją ir stabilizuoja fermento-substrato kompleksą<sup>51</sup>. Taip pat yra žinoma, kad metalų jonai gali apsaugoti fermentą nuo terminės denatūracijos esant aukštesnei nei optimali fermento veikimo temperatūrai<sup>3</sup>.

#### **3.1.8.4. Detergentų ir organinių tirpiklių įtakos keratinoliziniam aktyvumui įvertinimas**

Siekiant nustatyti detergentų (Tween 20/40/60/80, Triton X-100/305, Brij 35/58, NDS) ir organinių tirpiklių (DMF, DMSO, metanolis, etanolis, propanolis) įtaką RecGEOker aktyvumui fermentas kartu su tiriamu veiksmiu buvo inkubuotas 60 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos liekamasis fermentinis aktyvumas įvertintas vykdant standartinę reakciją (2.2.19.). Gauti rezultatai pateikti 3.4 lentelėje.



**3.4 lentelė.** Detergentų ir organinių tirpiklių įtaka RecGEOker aktyvumui ir stabilumui.

Veiksny	Koncentracija (%)	Liekamasis aktyvumas (%)
Kontrolė	-	100
Tween 20	1	<u>47,2±2,3</u>
	5	92,1±3,1
Tween 40	1	64,2±1,8
	5	<b>180,1±3,9</b>
Tween 60	1	<u>46,5±2,5</u>
	5	<b>133,5±3,6</b>
Tween 80	1	81,3±2,2
	5	<b>122,2±1,5</b>
Triton X-100	1	<b>115,3±1,9</b>
	5	82,9±2,6
Triton X-305	1	<b>153,4±1,7</b>
	5	98,3±2,6
Brij 35	1	98,9±3,5
	5	<b>105,1±2,6</b>
Brij 58	1	82,9±1,8
	5	72,7±2,3
NDS	1	65,4±3,6
	5	<u>43,2±1,2</u>
DMF	10	72,2±2,6
	25	72,8±1,9
DMSO	10	64,8±2,7
	25	<u>45,1±1,5</u>
Metanolis	10	93,1±1,7
	25	85,7±2,5
Etanolis	10	85,2±1,5
	25	73,5±2,6
Propanolis	10	79,6±2,2
	25	79,1±3,1

Teigiamas efektas pažymėtas paryškintu šriftu. Neigiamas efektas (daugiau kaip 50 %) pažymėtas pabrauktu šriftu.

Nustatyta (3.4 lentelė), kad Tween 40 (5 %), Tween 60 (5 %), Tween 80 (5 %), Triton X-100 (1 %), Triton X-305 (1 %) ir Brij 35 (5 %) turi teigiamą įtaką RecGEOker fermentiniam aktyvumui. Apie 50 % fermentinio aktyvumo RecGEOker prarado aplinkoje esant Tween 20 (1 %), Tween 60 (1 %), NDS (5 %) ir DMSO (25 %).

Šio eksperimento rezultatai leidžia teigti, kad tam tikri detergentai gali padidinti keratinolizinių proteazių aktyvumą. Manoma, kad detergentai veikia ne fermentą, o substratą – padaro labiau prieinamą fermentui <sup>53</sup>.

### 3.1.8.5. Slopiklių įtakos keratinoliziniam aktyvumui įvertinimas

Siekiant nustatyti slopiklių (EDTA, EGTA, DTT,  $\beta$ -merkaptioetanolio, leupeptino, fenantrolino, Pefabloc<sup>®</sup> SC) įtaką RecGEOker aktyvumui fermentas kartu su slopikliu inkubuotas 60 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos liakamasis fermentinis aktyvumas įvertintas vykdant standartinę reakciją (2.2.19.). Gauti rezultatai pateikti 3.5 lentelėje.

**3.5 lentelė.** Slopiklių įtaka RecGEOker aktyvumui ir stabilumui.

Slopiklis	Koncentracija (mM)	Liekamasis aktyvumas (%)
Kontrolė	-	100
EDTA	10	<u>39,1±1,8</u>
EGTA	10	<u>37,8±2,4</u>
DTT	1	<b>139,1±2,2</b>
$\beta$ -ME	5	95,7±2,9
Leupeptinas	10	92,9±1,8
Fenantrolinas	10	<u>29,5±3,2</u>
Pefabloc <sup>®</sup> SC	1	94,8±1,9

Teigiamas efektas pažymėtas paryškintu šriftu. Neigiamas efektas (daugiau kaip 50 %) pažymėtas pabrauktu šriftu.

Literatūroje yra duomenų, kad redukuojančios medžiagos paprastai stimuliuoja keratinazių aktyvumą ir tai yra susiję su tuo, kad jos redukuoja substrato disulfidinius tiltelius tarp cisteinų dar prieš įvykstant fermentinei reakcijai<sup>51</sup>. Iš 3.5 lentelės matyti, kad redukuojantis agentas DTT turi teigiamos įtakos RecGEOker fermentiniam aktyvumui – 139,1±2,2 %.

Dauguma keratinazių priklauso serino ar metalo kataliziniam tipui. Siekiant nustatyti/patvirtinti RecGEOker fermento katalizinį tipą, fermentas buvo inkubuojamas su EDTA (chelatuoja  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ir  $Zn^{2+}$ ), EGTA (chelatuoja  $Ca^{2+}$  atrankiau nei  $Mg^{2+}$ ), leupeptinu (slopina cisteino/serino proteinazes), fenantrolinu (slopina metalo proteinazes ( $Ca^{2+}$ , specifiškiau  $Zn^{2+}$ )) ir Pefabloc<sup>®</sup> SC (slopina serino proteinazes, veikia kaip FMSF). Apibendrinus gautus rezultatus galima teigti, kad RecGEOker fermentas priklauso metalo peptidazėms, o fermentiniam aktyvumui ir/arba stabilumui pasireikšti svarbūs  $Ca^{2+}$  ir  $Zn^{2+}$  jonai. Šie rezultatai patvirtina literatūroje

esančius duomenis apie termolizino aktyvumui ir stabilumui reikalingus metalo jonus<sup>96</sup>.

### 3.1.8.6. Substratinio savitumo nustatymas

Siekiant nustatyti substratinį savitumą fermentinės reakcijos vykdytos standartinėmis sąlygomis (2.2.19.) naudojant 4 mg tirpaus (jaučio serumo albuminas, Na-kazeinatas, želatina) ir netirpaus (vilnos keratinas, kolagenas) substrato.

Keratinazės paprastai yra endopeptidazės, kurios pasižymi plačiu substratiniu savitumu. Dažniausiai tirpūs substratai (pvz., kazeinas) yra lengviau hidrolizuojami nei netirpūs (pvz., keratinas, kolagenas, elastinas), tačiau yra keletas keratinazių, kurios pasižymi didesniu aktyvumu hidrolizuojant netirpius substratus, lyginant su tirpiaais<sup>145</sup>.

#### **Kiekybinė analizė:**

**3.6 lentelė.** RecGEOker substratinio savitumo įvertinimas.

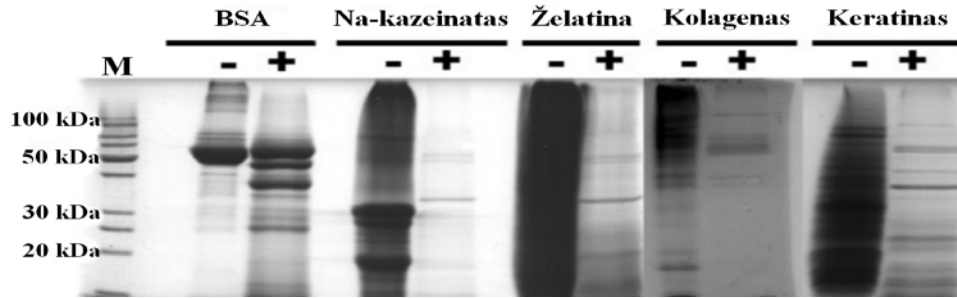
Baltyminis substratas	Santykinis aktyvumas (%)
Vilnos keratinas	100
Kolagenas	98±1,1
Na-kazeinatas	95±1,4
Želatina	92±2,5
Jaučio serumo albuminas	37±1,9

Remiantis gautais rezultatais (3.6 lentelė) galima teigti, kad RecGEOker keratinolizinės peptidazės didžiausias savitumas yra keratinui iš vilnos (100 %) ir kolagenui (98±1,1 %). Šie substratai yra netirpūs, todėl RecGEOker galima priskirti prie netirpų substratų efektyviau hidrolizuojančių keratinolizinių peptidazių.

#### **Kokybinė analizė:**

Kiekybiškai įvertinus RecGEOker substratinį savitumą yra svarbu nustatyti kokybinį RecGEOker substratinį savitumą. Šiam tikslui hidrolizuoti

substratai ir susidarę produktai yra išfrakcionuojami NDS-PAGE. Gauti rezultatai pateikti 3.13 pav.



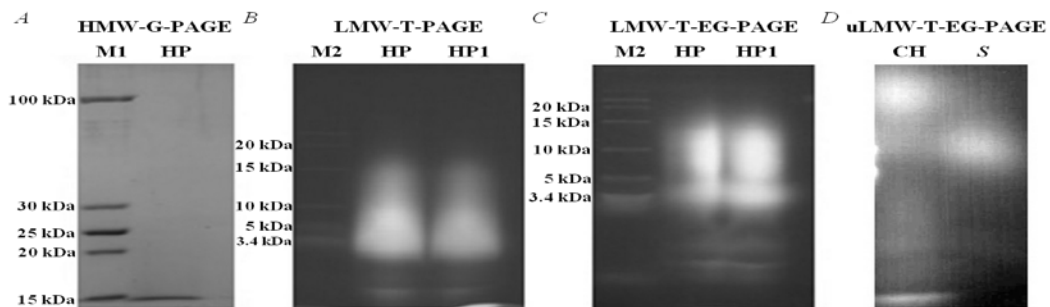
**3.13 pav.** RecGEOker substratinio savitumu kokybinė analizė. (-) – mėginys prieš hidrolizę. (+) – mėginys po hidrolizės. M – PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

RecGEOker pasižymi plačiu substratiniu savitumu ir geba efektyviai hidrolizuoti keratiną, kolageną, želatiną ir Na-kazeinatą (3.13 pav.). Dalinė hidrolizė gauta veikiant jaučio serumo albuminą. Šie kokybinės analizės rezultatai patvirtina gautus kiekybinės analizės duomenis.

### 3.1.8.7. Hidrolizės produktų analizė

#### Produktų analizė PAGE:

Kiekybiškai ir kokybiškai įvertinus RecGEOker substratinį savitumą yra svarbu nustatyti susidariusių hidrolizės produktų – mažos molekulinės masės peptidų – kokybę. Gauti rezultatai pateikti 3.14 pav.



**3.14 pav.** Hidrolizės produktų analizė. M1 – PageRuler™ Unstained Protein Ladder. M2 – PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder. (A) – HMW-G-PAGE – glicininė, didelės molekulinės masės baltymų elektroforezė. (B) – LMW-T-PAGE – tricininė, mažos molekulinės masės baltymų elektroforezė. (C) – LMW-T-EG-PAGE – tricininė, mažos molekulinės masės baltymų elektroforezė su etilenglikoliu. (D) – uLMW-T-EG-PAGE – tricininė, ypač mažos molekulinės masės baltymų elektroforezė su etilenglikoliu. HP/HP1 – hidrolizės produktai, gauti biologinės degradacijos metu, naudojant RecGEOker. CH – komerciniai hidrolizės produktai, gauti cheminės degradacijos metu. S – ypač mažos molekulinės masės peptidai.

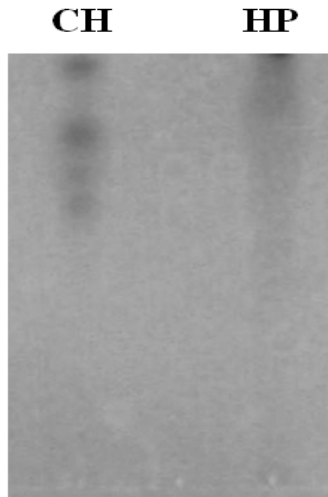
Mažos molekulinės masės peptidai yra svarbūs daugelyje biotechnologijos sričių. Biologinės hidrolizės metu gauti peptidai turi būti tam tikro dydžio. Didesni nei 5 kDa produktai gali pasižymėti alergenišku poveikiu, o mažesni nei 0,5 kDa – neturėti jokio biologinio aktyvumo <sup>267</sup>. Biologinės hidrolizės tikslas – gauti peptidus, kurių molekulinė masė būtų nuo 1 kDa iki 5 kDa.

Pirmame hidrolizės produktų analizės etape gauti peptidai buvo frakcionuojami HMW-G-PAGE (3.14, A). Nustatyta, kad visi hidrolizės produktai HP/HP1 yra mažesni nei 15 kDa. Antrame etape hidrolizės produktai frakcionuojami naudojant LMW-T-PAGE ir LMW-T-EG-PAGE, kurių frakcionavimo geba yra nuo 1 kDa iki 20 kDa (3.14, B ir D). Gauti rezultatai patvirtina, kad gauti peptidai yra mažesni nei 15 kDa. Keratino hidrolizės produktai gali būti priskirti dviem grupėms: dideli (tarp 5 kDa ir 15 kDa; *L*) ir maži (apie 3,4 kDa; *S*). Trečiajame etape hidrolizės produktai analizuoti uLMW-T-EG-PAGE (3,14, D). Pademonstruota, kad *S* grupės peptidai formuoja vieną homogenišką peptidų telkinį, o komerciniai peptidai formuoja du telkinius: didelės molekulinės masės, kurie gali būti alergeniški ir mažos molekulinės masės, kurie gali neturėti jokio biologinio aktyvumo.

#### **Produktų analizė TLC:**

Keratino hidrolizės produktai (HP), gauti keratiną veikiant RecGEOker, išanalizuoti plonasluoksnės chromatografijos metodu. Rezultatai pateikti 3.15 pav.

Plonasluoksnės chromatografijos rezultatai (3.15 pav.) leidžia teigti, kad komercinio preparato peptidai (CH) formuoja 4 peptidų telkinius, o biologinės hidrolizės metu gauti peptidai (HP) formuoja vieną didelį heterogenišką peptidų telkinį. Šie rezultatai patvirtina, kad biologinės degradacijos metu galima gauti didesnės įvairovės peptidus. Toks procesas padidina galimybę gauti pridėtinės vertės bioaktyvius peptidus.



**3.15 pav.** Hidrolizės produktų analizė TLC. CH – komerciniai hidrolizės produktai, gauti cheminės degradacijos metu. HP – hidrolizės produktai, gauti biologinės degradacijos metu, naudojant RecGEOker.

Mūsų gauti rezultatai leidžia teigti, kad RecGEOker yra tinkamas biologinis katalizatorius keratino hidrolizės produktų gamybai. Keratinolizinės peptidazės yra svarbios daugelyje pramonės sričių (farmacijoje ir/ar biomedicinoje, detergentų, odos, tekstilės, maisto pramonėje ir kt.). Iki šiol identifikuota ir aprašyta nedaug keratiną ar į keratiną panašų substratą gebančių hidrolizuoti mikroorganizmų ir jų sintetinamų keratinolizinių peptidazių. Šis tyrimas ir eksperimento rezultatai yra ypač svarbūs dėl potencialių keratinolizinių peptidazių panaudojimo galimybių pramoninėje biotechnologijoje ir kosmetikos pramonėje.

### **3.2. Mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamos keratinolizinės peptidazės**

Šiuo metu duomenų bazėse daugiausia sutinkama keratinolizinių peptidazių, kurios yra sintetintos mezofilinių mikroorganizmų<sup>242</sup>. Tikėtina, kad iš tokių mikroorganizmų išskirtos keratinazės gali būti funkciškai aktyvios kambario ar aplinkos temperatūroje, pasižymėti savitomis išskirtinėmis savybėmis, kurios būtų lengvai ir ekonomiškai pritaikomos įvairiose biotechnologijos srityse.

### 3.2.1. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų paieška ir identifikavimas

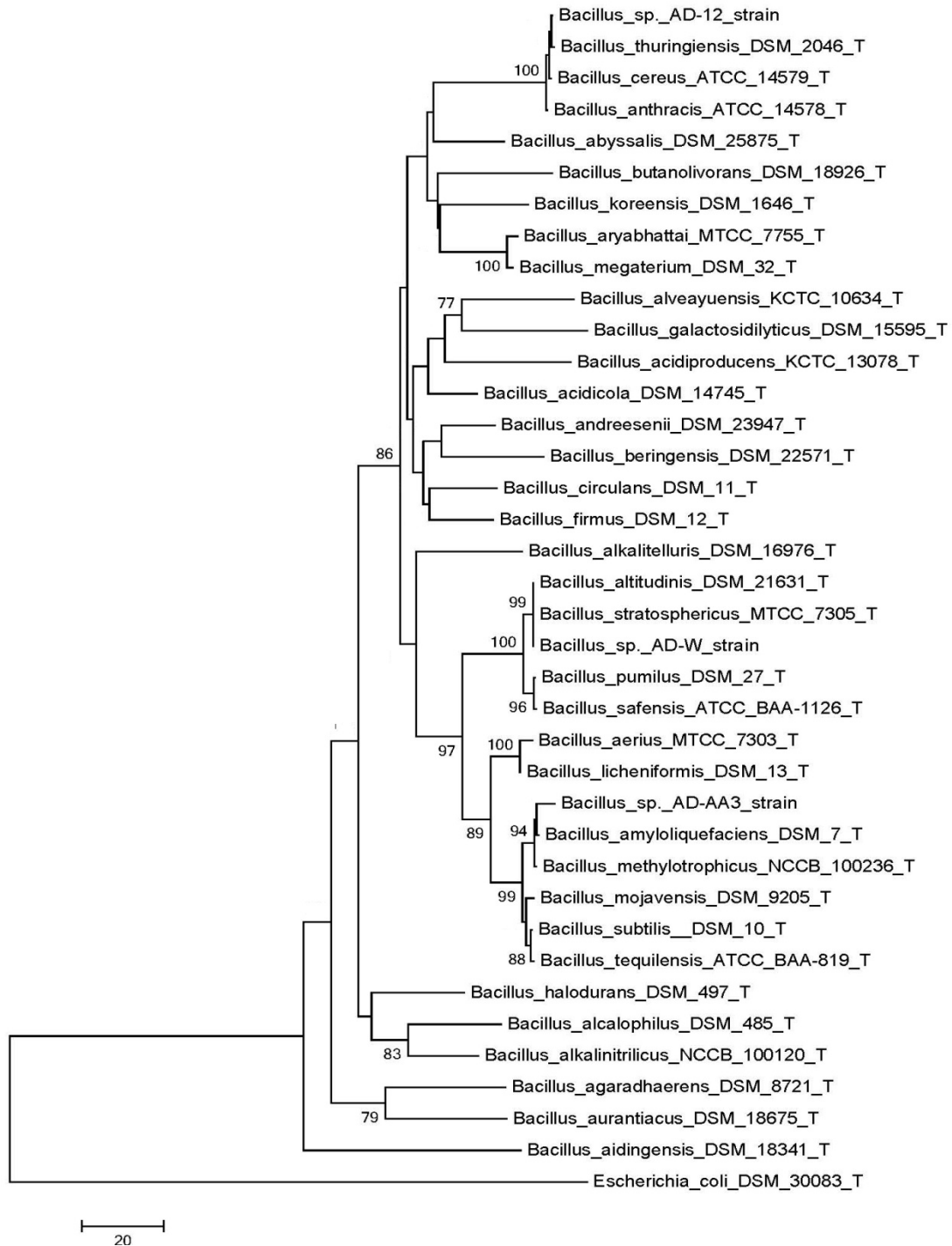
Mezofilinių, keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų paieška buvo vykdoma dirvožemio mėginiuose, paimtuose Vilniaus universiteto, Gamtos mokslų fakulteto teritorijoje ir paukščių plunksnose, kurios buvo rastos Baltijos jūros pakrantėje (Palanga, Lietuva). Atranka buvo vykdoma naudojant selektyvią modifikuotą terpę B (pH 7). Analizuojant užaugusias mikroorganizmų kolonijas ir aplink kolonijas susidariusias skaidrias hidrolizės zonas, buvo identifikuota 19 izoliatų (AA1, AA2, AA3, 12, C1, C2, C3, C4, C5, A, B, E, F, W, K1-2, K1-3, K1-4, J4 ir G4). Didžiausias hidrolizės zonas formavo 12, W ir AA3. Šie izoliatai pasirinkti tolimesniems tyrimams. Suteikti izoliatų pavadinimai: AD-12, AD-W ir AD-AA3.

AD-12, AD-W ir AD-AA3 izoliatų identifikavimas ir priskyrimas gentims, vykdytas pagal 3.1.2. skyrelyje aprašytą strategiją. Naudojant BLASTn algoritmą nustatyta, kad izoliatas AD-12 panašiausias į *Bacillus thuringiensis* (99 % panašumas) ir *B. cereus* (99 % panašumas).

Toks panašumas leidžia teigti, kad AD-12 izoliatas priklauso *Bacillus cereus* grupei <sup>268</sup>. Šiai grupei priklauso labai sunkiai viena nuo kitos atskiriamos rūšys: *B. cereus*, *B. thuringiensis* ir *Bacillus anthracis*. Viena iš šių rūšių – *B. thuringiensis*, geba formuoti parasporinį toksišką kristalą, kuris leidžia išskirti šią rūšį iš kitų *B. cereus* grupei priklausančių rūšių <sup>269</sup>. Šio kristalo formavimasis AD-12 izoliante buvo įrodytas dar magistrantūros studijų metu. AD-12 izoliato 16S rDNR seka pateikta į NCBI duomenų bazę (GenBank: KJ636471.1).

Nustatytas AD-W izoliato giminingumas *B. pumilus* (100 % panašumas), *Bacillus stratosphericus* (100 % panašumas) ir *Bacillus safensis* (100 % panašumas), o AD-AA3 – *Bacillus amyloliquefaciens* (99 % panašumas) ir *Bacillus methylotrophicus* (99 % panašumas). 16S rDNR sekos pateiktos į NCBI duomenų bazę: AD-W (GenBank: KU950739) ir AD-AA3 (GenBank: KU950740).

Nustatyta mezofilinių izoliatų filogenetinė padėtis (3.16 pav.).



**3.16 pav.** AD-12, AD-W ir AD-AA3 izoliatų filogenetinė padėtis, remiantis 16S rDNR sekų analize. Brūkšnyis žymi 20 nukleotidų pasikeitimą 1000 nukleotidų. Naudotas MEGA 7.0 programinis paketas, NJ metodas <sup>224-227</sup>.

Filogenetinio medžio rezultatų analizė patvirtina visų mezofilinių izoliatų priklausomybę *Bacillus* genties bakterijoms (3. 16 pav.). AD-12



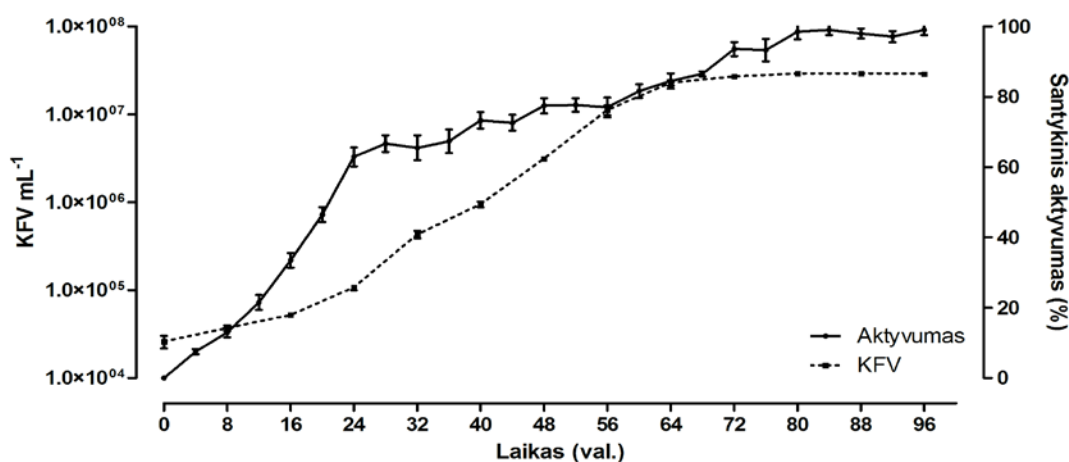
izoliatas artimiausias *B. thuringiensis* DSM 2046<sup>T</sup>, AD-W – *Bacillus altitudinis* DSM 21631<sup>T</sup> ir *B. stratosphericus* MTCC 7305<sup>T</sup>, AD-AA3 – *B. amyloliquefaciens* DSM 7<sup>T</sup>. Įvertinus visus filogenetinės priklausomybės rezultatus, izoliatams suteikti pavadinimai:

- AD-12 – *Bacillus* sp. AD-12 kamienas;
- AD-W – *Bacillus* sp. AD-W kamienas;
- AD-AA3 – *Bacillus* sp. AD-AA3 kamienas.

### 3.2.2. Mezofilinių kamienų augimo dinamikos analizė

Remiantis anksčiau aprašytais AD-11 kamieno rezultatais (3.1.3. skyrelis), visi mezofiliniai kamienai auginami sintetinėje B terpėje.

#### *Bacillus* sp. AD-12 augimo dinamika:



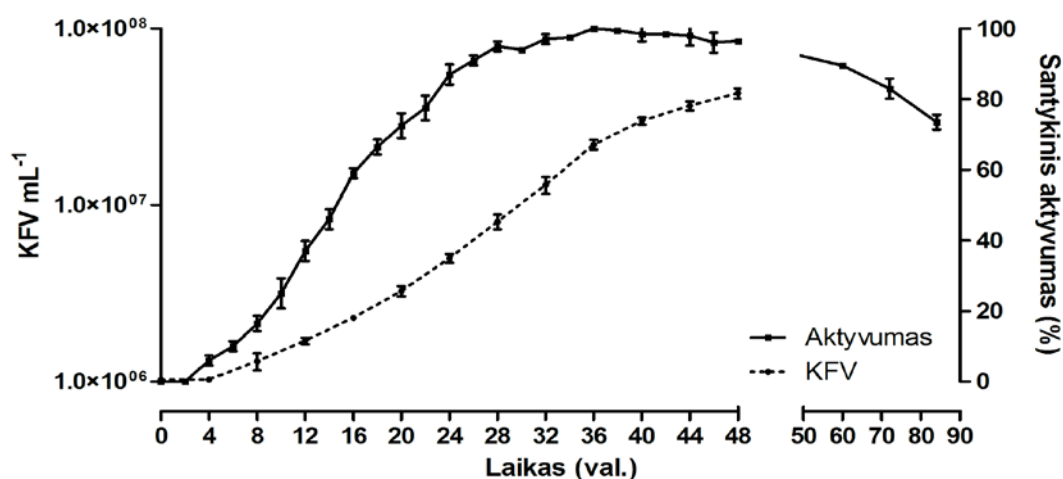
**3.17 pav.** AD-12 kamieno augimo dinamika sintetinėje B terpėje. 100 % santykinis aktyvumas –  $67 \pm 2$  U mL<sup>-1</sup>.

Iš grafiko (3.17 pav.) matyti, kad ląstelių stacionari fazė pasiekama 64 augimo valandą, esant  $\sim 2,29 \times 10^7$  ląst. mL<sup>-1</sup>. Keratinolizinis aktyvumas intensyviai didėja pirmas 24 augimo valandas ir tame taške pasiekia 63 % aktyvumą. Likusias augimo valandas fermentinis aktyvumas didėja iš lėto ir 80 augimo val. pasiekia maksimalų 100 % aktyvumą. Tokie rezultatai leidžia teigti, kad AD-12 kamieno keratinolizinė peptidazė gali būti indukuojama

terpėje esančio keratino. Pirmosiomis augimo valandomis vyksta ypač intensyvi keratinolizinės peptidazės sintezė ir sekrecija, nes reikalingas didelis fermento kiekis keratino hidrolizei iki oligopeptidų ir laisvų aminorūgščių, kurios yra metabolizuojamos ląstelės. Apibendrinant:

- Fermento sintezės ir sekrecijos pradžia – fermentinis aktyvumas detektuojamas 4 augimo valandą;
- Fermento aktyvumas – maksimalus fermento aktyvumas pasiekiamas 80 augimo valandą;
- Fermento degradacija (stabilumas) – nuo 80 augimo val. iki 96 augimo val. fermentinis aktyvumas nemažėja, todėl galima teigti, kad stebėtu laikotarpiu fermentas nebuvo arba buvo silpnai degraduojamas;
- Augimo terpės įtaka fermento sintezei – mitybinėje terpėje esantis vilnos keratinas indukuoja keratinolizinės peptidazės sintezę;
- Augimo pabaigos laikas – auginimas turėtų būti nutraukiamas 80-96 augimo valandą.

#### ***Bacillus* sp. AD-W augimo dinamika:**



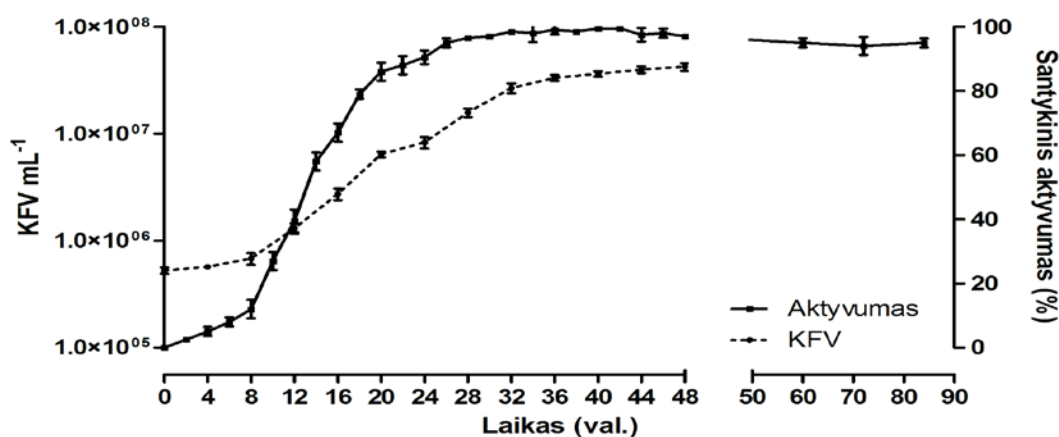
**3.18 pav.** AD-W kamieno augimo dinamika sintetinėje B terpėje. 100 % santykinis aktyvumas –  $119,67 \pm 6,03 \text{ U mL}^{-1}$ .

AD-W kamieno augimo dinamika panaši į AD-12 kamieno (3.18 pav.). Stacionari ląstelių augimo fazė pasiekama 48 augimo val. ( $\sim 4,27 \times 10^7$  ląst.

mL<sup>-1</sup>). Maksimalus aktyvumas detektuojamas 36 augimo valandą. Intensyviausia keratinolizinės peptidazės sintezė vyksta ląstelių eksponentinės fazės pradžioje ir viduryje, todėl galima teigti, kad fermento sintezė yra indukuojama vilnos keratino. Apibendrinant:

- Fermento sintezės ir sekrecijos pradžia – fermentinis aktyvumas detektuojamas 4 augimo valandą;
- Fermento aktyvumas – maksimalus fermento aktyvumas pasiekiamas 36 augimo valandą;
- Fermento degradacija (stabilumas) – šio kamieno sekretuojama keratinolizinė peptidazė yra degraduojama arba praranda aktyvumą, nes nuo 48 val. iki 84 val. matomas aktyvumo sumažėjimas iki 74 %;
- Augimo terpės įtaka fermento sintezei – mitybinėje terpėje esantis vilnos keratinas indukuoja keratinolizinės peptidazės sintezę;
- Augimo pabaigos laikas – auginimas turėtų būti nutraukiamas 36-48 augimo valandą, siekiant išvengti fermentinio aktyvumo praradimo.

### ***Bacillus* sp. AD-AA3 augimo dinamika:**



**3.19 pav.** AD-AA3 kamieno augimo dinamika sintetinėje B terpėje. 100 % santykinis aktyvumas – 191±6 U mL<sup>-1</sup>.

Stacionari ląstelių augimo fazė pasiekama 32-36 augimo val. (~3 × 10<sup>7</sup> ląst. mL<sup>-1</sup>). Maksimalus aktyvumas detektuojamas 32 augimo valandą.

Intensyviausia keratinolizinės peptidazės sintezė vyksta ląstelių eksponentinės fazės pradžioje. Apibendrinant:

- Fermento sintezės ir sekrecijos pradžia – fermentinis aktyvumas detektuojamas 2 augimo valandą;
- Fermento aktyvumas – maksimalus fermento aktyvumas pasiekiamas 32 augimo valandą;
- Fermento degradacija (stabilumas) – gauti rezultatai leidžia teigti, kad AD-AA3 kamieno sekretuojama keratinolizinė peptidazė yra stabili mitybinėje terpėje, nes nuo 48 val. iki 84 val. aktyvumas sumažėja tik keliais procentais;
- Augimo terpės įtaka fermento sintezei – mitybinėje terpėje esantis vilnos keratinas indukuoja keratinolizinės peptidazės sintezę;
- Augimo pabaigos laikas – auginimas turėtų būti nutraukiamas 32 augimo valandą.

Rekomendacija: mezofilinius kamienus (AD-12, AD-W, AD-AA3) auginti sintetinėje terpėje B iki pasiekiamas maksimalus fermentinis aktyvumas. Galimas ilgesnis kultūrų auginimo laikas, tačiau svarbu atkreipti dėmesį į fermentų stabilumą.

### **3.2.3. Mezofilinių mikroorganizmų sintetinamų keratinazių produkavimas**

Daliniam AD-12, AD-W ir AD-AA3 kamienų sekretuojamų keratinazių charakterizavimui kamienai buvo auginami pagal 3.2.2. skyrelyje nustatytas sąlygas. Gautų sekretomo baltymų išsodinimas ir kitos procedūros, skirtos paruošti grubius baltymų prapratus, vykdytos pagal 3.1.4. skyrelyje aprašytą strategiją. Baltymų išsodinimo rezultatai pateikti 3.7 lentelėje.

### 3.7 lentelė. Sekretominių baltymų išsodinimas.

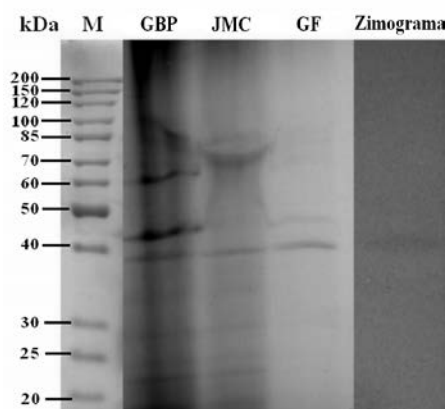
Įsotinimo laipsnis (%)	Savitasis aktyvumas (U mg <sup>-1</sup> )		
	AD-12	AD-W	AD-AA3
0-20	19,67±5,03	31±3,46	15,67±3,21
20-40	43,33±6,11	160±26,06	290,33±14,05
40-60	48±5,29	255,67±11,59	209±16,82
60-80	30,33±4,16	205±13,23	160±13,75
0-75	<u>120,4±4,1</u>	ND	ND
20-80	ND	<u>526±15,5</u>	<u>520±12,01</u>

ND - nėra duomenų.

Remiantis gautais rezultatais (3.7 lentelė), tolimesniems eksperimentiniams darbams pasirinktos įsotinimo frakcijos, kuriose gautas didžiausias savitasis aktyvumas (pabraukta). Suteikti keratinolizinių peptidazių pavadinimai: AD-12 kamieno – BtKER (*B. thuringiensis* keratinazė); AD-W kamieno – BPKer (*Bacillus produced* keratinazė); AD-AA3 – BAKer (*B. amyloliquefaciens* keratinazė).

### 3.2.4. Mezofilinių mikroorganizmų sintetinių keratinazių gryninimas

Kokybiškai fermentų fizikinių ir cheminių savybių analizei yra svarbu turėti gryną ar aukšto išgryninimo laipsnio fermentinį tirpalą. Šiam tikslui pasiekti BtKER fermentas buvo gryninamas pasinaudojant jonų mainų chromatografija ir gel-filtracija. Gryninimo rezultatai pateikti 3.20 pav.



3.20 pav. BtKER gryninimas ir zimograma. M – PageRuler™ Unstained Protein Ladder. GBP – grubus baltymų ekstraktas. JMC – mėginys, po jonų mainų chromatografijos. GF – mėginys, po gel-filtracijos. Zimograma – išgryninto natyvaus BtKER baltymo aktyvumas zimogramoje.

3.20 pav. matyti, kad pasinaudojus dviejų etapų (jonų mainų chromatografijos ir gel-filtracijos) gryninimo strategija, pavyko sėkmingai išgryninti BtKER fermentą. Gryninimo eiga pateikta 3.8 lentelėje. Remiantis NDS-PAGE ir zimogramos rezultatais, nustatyta, kad molekulinė šio fermento masė yra ~39 kDa. Daugelio charakterizuotų keratinazių molekulinė masė yra nuo 15 kDa iki 240 kDa<sup>53</sup>. *Bacillus* genties bakterijų keratinazės daugiausia yra vidutinio dydžio: 80 kDa (*B. cereus*)<sup>270</sup>, 26 kDa (*B. licheniformis*)<sup>69</sup>, 65 kDa (*B. pumilus*)<sup>70</sup>, 69 kDa (*B. subtilis*)<sup>75</sup>, 30 kDa ir 66 kDa (*Bacillus halodurans*)<sup>174</sup>, 30 kDa (*Bacillus megaterium*)<sup>271</sup>, 27,5 kDa (*Bacillus pseudofirmis*)<sup>272</sup>.

**3.8 lentelė.** BtKER gryninimo eiga.

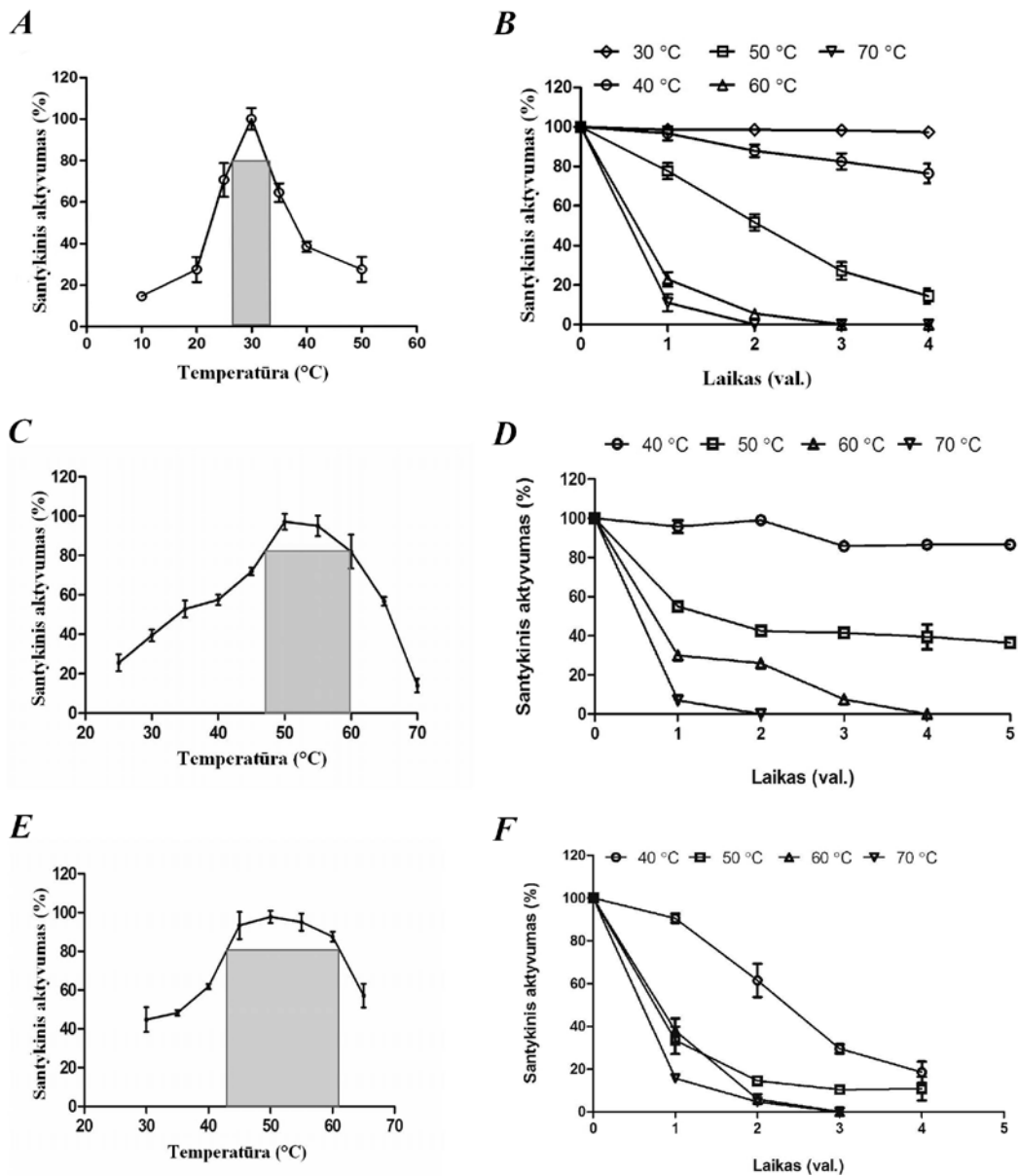
Gryninimo stadija	Bendras baltymo kiekis (mg)	Bendrasis aktyvumas (U)	Savitasis aktyvumas (U mg <sup>-1</sup> )	Išgryninimas	Išeiga (%)
Grubus ekstraktas	79,5±1,3	9574±28,0	120,4±4,1	1	100
DEAE sefaroze	23,7±0,9	5849±19,0	246,8±7,5	2	61,1
Gel-filtracija	4,3±0,4	2682±12,0	623,7±12,9	5,2	28

Daugelis biotechnologinių procesų reikalauja nemažų investicijų ir pajėgumų, todėl yra siekiama sukurti gamtai draugiškus ir ekonomiškai patrauklius naujos kartos procesus. Pvz., keratino turinčios žaliavos šiuo metu yra perdirbamos iki peptidų derinant mechaninius ir cheminius šių substratų apdirbimo būdus. Toks būdas yra neefektyvus ir nekontroliuojamas, nes kiekvienos peptidų partijos kokybė skiriasi. Mikroorganizmai ar jų sintetiniai fermentai gali pakeisti šiuos procesus ir padaryti juos gamtai draugiškus ir efektyvius. Fizikinių ir cheminių savybių nustatymui yra naudojami AD-W ir AD-AA3 sekretomai.

### 3.2.5. Mezofilinių mikroorganizmų keratinazių fizikinės ir cheminės savybės

#### 3.2.5.1. Temperatūros poveikis

Norint įvertinti mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamų keratinazių pritaikomumą pramonėje, buvo nustatyti BtKER, BPKer ir BAKER temperatūriniai aktyvumo diapazonai ir termostabilumas 3.21 pav.



3.21 pav. Temperatūros įtaka aktyvumui (A, C, E) ir stabilumui (B, D, F): A-B – BtKER; C-D – BPKer; E-F – BAKER. Pilkas stačiakampis žymi didesnę nei 80 % aktyvumą.

Eksperimentiškai nustatyta, kad BtKER optimali veikimo temperatūra yra 30 °C, o BPKer ir BAKer – 50 °C. AD-W ir AD-AA3 kamienai yra mezofilai ir geriausiai auga žemesnėje nei 40 °C temperatūroje<sup>273, 274</sup>, tačiau jų sekretuojamos keratinolizinės peptidazės optimaliai veikia aukštesnėje nei maksimali ląstelių augimo temperatūra. Panašūs rezultatai yra gauti su *B. cereus* DCUW<sup>67</sup> ir *B. pumilus*<sup>70</sup>. Tai gali būti aiškinama tuo, kad peptidazių maksimalus fermentinis aktyvumas gali turėti neigiamą efektą ląstelių augimui – degraduoti viduląstelinius baltymus. Šios problemos išvengiama turint fermentus, kurie pasižymi mažesniu efektyvumu ląstelių augimo temperatūroje ar vykdant potransliacines baltymo modifikacijas (pvz., autokatalizė), kuomet fermentas subręsta ir tampa aktyvus tik po pernašos iš ląstelės.

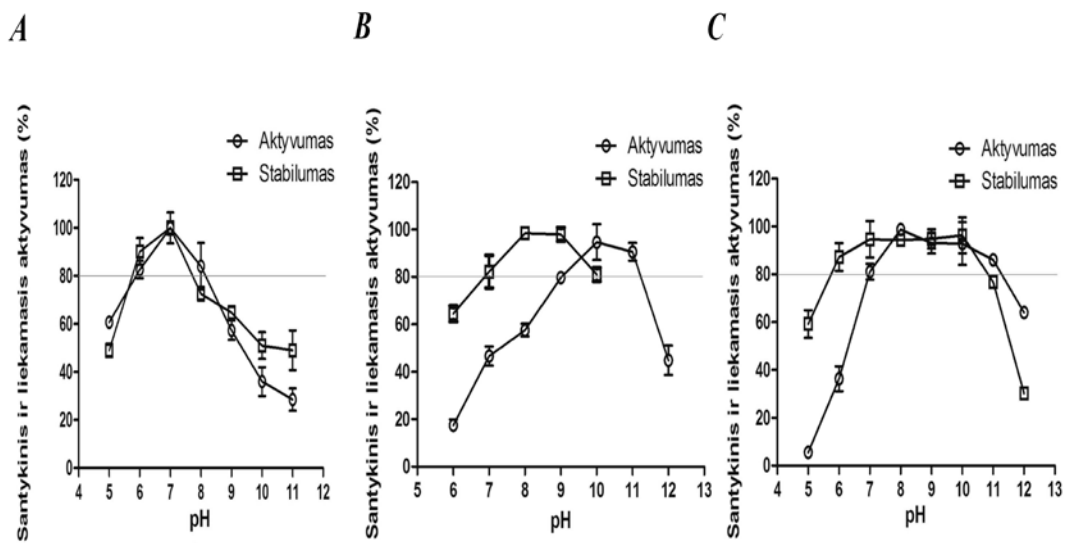
BtKER pasižymi labai siauru temperatūriniu veikimo intervalu – didesni nei 80 % aktyvumą išlaiko nuo ~27 °C iki ~33 °C intervale. Kitų tirtų fermentų – BPKer ir BAKer, didesnis nei 80 % aktyvumo intervalas yra žymiai platesnis: BPKer – ~47-60 °C; BAKer – ~43-61 °C.

BtKER fermentas buvo inkubuotas 4 val. 30-70 °C temperatūroje (3.21 pav., B). Nustatyta, kad 30 °C temperatūroje peptidazė išlaiko maksimalų aktyvumą visą inkubacijos laiką. Didėjant temperatūrai aktyvumas mažėja. Po 4 val. 40 °C temperatūroje aktyvumas išlieka didesnis nei 80 %, tačiau 50 °C – tik 20 %. Jau po pirmos inkubacijos valandos tiek 60 °C, tiek 70 °C temperatūrose aktyvumas krenta iki 15 %, o po antros valandos aktyvumas visiškai prarandamas. Lyginant tarpusavyje BPKer ir BAKer nustatyta, kad abu fermentai nepasižymi termostabilumu (3.21 pav., D ir F). Fermentus inkubuojant 10 °C žemesnėje temperatūroje nei jų nustatytas temperatūrinis optimumas, jau po 1 val. yra prarandamas fermentinis aktyvumas. Rekomendacija: siekiant pritaikyti BPKer ir BAKer fermentus biotechnologijoje, biologinės degradacijos reakcijas vykdyti žemesnėje nei 30-35 °C temperatūroje. Nurodytose temperatūrose fermentinis aktyvumas bus mažas (40-50 %), tačiau pavyks ilgesnį laiką išlaikyti natyvios konformacijos fermentus.



### 3.2.5.2. pH poveikis

Keratinolizinės peptidazės yra plačiai pritaikomos tiek kosmetikos pramonėje, tiek ir odos perdirbimo srityse. Vieni procesai vykdomi silpnai rūgštinėje aplinkoje, kiti stipriai šarminėje, todėl svarbu turėti tokius fermentus, kurie galėtų efektyviai veikti ir būti stabilūs plačiame pH diapazone. Mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamų keratinolizinių peptidazių priklausomybė nuo pH pateikta 3.22 pav.



**3.22 pav.** pH įtaka aktyvumui ir stabilumui BtKER (A); BPKer (B) ir BAKER (C) Pilkas brūkšnys žymi didesnę nei 80 % aktyvumą.

Nustatytas maksimalus fermentinis aktyvumas: BtKER – pH 7; BPKer – pH 10; BAKER – pH 8. Plačiausiu pH veikimo diapazonu pasižymi BAKER, kuris išlaiko didesnę nei 80 % aktyvumą pH 7-11 intervale. Didžiausiu stabilumu taip pat pasižymi BAKER fermentas. Jo stabilumo ribos, išlaikant didesnę nei 80 % aktyvumą – pH 6-11. Verta paminėti BPKer fermentą, kurio stabilumas, esant pH vertei 10, sumažėja iki 81,05 %, nors pats fermentas yra aktyviausias, esant šiai pH vertei. Rekomendacija: tirtus fermentus naudoti mažesnę vandenilio jonų koncentraciją turinčiuose buferiniuose tirpaluose: BtKER – pH 7; BPKer – pH 9; BAKER – pH 10. Literatūroje yra duomenų, kad

maža vandenilio jonų koncentracija gali turėti įtakos šių fermentų substratų natyviai struktūrai ir tokiu būdu palengvinti biodegradacijos procesą<sup>107</sup>.

### 3.2.5.3. Metalų jonų poveikis

Įvairių metalų poveikis mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamoms keratinolizinėms peptidazėms pateiktas 3.9 lentelėje.

**3.9 lentelė.** Metalų jonų įtaka BtKER, BPKer ir BAKer aktyvumui ir stabilumui.

Metalas	Koncentracija (mM)	Liekamasis aktyvumas (%)		
		BtKER	BPKer	BAKER
Kontrolė	-	100	100	100
Mn <sup>2+</sup>	1	102,5±2,3	-	
	5	-	<b>120,4±16,4</b>	75,9±10
	10	<b>112,4±2,9</b>	-	
Li <sup>+</sup>	1	94,9±3,2	-	
	10	101,3±1,8	-	
Mg <sup>2+</sup>	1	93,9±3,1	-	
	5	-	91,5±6,8	71,7±5
	10	95,6±2,6	-	
Ca <sup>2+</sup>	1	87,9±2,6	-	
	5	-	78,6±4,3	104,1±9,9
	10	90,4±2,3	-	
K <sup>+</sup>	1	56,6±2,8	-	
	5	-	93,7±1,1	97,1±15,9
	10	64,6±3,2	-	
Zn <sup>2+</sup>	1	88,3±3,2	-	
	5	-	51±15,4	<u>41,5±10,5</u>
	10	81,3±2,4	-	
Cu <sup>2+</sup>	1	95,6±3,2	-	
	5	-	51,7±2,9	<u>49,7±3</u>
	10	93,9±3,8	-	
Co <sup>2+</sup>	1	68,4±3,1	-	
	5	-	88,1±1,4	72,7±0,5
	10	55,3±2,2	-	
Ni <sup>2+</sup>	1	<u>44,2±3,7</u>	-	
	5	-	-	
	10	<u>37,9±2,8</u>	-	
Fe <sup>2+</sup>	1	<u>39,3±1,5</u>	-	
	5	-	<u>33±9,1</u>	<u>14,5±6,5</u>
	10	<u>19,2±1,5</u>	-	
Na <sup>+</sup>	5	-	90,2±13,3	85,5±15,6

Teigiamas efektas pažymėtas paryškintu šriftu. Neigiamas efektas (daugiau kaip 50 %) pažymėtas pabrauktu šriftu.

Įvertinus metalų jonų įtaką mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamoms peptidazėms nustatyta, kad BtKER fermentui teigiamą poveikį turi  $Mn^{2+}$  (10 mM); BPKer –  $Mn^{2+}$  (5 mM); BAKER - teigiamas efektas nenustatytas. Daugiau nei 50 % BtKER aktyvumas buvo sumažintas aplinkoje esant  $Ni^{2+}$  (1 mM ir 10 mM) ir  $Fe^{2+}$  (1 mM ir 10 mM); BPKer –  $Fe^{2+}$  (5 mM); BAKER –  $Zn^{2+}$  (5 mM),  $Fe^{2+}$  (5 mM) ir  $Cu^{2+}$  (5 mM). Geležies jonai – vienintelis veiksnys, turintis neigiamos įtakos visoms mezofilinių mikroorganizmų peptidazėms. Panašūs rezultatai gauti su *B. pumilus* NRC21 keratinaze <sup>169</sup>, *B. safensis* LAU 13 keratinaze <sup>275</sup>, *B. amyloliquefaciens* K11 šarmine keratinaze <sup>276</sup>, *B. amyloliquefaciens* 6B keratinolizine proteaze <sup>277</sup>.

### 3.2.5.4. Detergentų ir organinių tirpiklių poveikis

Įvairių detergentų ir organinių tirpiklių poveikis mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamoms keratinoliziniams peptidazėms pateiktas 3.10 lentelėje.

**3.10 lentelė.** Detergentų ir organinių tirpiklių įtaka BtKER, BPKer ir BAKER aktyvumui ir stabilumui.

Veiksnys	Koncentracija (%)	Liekamasis aktyvumas (%)		
		BtKER	BPKer	BAKER
Kontrolė	-	100	100	100
Tween 20	1	73,7±3,6	96±2,9	91±2,8
	5	71,5±3,8	101,4±4,8	75,9±11,1
Tween 40	1	97,4±2,9	<b>111,2±4,5</b>	79,3±11,1
	5	93,7±2,4	99,2±3,1	75,5±16,4
Tween 60	1	95,1±2,7	<b>107,3±3,2</b>	82±2,4
	5	92,1±3,6	94,4±12,8	64±10,5
Tween 80	1	78,9±3,2	91,5±10	90,3±11,8
	5	75,5±2,4	83,9±5,6	<u>45,3±4,3</u>
Triton X-100	1	<b>128,9±3,9</b>	77,9±9,2	<u>72,9±14,6</u>
	5	92,1±3,6	72,8±10,6	63,3±15,4
Triton X-305	1	<b>110,5±3,2</b>	-	-
	5	86,8±1,9	-	-
Brij 35	1	98,5±3,2	-	-
	5	96,1±3,3	-	-
Brij 58	1	99,1±2,9	-	-
	5	<b>105,6±3,3</b>	-	-
NDS	1	95,5±3,4	<u>22,1±2,4</u>	<u>6,3±1,8</u>
	5	82,4±2,6	<u>7,7±3,3</u>	<u>0</u>
DMF	1	-	97,3±8,6	94,2±3,4
	10	<b>126,1±3,6</b>	80,6±7,2	68±7,8
	25	<b>134,8±2,9</b>	-	-
DMSO	1	-	99,4±2,9	64,3±15,8

	10	95,5±3,1	93,2±1	52,4±3,8
	25	96,2±2,5	-	-
Metanolis	1	-	77,6±14,4	92,2±6,2
	10	<u>47,2±1,9</u>	<u>48±4,2</u>	65,7±6,3
	25	<u>39,2±2,4</u>	-	-
Etanolis	1	-	56±13,2	62,2±7,2
	10	<u>19,7±1,9</u>	65±14,9	52,6±11,9
	25	<u>18,2±1,6</u>	-	-
Propanolis	1	-	58,8±16,8	76,5±7,2
	10	55,7±3,2	50,4±7,6	61,2±3,8
	25	52,2±3,1	-	-

Teigiamas efektas pažymėtas paryškintu šriftu. Neigiamas efektas (daugiau kaip 50 %) pažymėtas pabrauktu šriftu.

Apibendrinus gautus rezultatus (3.10 lentelė), galima teigti, kad visos tirtos keratinolizinės peptidazės yra stabilios aplinkoje esant daugeliui tirtų detergentų. Teigiamą efektą BtKER turėjo Triton X-100 (1 %), Triton X-305 (1 %) ir Brij 58 (5 %); Silpną teigiamą efektą BPKer – Tween 40 (1 %) ir Tween 60 (1 %); Teigiamas efektas BAKER fermentui nenustatytas. Didžiausią neigiamą efektą lėmė NDS. 5 % šio detergento BPKer ir BAKER aktyvumą sumažino iki 22,1±2,4 % ir 0 %, tačiau BtKER fermento aktyvumui įtaka buvo minimali.

Priešingas efektas nustatytas aplinkoje esant organiniams tirpikliams. Daugelis tirtų tirpiklių turėjo neigiamą įtaką fermentų aktyvumui. Verta išskirti DMF, kuris padidino BtKER aktyvumą iki 126,1±3,6 % (10 %) ir 134,8±2,9 % (25 %).

### 3.2.5.5. Slopiklių poveikis

Įvairių slopiklių poveikis mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamoms keratinolizinėms peptidazėms pateiktas 3.11 lentelėje.

**3.11 lentelė.** Slopiklių įtaka BtKER, BPKer ir BAKer aktyvumui ir stabilumui.

Slopiklis	Koncentracija (mM)	Liekamasis aktyvumas (%)		
		BtKER	BPKer	BAKER
Kontrolė	-	100		
EDTA	10	<u>36,6±2,8</u>	<u>7,7±1,7</u>	<u>24,1±8,6</u>
EGTA	10	<u>24,4±3,4</u>	<u>42,3±14,1</u>	<u>33,7±9,8</u>
DTT	1	<b>173,2±4,2</b>	<b>115,3±4,6</b>	<b>155,2±3</b>
β-ME	5	93,2±2,4	92,2±6,3	<b>176,1±11,8</b>
Leupeptinas	10	<u>34,1±1,7</u>	-	-
Fenantrolinas	10	72,4±3,1	61,3±2,6	<u>31,65±15,3</u>
Pefabloc® SC	1	<u>7,3±1,9</u>	57,6±7,8	<u>42,3±3,7</u>

Teigiamas efektas pažymėtas paryškintu šriftu. Neigiamas efektas (daugiau kaip 50 %) pažymėtas pabrauktu šriftu.

Slopiklių panaudojimo esmė ir jų įtakos įvertinimo svarbumas jau yra aptartas ankstesniuose skyreliuose. Tiriant mezofilinių mikroorganizmų keratinolizines peptidazes (3.11 lentelė) nustatyta, kad visos peptidazės (BtKER, BPKer ir BAKER) gali priklausyti serino peptidazėms. Eksperimentų rezultatai patvirtina literatūros duomenis apie baciloms priklausančias serino keratinazes<sup>53</sup>. Verta paminėti, kad tirtų peptidazių funkcionalumui yra svarbūs metalų jonai. Esant aplinkoje metalus surišantiems junginiams – prarandamas aktyvumas, todėl tirtas peptidazes galima vadinti serino-metalo-peptidazėmis.

Gerai žinomas redukuojančių medžiagų (DTT, β-ME) poveikis keratinazėms ar šių fermentų substratams. Redukuojančios medžiagos gali turėti įtakos struktūriniam baltymams. Redukuojant baltymo paviršiuje ar tarp baltymo domenų esančius disulfidinius tiltelius, pažeidžiama baltymo natyvi erdvinė konformacija. Toks dalinai išlankstytas baltymas dažniausiai praranda savo funkcinį stabilumą ir negali vykdyti tikslinės savo funkcijos<sup>53, 216</sup>. Šis redukuojantis poveikis gali būti nukreiptas tiek į fermentą, tiek ir į jo substratą. Iš 3.11 lentelės matyti, kad DTT ir β-ME ženkliai padidino liekamąjį fermentinį aktyvumą ir tai yra susiję su substrato redukcija. Redukuotas substratas tampa lengviau prieinamas peptidazėms.

### 3.2.5.6. Substratinis savitumas

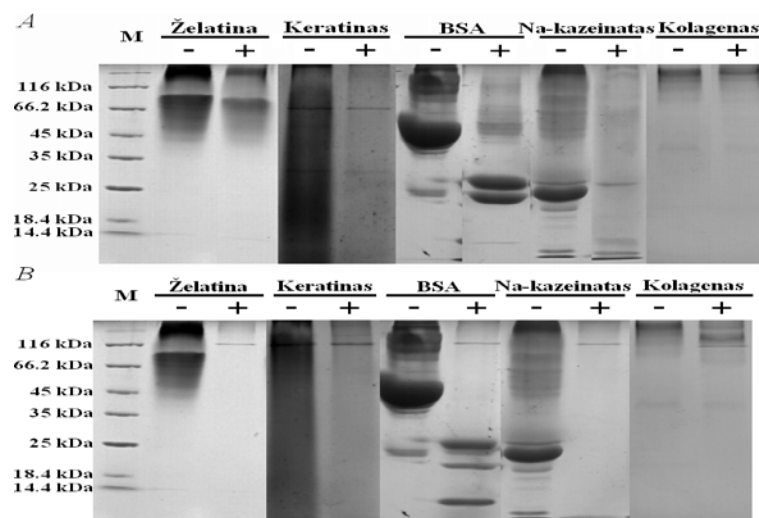
#### Kiekybinė analizė:

Mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamų keratinolizinių peptidazių substratinio savitumo rezultatai pateikti 3.12 lentelėje.

**3.12 lentelė.** BtKER, BPKer ir BAKer substratinio savitumo įvertinimas.

Baltyminis substratas	Santykinis aktyvumas (%)		
	BtKER	BPKer	BAKER
Vilnos keratinas	100	100	61,5±4,8
Na-kazeinatas	84±2,4	96,7±1,8	100
Kolagenas	17±1,1	91,9±5,9	52,1±0,7
Jaučio serumo albuminas	12±1,2	18±5,7	34±1,7
Želatina	7±0,8	10,9±3,5	73,7±2,9

Remiantis gautais rezultatais (3.12 lentelė) galima teigti, kad panašiu substratiniu savitumu pasižymi BtKER ir BPKer. Šie fermentai vienodai efektyviai hidrolizavo vilnos keratiną ir natrio kazeinatą. BPKer fermentas taip pat efektyviai (91,9±5,9 %) hidrolizavo kolageną. BAKer fermentas didžiausiu efektyvumu pasižymėjo hidrolizuodamas natrio kazeinatą – tirpų substratą. Apibendrinant: BtKER ir BPKer gali būti priskirti fermentams, efektyviai hidrolizuojantiems tiek tirpius, tiek netirpius substratus, o BAKer – efektyviau hidrolizuoja tirpius substratus (3.23 pav.).

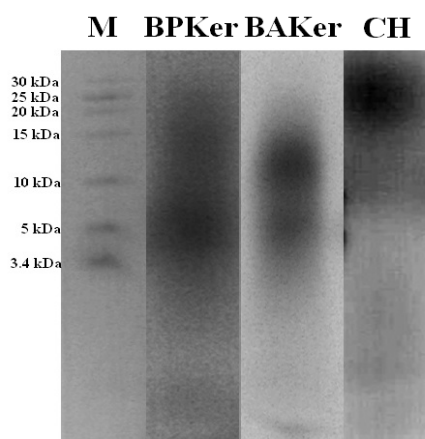


**3.23 pav.** BPKer (A) ir BAKer (B) substratinio savitumo kokybinė analizė. (-) – mėginys prieš hidrolizę. (+) – mėginys po hidrolizės. M – Pierce™ Unstained Protein MW Marker.

### 3.2.5.7. Peptidų analizė

#### Produktų analizė PAGE:

Biologinės degradacijos metu, naudojant BPKer ir BAKer fermentus, yra gaunami mažesnės molekulinės masės paptidai nei cheminės degradacijos metu (3.24 pav.).



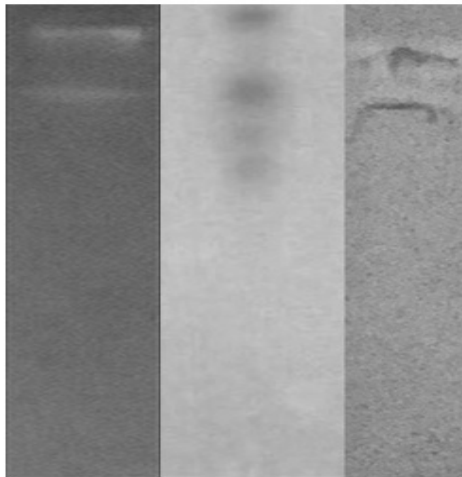
**3.24 pav.** Hidrolizės produktų analizė. M – PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder. BPKer – hidrolizės produktai, gauti keratiną veikiant BPKer fermentu. BAKer – hidrolizės produktai, gauti keratiną veikiant BAKer fermentu. CH – komerciniai hidrolizės produktai, gauti cheminės degradacijos metu.

Nustatyta, kad tiek BPKer, tiek BAKer hidrolizatai formuoja nežymiai vienas nuo kito atskiriamus du peptidų telkinius: BPKer – 10-20 kDa ir 4-7 kDa; BAKer – 4-6 kDa ir 8-13 kDa. Cheminės hidrolizės metu gautų peptidų molekulinė masė didesnė nei 20 kDa.

#### Produktų analizė TLC:

Hidrolizės produktų analizė plonasluoksnės chromatografijos metu (TLC) parodė, kad BPKer ir BAKer formuoja du panašaus pasiskirstymo koeficiento peptidų telkinius (3.25 pav.).

**BPKer    CH    BAKer**



**3.25 pav.** Hidrolizės produktų analizė TLC. CH – komerciniai hidrolizės produktai, gauti cheminės degradacijos metu. BPKer – hidrolizės produktai, gauti keratiną veikiant BPKer fermentu. BAKer – hidrolizės produktai, gauti keratiną veikiant BAKer fermentu.

Visos tirtos mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamos keratinolizinės peptidazės pasižymi hidrolizei tinkamomis tiek fizikinėmis, tiek cheminėmis savybėmis. Šie fermentai gali būti pritaikomi plataus spektro baltyminės kilmės medžiagų biologinei degradacijai iki vertingų mažos molekulinės masės produktų. Hidrolizės produktų – peptidų – funkcionalumas (pvz., antibakterinis poveikis, antioksidacinis poveikis ir kt.) turi būti pademonstruotas *in vitro* ar *in vivo*, tačiau vien jau šių peptidų gamyba, panaudojant mėsų fermentus, yra svarbus žingsnis link efektyvios žaliavų biodegradacijos.

### **3.2.6. BtKER koduojančio geno klonavimas**

#### **3.2.6.1. Geno paieška ir bioinformatinė analizė**

Jau nustatyta, kad *Bacillus* sp. AD-12 kamienas priklauso *B. cereus* mikroorganizmų grupei (3.2.1. skyrelis). Tikėtina, kad keratinolizinės peptidazės, sekretuojamos šiai grupei priklausančių mikroorganizmų, pasižymi aukštu homologiškumu (koduojamos ortologinių genų). NCBI duomenų bazėje yra *B. cereus* keratinazės dalinė seka (GenBank: AEI83225.1). Atlikus šios sekos paiešką bakterijų genomų duomenų bazėje,



([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=)) nustatytas sekos homologiškumas šarminei serino proteazei (*B. thuringiensis* XL6, 99 %, GenBank: CP013000.1), termofilinei serino proteazei (*B. cereus* ATCC 4342, 99 %, GenBank: CP009628.1), subtilizinui (*B. cereus* FM1, 99 %, GenBank: CP009369.1), termitazei (*B. cereus* FORC\_013, 97 %, GenBank: CP011145.1), šarminei serino proteazei (*B. anthracis* Stendal, 94 %, GenBank: CP014179.1). Literatūroje yra duomenų apie į subtiliziną panašių peptidazių gebėjimą hidrolizuoti paukščių plunksnų keratiną, todėl manoma, kad identifikuota geno seka gali koduoti BtKER baltymą<sup>278</sup>.

Remiantis sekų homologiškumu buvo sukurti BtKER-proF ir BtKER-proR pradmenys, skirti pagausinti hipotetinį *btker* geną su priešsrovinėmis ir pasrovinėmis sritimis. Panaudojus *Touchdown* PGR sėkmingai pagausintas 1369 bp ilgio genomines DNR fragmentas. Šio fragmento analizė pateikta 3.26 pav.

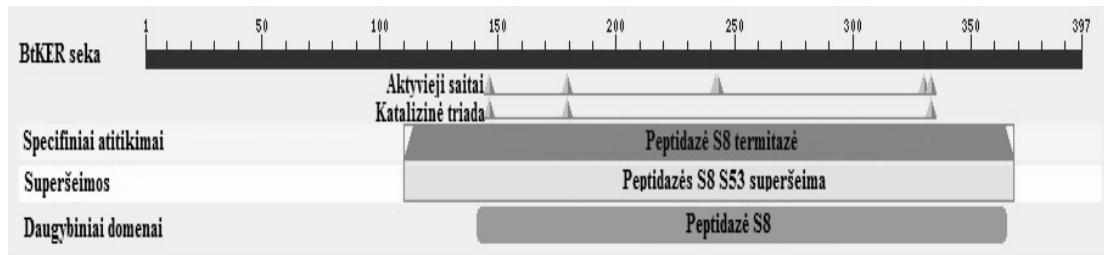
Gauto DNR fragmento *in silico* analizė leido identifikuoti 1194 bp ilgio atviro skaitymo rėmelį, kuris koduoja 397 aminorūgščių baltymą. Šio baltymo apskaičiuota molekulinė masė yra 42390,84 Da, izoelektrinis taškas – 7,991. SignalP 4.1 programa buvo identifikuota 28 aminorūgščių signalinė seka (Pre-seka)<sup>238</sup>. Pašalinus signalinę seką yra gaunamas 369 aminorūgščių subrendęs baltymas, kurio molekulinė masė – 39312,17 Da, o izoelektrinis taškas – 7,014. Teorinė BtKER baltymo molekulinė masė sutampa su eksperimentiškai nustatyta molekuline mase 3.2.4. skyrelyje.

Remiantis MEROPS<sup>240</sup> ir NCBI<sup>241</sup> duomenų bazėmis, pavyko identifikuoti baltymo funkciniam aktyvumui svarbias aminorūgštis, kurios sudaro katalizinę triadą: 146-oje pozicijoje esanti asparto rūgštis, 179-oje – histidinas ir 333-oje – serinas (pozicijos surašytos remiantis Pre-baltymo aminorūgščių seka). Ši SHD katalizinė triada yra konservatyvi, o šią triadą turintys fermentai priskiriami serino proteazėms<sup>279-281</sup>.

5'	<u>ATA TAG TTG AAA AGG AAT GCG ACA TTA</u>	AAG TGT CGC TGA AAA ACT CAT CCA AGA	54
1	BtkER-proF		
1		Pre →	
5'	AAA GGG AGG AAA AAT CTT	ATG AAA AAC AAA ATC ATT GTT TTC CTA TCT GTT TTA	108
1		M K N K I I V F L S V L	
1		Fermentas →	
5'	TCA TTT ATT ATT GGT GGT TTC TTT TTT AAC ACA AAT ACT TCA AGT GCT	GAA ACA	162
1	S F I I G G F F F N T N T S S A E T		
5'	TCA TCT ACT GAT TAC GTC CCT AAC CAA TTA ATC GTT AAG TTC AAA CAA AAT GCC		216
1	S S T D Y V P N Q L I V K F K Q N A		
5'	TCT TTA AGT AAT GTT CAA TCT TTT CAC AAA TCT GTC GGT GCT AAC GTT TTA TCT		270
1	S L S N V Q S F H K S V G A N V L S		
5'	AAA GAT GAT ACG TTA GGT TTT GAA GTC GTT CAA TTT TCA AAA GGT ACT GTC AAA		324
1	K D D T L G F E V V Q F S K G T V K		
5'	GAA AAA ATA AAA AGT TAT AAA AAT AAT CCA GAT GTG GAA TAT GCA GAA CCG AAT		378
1	E K I K S Y K N N P D V E Y A E P N		
5'	TAT TAC GTT CAC GCC TTT TGG ACT CCG AAC GAC CCA TAT TTT AAA AAT CAA TAT		432
1	Y Y V H A F W T P N D P Y F K N Q Y		
5'	GGA TTG CAA AAA ATT CAA GCT CCA CAA GCT TGG GAT AGT CAA CGA AGT GAT CCT		486
1	G L Q K I Q A P Q A W D S Q R S D P		
5'	GGT GTA AAA GTA GCT ATT ATT GAT ACA GGA GTT CAA GGT TCA CAC CCT GAT TTA		540
1	G V K V A I I	D	
1		146	
5'	GCT TCG AAA GTA ATT TAC GGA CAT GAT TAT GTT GAC AAC GAC AAT ACA TCT GAT		594
1	A S K V I Y G H D Y V D N D N T S D		
5'	GAT GGT AAT GGT CAT GGT ACG CAT TGC GCT GGA ATT ACT GGA GCA CTT ACG AAT		648
1	D G N G	H	
1		179	
5'	AAT AGT GTT GGA ATT GCT GGT GTT GCC CCA CAA ACT TCA ATT TAT GCC GTC CGC		702
1	N S V G I A G V A P Q T S I Y A V R		
5'	GTA TTA GAT AAT CAA GGA AGT GGT ACT CTT GAT GCT GTA GCG CAA GGG ATT AGA		756
1	V L D N Q G S G T L D A V A Q G I R		
5'	GAA GCT GCT GAT TCA GGT GCA AAA GTA ATT AGC TTA AGC TTA GGC GCT CCA AAT		810
1	E A A D S G A K V I S L S L G A P N		
5'	GGT GGG ACT GCT TTA CAA CAA GCC GTT CAA TAT GCA TGG AAT AAA GGC TCT GTT		864
1	G G T A L Q Q A V Q Y A W N K G S V		
5'	ATT GTT TCA GCT GCT GGA AAT GCT GGA AAT ACA AAA GCT AAT TAT CCT GCT TAT		918
1	I V S A A G N A G N T K A N Y P A Y		
5'	TAC AAC GAG GTG ATT GCA GTT GCT TCT ACA GAT CAA TCA GAT AGA AAA TCT TCA		972
1	Y N E V I A V A S T D Q S D R K S S		
5'	TTT TCT ACT TAT GGT AAC TGG GTA GAT GTT GCA GCA CCA GGT TCA AAT ATA TAT		1026
1	F S T Y G N W V D V A A P G S N I Y		
5'	TCC ACA TAT AAA GGA AGC ACG TAT CAA TCA TTA AGT GGT ACA TCT ATG GCA ACA		1080
1	S T Y K G S T Y Q S L S G T	S	
1		333	
5'	CCT CAT GTT GCA GGA GTC GCT GCT CTT TTA GCA AAT CAA GGA TAT AGC AAT ACA		1134
1	P H V A G V A A L L A N Q G Y S N T		
5'	CAA ATC CGC CAA ATT ATT GAG TCA ACG TCT GAT AAA ATT AGT GGT ACA GGT ACG		1188
1	Q I R Q I I E S T S D K I S G T G T		
5'	TAT TGG AAA AAT GGT AGA GTC AAT GCA TAT AAA GCT ATA CAA TAT GCT AAA CAA		1242
1	Y W K N G R V N A Y K A I Q Y A K Q		
5'	TTA CAA GAA AAT AAA GCC TCT TAA GAA ATA ATG TAA AAC TTT AAT CAG TGA TCT		1296
1	L Q E N K A S		
5'	GCC ATT AGT ACG GGA TAA AAT AGA AGG AGA GAC TTT TAC AAT TAA	← AGG CTC TCC	1350
1			
5'	<u>TTC TTA CAA ACT ATA TTA C</u>		
1	BtkER-proR		

**3.26 pav.** *btker* geno nukleotidų ir jo koduojamų aminorūgščių sekos. Pre-fermento ir subrendusio baltymo (Fermentas) pradžios aminorūgštys pažymėtos laužtinėmis rodyklėmis. Tiesios rodyklės žymi tiesioginio ir atvirkštinio pradmens prisijungimo vietas. Pilki kvadratai žymi kataliziškai svarbias aminorūgštis (katalizinė triada).

Identifikuoti BtKER baltymo konservatyvūs domenai ir sekos pateiktos 3.27 pav.



**3.27 pav.** Konservatyvūs domenai ir jų padėtis BtKER baltyme. Analizė atlikta NCBI konservatyvių domenų analizės įrankiu<sup>244</sup>.

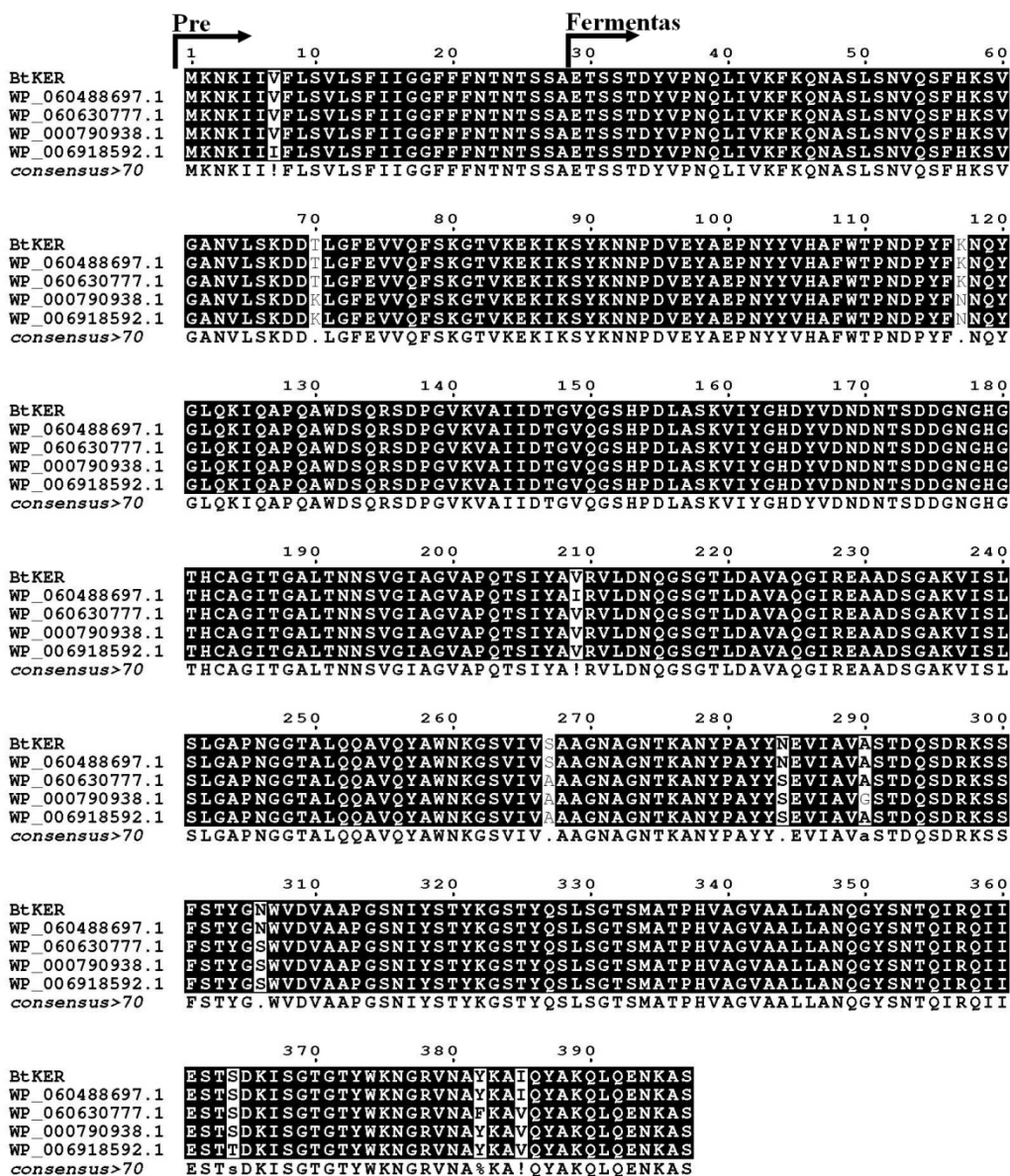
*Specifinis atitikimas S8 peptidazei iš į termitazę panašių peptidazių grupės:* 110-368 aminorūgščių padėtis. Termitazė yra labai plataus veikimo spektro serino proteazė, turinti subtilizino domeną. Būdinga SHD katalizinė triada. S8 peptidazė savo veikimo mechanizmu yra panaši į tripsiną, tačiau nepasižymi homologija. Šių fermentų stabilumas gali būti nulemiamas  $Ca^{2+}$  jonų ir disulfidinių tiltelių.

*Specifinis atitikimas S8 ir S53 peptidazių superšeimai:* 110-368 aminorūgščių padėtis. S8 peptidazių savybės aprašytos jau anksčiau. S53 (sedolizinas) peptidazėms būdinga tai, kad katalizinėje triadoje vietoje histidino yra glutamo rūgštis.

BtKER ir 4 panašiausių baltymų sekų palyginimas pateiktas 3.28 pav. Baltymų sekų palyginimas leido identifikuoti 11 lokusų, kuriuose pasireiškia aminorūgščių pokyčiai:

- Signalinis peptidas – skiriasi 1 aminorūgštis (V7I) nuo šarminės serino proteazės, subtilazės (*Bacillus* sp. GeD10);
- Subrendęs baltymas – skiriasi 2 aminorūgštys (V209I, Y382F) nuo šarminės serino proteazės (*B. cereus*), 4 aminorūgštys (S267A, N284S, N306S, I385V) nuo šarminės serino proteazės (*B. thuringiensis*), 7 aminorūgštys (T70K, K117N, S267A, N284S, A290G, N306S, I385V) nuo termitazės (*B. cereus*), 7 aminorūgštys (T70K, K117N, S267A,

N284S, N306S, S364T, I385V) nuo šarminės serino proteazės, subtilazės (*Bacillus* sp. GeD10).



**3.28 pav.** BtKER aminorūgščių sekos palyginys. WP\_060488697.1 – šarminė serino proteazė (*B. cereus*); WP\_060630777.1 – šarminė serino proteazė (*B. thuringiensis*); WP\_000790938.1 – termitazė (*B. cereus*); WP\_006918592.1 – šarminė serino proteazė, subtilazė (*Bacillus* sp. GeD10). Pre-baltymo (Pre) ir subrendusio baltymo (Fermentas) pradžios aminorūgštys pažymėtos laužtinėmis rodyklėmis. Konsensus seka: didžioji raidė – 100 % panašumas; mažoji raidė – >50 % panašumas; ! – I arba V; # – bet kuris iš N, D, Q, E. Paruošta su ESPrpt 3.0<sup>254</sup>.

Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, kad *in silico* identifikuota ir gauta geno seka gali koduoti mūsų tirtą BtKER baltymą. Geno ir baltymo sekos palyginimas su duomenų bazėse esančiomis sekomis ir šių sekų analizė leido priskirti BtKER baltymą serino peptidazių S8 šeimai, tačiau funkcijos patvirtinimui yra reikalingas grynas rekombinantinis baltymas. Šiam tikslui pasiekti buvo vykdomi hipotetinio *btker* geno klonavimo darbai.

### 3.2.6.2. *btker* geno klonavimas ir raiška

Mezofilinio mikroorganizmo *Bacillus* sp. AD-12 kamieno sekretuojamos keratinolizinės peptidazės BtKER hipotetinio geno klonavimui buvo pasirinktos 4 skirtingos raiškos strategijos. Klonavimo produktas – genas be signalinės sekos.

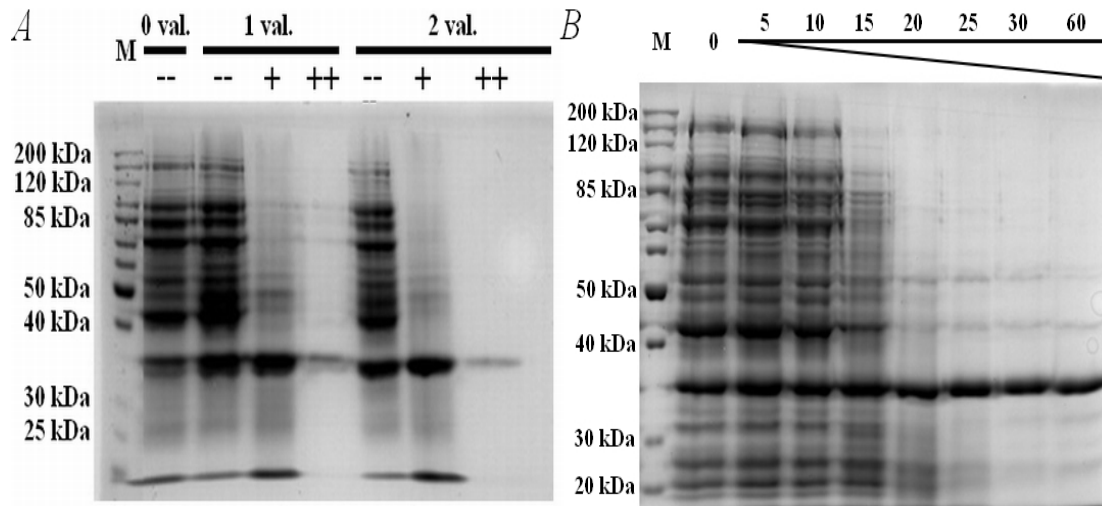
#### 3.13 lentelė. *BtKER* geno klonavimo strategijos.

Raiškos vektorius	Raiškos kamienas	Naudoti pradmenys	Suteiktas pavadinimas
pET-21c(+)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	BacKerNde32F BacKerXho31R	pET-21c/BtKER
pET-28c(+)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	BacKerNde32F BacKerSTOPXho31R	pET-28c/BtKER
pET-28c(+)	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	BacKerNde32F BacKerSTOPXho31R	pET-28cR/BtKER
pBAD30	<i>E. coli</i> BW25113	BacKerEcoR31F BacKerSTOPXba31R	pBAD30/BtKER

Visi *btker* geno klonavimo darbai atlikti pagal 3.1.6.2. skyrelyje aprašytą klonavimo strategiją. Geno raiškos darbai atliekami pagal standartines gamintojų rekomendacijas, naudojant atitinkamus antibiotikus ir induktorius.

Pirmame darbo etape buvo pasirinkta *btker* geną klonuoti į pET šeimos raiškos vektorius. Tinkamai parinkus sukurtus pradmenis, buvo gauti BtKER baltymo variantai su 6 histidino aminorūgštimis N baltymo gale (pET-28c/BtKER) ir su 6 histidino aminorūgštimis C baltymo gale (pET-21c/BtKER). Vykdamt baltymų raišką standartinėmis fiziologinėmis sąlygomis nepavyko identifikuoti rekombinantinio baltymo. Nuo indukcijos pradžios

praėjus 0,5-1 val. yra stebimas visų ląstelės baltymų degradavimas (3.29 pav.). Panašūs rezultatai gaunami naudojant tiek pET-21c(+) vektorių (*E. coli* BL21 (DE3)), tiek pET-28c(+) (*E. coli* BL21 (DE3) ir *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS).



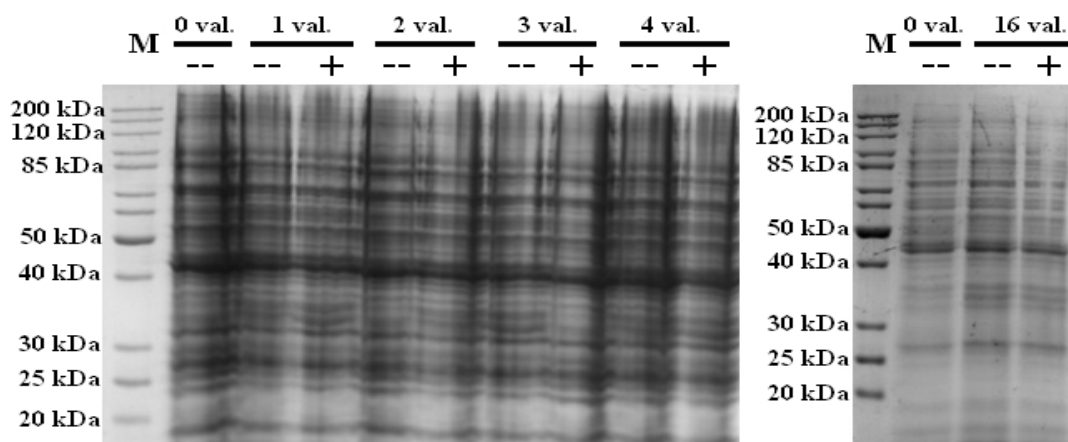
**3.29 pav.** Baltymų raiška pET-21c/BtKER (A) ir pET-28c/BtKER (B) vektoriuose. (A): M – PageRuler™ Unstained Protein Ladder; -- – neindukuotų ląstelių mėginys; + – ląstelės indukuotos naudojant 0,05 mM IPTG; ++ – ląstelės indukuotos 0,5 mM IPTG. (B): M – PageRuler™ Unstained Protein Ladder; Skaičiai (5-60) žymi laiką (min.) nuo indukcijos pradžios; Indukuota naudojant 0,5 mM IPTG. BtKER indukcija vykdoma 30 °C temperatūroje, maišant 180 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu.

Išanalizavus gautus rezultatus (3.29 pav.) galima teigti, kad mūsų tiriamas baltymas yra toksiškas *E. coli* BL21 (DE3) raiškos kamienui. Keičiant raiškos sąlygas (indukcijos pradžia, temperatūra, induktoriaus koncentracija) nepavyko pasiekti teigiamo rezultato. Visais atvejais vykdavo visų raiškos kamieno baltymų degradacija.

Siekiant sumažinti rekombinantinio baltymo toksiškumą, buvo nuspręsta raišką vykdyti *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS kamienne. Šis kamienas pasižymi griežta raiškos kontrole dėl bakteriofago T7 lizocimo, kuris jungiasi prie T7 RNR polimerazės ir slopina transkripcijos iniciaciją ir perėjimą iš iniciacijos į elongacijos etapą<sup>282-286</sup>. Toks mechanizmas sumažina bazinę rekombinantinio baltymo raišką *E. coli* ląstelėse. Atlikus *btker* geno raišką *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS kamienne, buvo gauti panašūs rezultatai, kaip ir su *E.*

*coli* BL21 (DE3) kamieniu. Bazinės raiškos eliminavimas neturėjo jokio teigiamo efekto mūsų tikslinio hipotetinio baltymo raiškai.

Išanalizavus visus rezultatus, nuspręsta pakeisti vektorių su T7 promotoriumi į kitą, silpnesnės raiškos, vektorių su  $P_{BAD}$  promotoriumi. Šiam tikslui pasirinktas pBAD30 vektorius, kuris turi griežtai valdomą, L-arabinoze indukuojamą,  $P_{BAD}$  promotorių iš *araBAD* (arabinozės) operono. Ši sistema taip pat yra pritaikyta toksiškų baltymų raiškai<sup>287-292</sup>. Gauti rezultatai iliustruoti 3.30 pav.



**3.30 pav.** Baltymų raiška pBAD30/BtKER. M – PageRuler™ Unstained Protein Ladder. -- – neindukuotų ląstelių mėginys; + – indukuotų ląstelių mėginys. Indukuota naudojant 0,2 % L-arabinozės. BtKER indukcija vykdoma 30 °C temperatūroje, maišant 180 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu.

Parinkus rekombinantinio BtKER baltymo raiškai silną, griežtai valdomą, arabinozės indukuojamą heterologinę sistemą, teigiamų rezultatų pasiekti nepavyko. Raiškos analizės metu nebuvo identifikuotas rekombinantinis tikslinis baltymas, kurio apskaičiuota molekulinė masė yra ~39 kDa. Lyginant pBAD30/BtKER raišką su raiška pET šeimos vektoriuose, nenustatyta *E. coli* BW25113 kamieno viduląstelių baltymų degradacija. Apibendrinant:

- BtKER baltymas yra toksiškas, todėl sintezės metu yra inicijuojama ląstelės viduląstelių baltymų degradacija arba pats tikslinis baltymas yra tiesiogiai susijęs su šių baltymų degradacija;

- Raiškos sistemos, kurios palaiko žemą baltymų sintezės greitį ar eliminuoja bazinę baltymų sintezę, yra neefektyvios BtKER baltymo raiškai;
- Reikalinga raiškos strategija, kuri leistų BtKER baltymą kaupti netirpių kūnelių pavidalu ląstelės citoplazmoje.

Tinkamos naujų ir biotechnologiškai svarbių fermentų fizikinės ir cheminės savybės, gamtinių žaliavų biodegradacijos efektyvumas ir pritaikomumas – svarbiausi šiems fermentams keliami reikalavimai. Šiame darbe dalinai ištirtos mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamos keratinolizinės peptidazės papildo biokatalizatorių, tinkamų pramoninėje biotechnologijoje, sąrašus.

### **3.3. Chimeriniai baltymai**

Genų inžinerijos ir baltymų inžinerijos metodų taikymas ir perspektyvos leidžia sukurti tokius fermentus, kurie natūraliai gamtoje neegzistuoja<sup>110, 293-295</sup>. Taikant šiuos metodus, tampa įmanoma pakeisti daugelį fermentų savybių: termostabilumą<sup>296, 297</sup>, katalizinį aktyvumą<sup>293, 298</sup>, substratinį savitumą<sup>296</sup>. Taip pat gali būti sukuriami bifunkciniai ar net daugiafunkciniai fermentai, kurie pasižymi dviem ir daugiau skirtingais aktyvumais<sup>5</sup>. Šie metodai atveria neribotas galimybes sukurti biotechnologiškai svarbius biokatalizatorius.

Šiame darbe buvo siekiama sukurti sintetines, keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčias peptidazes: SynKer-TT (sintetinė keratinazė, sudaryta iš dviejų GEOker baltymų) ir SynKer-TM (sintetinė keratinazė, sudaryta iš GEOker ir BtKER baltymų).

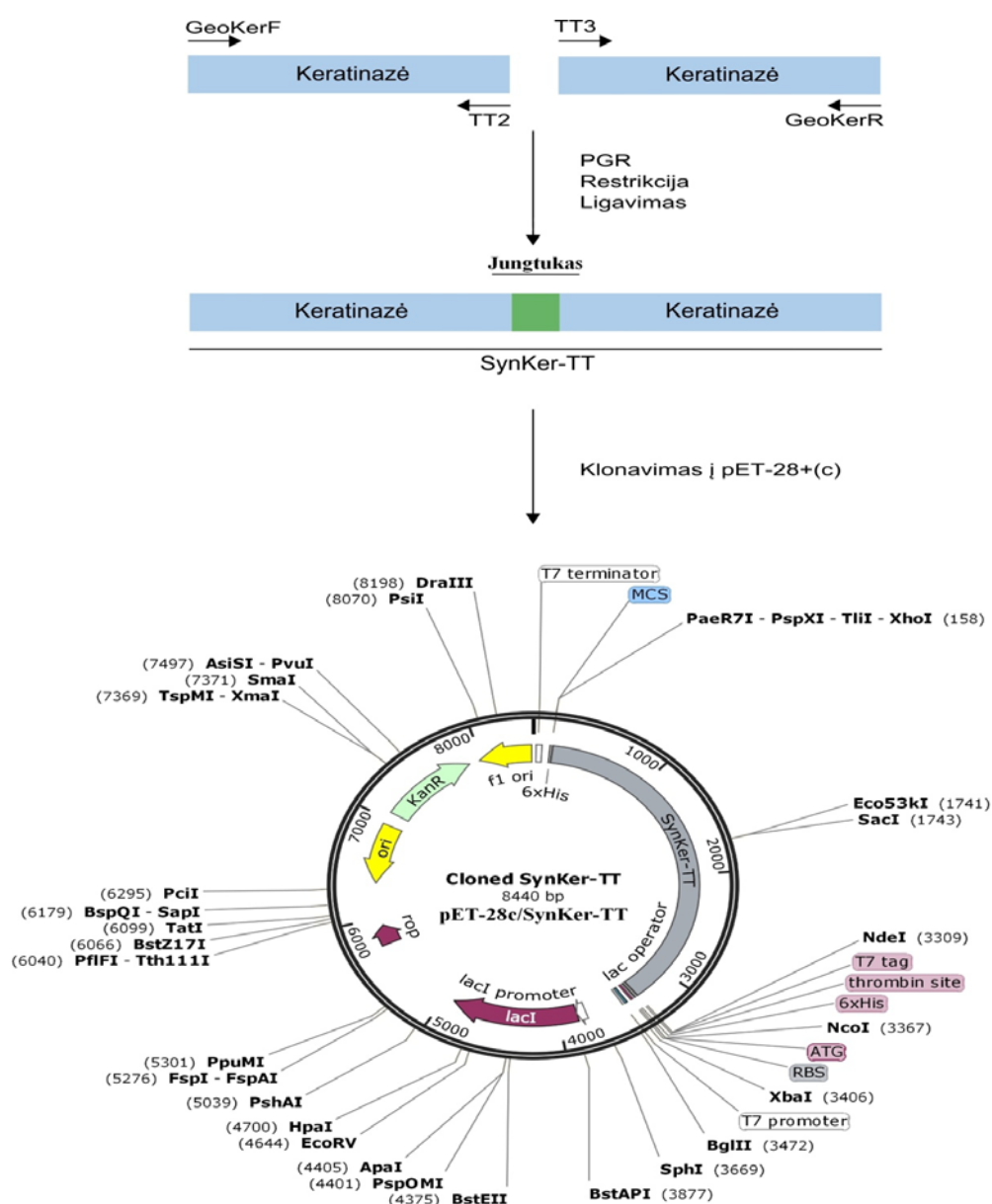
#### **3.3.1. Sintetinis homodimeras SynKer-TT**

##### **3.3.1.1. SynKer-TT klonavimas**

Sintetinės homodimerinės keratinolizinės peptidazės SynKer-TT klonavimas atliekamas pagal 3.1.6.2. skyrelyje aprašytą klonavimo strategiją.



Klonavimo darbams pasirinktas GEOker1 produktas (Pro-fermentas). Du funkcionalūs baltymai yra sujungiami pagal *end-to-end* genų suliejimo metodiką, naudojant jungtuką. Šis jungtukas SynKer-TT baltyme yra sudarytas iš ELGGS aminorūgščių sekos (EL – *SacI* restrikcijos endonukleazės atpažinimo vietos koduojamos aminorūgštys; GGS – dirbtinai pradmens sukurta seka). Pasirinktos jungtuko aminorūgštys paprastai sudaro lanksčią jungtį tarp jungiamų baltymų ir neturi didelės reikšmės baltymų funkcionalumui ir kitoms savybėms<sup>299</sup> (3.31 pav.).

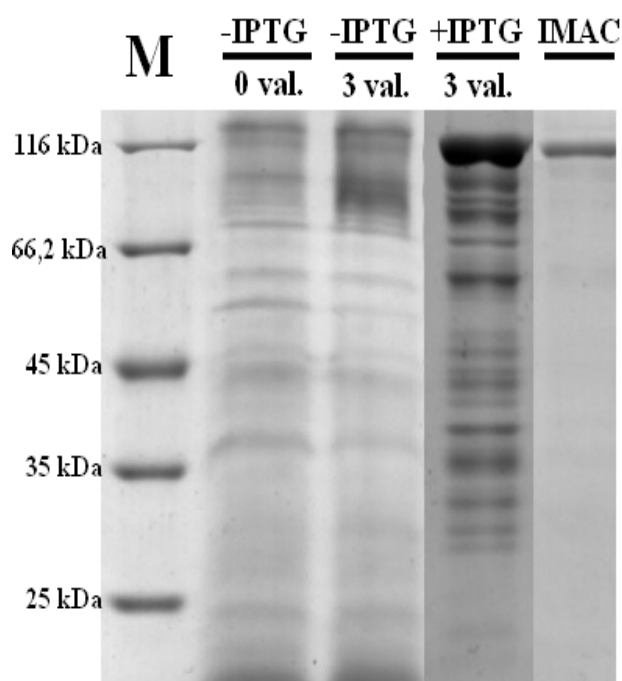


3.31 pav. SynKer-TT klonavimo strategija. Genolapis parengtas naudojant SnapGene programos paketą ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)).

Produktai, skirti klonavimo darbams, gauti naudojant dvi pradmenų poras: GeoKerF/TT2 ir TT3/GeoKerR. Pirmame klonavimo etape atliekamas abiejų gautų produktų suliejimas per *SacI* restrikcijos taikini, o antrame etape SynKer-TT produktas klonuojamas į pET-28c(+) raiškos vektorių, panaudojant *NdeI* ir *XhoI* restrikcijos taikinius. Gautam produktui suteiktas pET-28c/SynKer-TT pavadinimas.

### 3.3.1.2. SynKer-TT raiška ir gryninimas

SynKer-TT raiška ir raiškos optimizavimas atliekamas pagal 3.1.7.1. ir 3.1.7.2. skyreliuose aprašytas strategijas. Gauti rezultatai pateikti 3.32 pav.



**3.32 pav.** SynKer-TT raiška ir gryninimas. M – Pierce<sup>TM</sup> Unstained Protein MW Marker. -IPTG – neindukuotų ląstelių baltymų profilis. +IPTG – indukuotų ląstelių baltymų profilis. IMAC – baltymų profilis po gryninimo. Eliucija su 250 mM imidazolo.

Remiantis gautais rezultatais (3.32 pav.) galima teigti, kad indukcijos sąlygos (indukcijos pradžia 0,4 o. v., 0,5 mM IPTG, indukcijos temperatūra – 30 °C, indukcijos laikas – 3 val.) yra tinkamos rekombinantinio SynKer-TT baltymo sintezei. Praėjus 3 val. nuo indukcijos pradžios yra stebimas baltymų profilio atsiradimas ties maždaug 116 kDa baltymų dydžio standartu. Teoriškai

apskaičiuota molekulinė SynKer-TT masė yra 116994,69 Da, todėl galime teigti, kad identifikuotas baltymas yra SynKer-TT.

Rekombinantinis baltymas buvo kaupiamas ląstelių citoplazmoje netirpių kūnelių pavidalu. Kūnelių tirpinimas atliekamas 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 8) su 6 M karbamido. Gryninimas vykdomas pagal gamintojo rekomendacijas. Taikoma 3.1.7.1. skyrelyje aprašyta strategija.

**3.14 lentelė.** SynKer-TT gryninimo eiga.

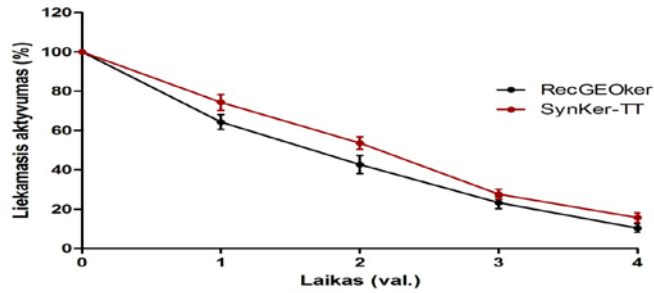
Gryninimo stadija	Bendras baltymo kiekis (mg)	Bendrasis aktyvumas (U)	Savitasis aktyvumas (U mg <sup>-1</sup> )	Išgryninimas	Išeiga (%)
Grubus ekstraktas	12,1±0,4	1047,3±70, 2	86,7±7,2	1	100
IMAC	1,9±0,3	414±33,1	223,8±27,2	2,58	39,5

Ni<sup>2+</sup> giminingumo chromatografija buvo sėkminga. Pasiektas 2,58 išgryninimo laipsnis ir gauta 39,5 % išeiga (3.14 lentelė). SynKer-TT baltymas yra aktyvus, tačiau lyginant jį su RecGEOker baltymo aktyvumu (1437,6±7,5 U mg<sup>-1</sup>), nustatytas 6,4 karto mažesnis savitasis fermentinis aktyvumas. Aktyvumo praradimas gali būti susijęs su sudėtinga šio homodimero erdvine struktūra. Yra tikėtina, kad arti vienas kito esantys baltymų domenai gali trukdyti efektyviai sąveikai tarp fermento ir substrato. Šią problemą galėtų išspręsti ilgesnio jungtuko panaudojimas arba lankstaus jungtuko pakeitimas nelanksčiu.

### 3.3.1.3. SynKer-TT savybės

#### **Temperatūrinis SynKer-TT stabilumas:**

Taikant baltymų inžineriją yra siekiama gauti geresnėmis savybėmis pasižyminčius sintetinius fermentus. Temperatūrinis stabilumas – viena svarbiausių fermentų savybių. Tikėtina, kad dėl trumpo jungtuko, sintetinio homodimero domenai yra arti vienas kito ir tai gali padėti išlaikyti nepakitusią erdvinę struktūrą esant aukštai temperatūrai. Gauti rezultatai pateikti 3.33 pav.

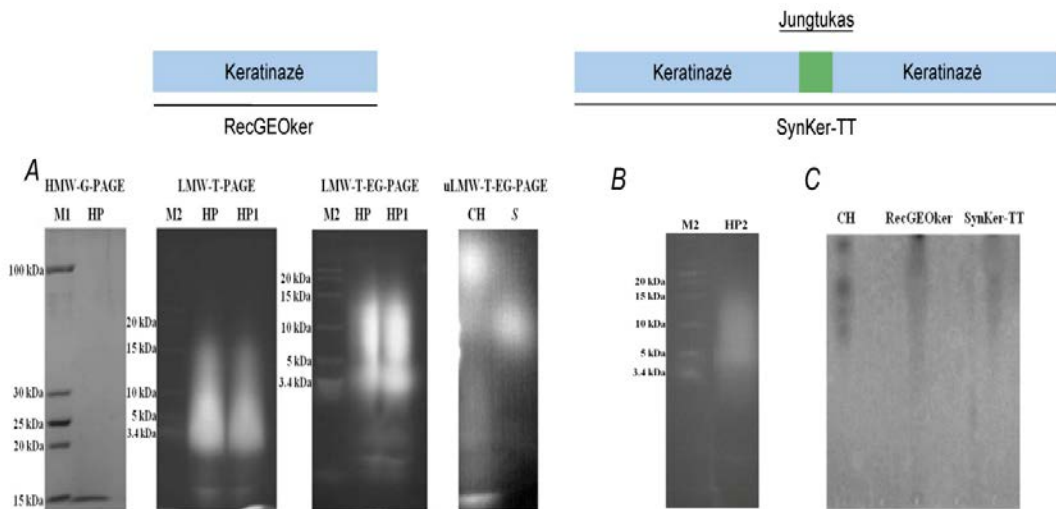


**3.33 pav.** Temperatūros įtakos baltymo stabilumui palyginimas tarp RecGEOker ir SynKer-TT. Fermentai inkubuojami 80 °C temperatūroje.

Rezultatai patvirtina hipotezę dėl temperatūrinio stabilumo. RecGEOker ir SynKer-TT buvo inkubuojami 80 °C temperatūroje 4 val. Nustatyta, kad homodimerinė SynKer-TT struktūra yra iki 11 % stabilesnė tiroje temperatūroje.

#### Keratinės hidrolizės potencialas:

Dėl homodimerinės SynKer-TT struktūros gali pasikeisti substrato prieinamumas. Šis pokytis nulėmė skirtingos kokybės, mažos molekulinės masės peptidų gamybą. Rezultatai pateikti 3.34 pav.



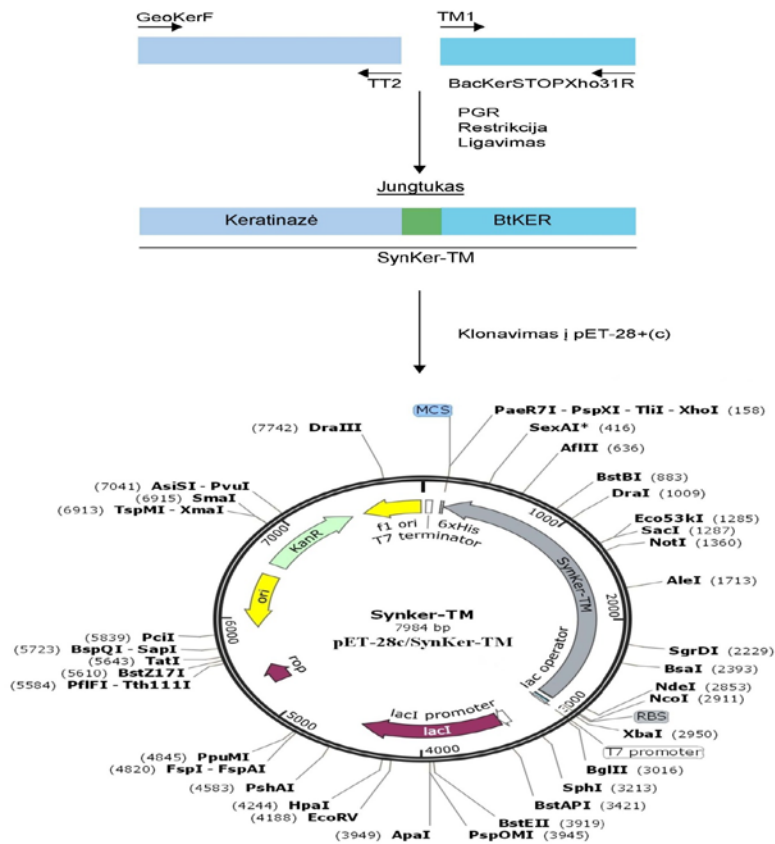
**3.34 pav.** RecGEOker (A (PAGE)) ir SynKer-TT (B (PAGE) ir C (TLC)) hidrolizės produktų analizė. M1 – PageRuler™ Unstained Protein Ladder. M2 – PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder. HMW-G-PAGE – glicininė elektroforezė. LMW-T-PAGE – tricininė elektroforezė. LMW-T-EG-PAGE – tricininė elektroforezė su etilenglikoliu. uLMW-T-EG-PAGE – tricininė elektroforezė su etilenglikoliu. HP/HP1 – hidrolizės produktai, gauti naudojant RecGEOker, o HP2 – naudojant SynKer-TT. CH – komerciniai hidrolizės produktai, gauti cheminės degradacijos metu. S – ypač mažos molekulinės masės peptidai.

Hidrolizės produktų analizė (3.34 pav.) parodė, kad SynKer-TT homodimeras hidrolizuoja vilnos keratiną iki tinkamos kokybės produktų. Peptidai, gauti naudojant SynKer-TT fermentą, atitinka hidrolizės produktus, gautus naudojant RecGEOker. Apibendrinant: pritaikius genų ir baltymų inžinerijos metodus, pavyko sukurti ir gauti funkcionalų homodimerinį fermentą su geresnėmis pritaikymo galimybėmis.

### 3.3.2. Sintetinis heterodimeras SynKer-TM

#### 3.3.2.1. SynKer-TM klonavimas

Sintetinis heterodimeras SynKer-TM klonuojamas pagal 3.3.1.1. skyrelyje aprašytą metodiką. Klonavimo darbams pasirinktas GEOker1 produktas ir BtKER (be signalinės sekos). Šie du baltymo domenai sujungiami naudojant lankstų ELGGS jungtuką. Klonavimo strategija pateikta 3.35 pav.



3.35 pav. SynKer-TM klonavimo strategija. Genolapis parengtas naudojant SnapGene programos paketą ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)).

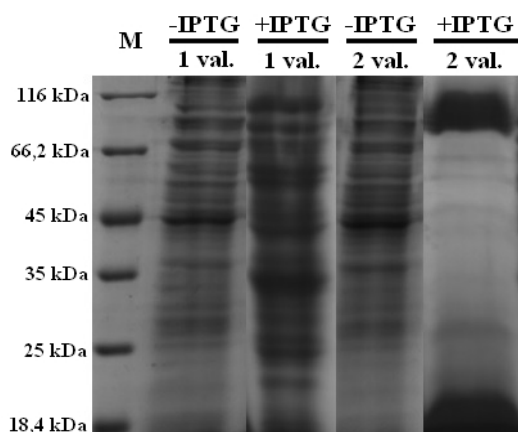
Produktai, skirti SynKer-TM klonavimui, gauti naudojant dvi pradmenų poras: GeoKerF/TT1 ir TM1/BacKerSTOPXho31R. Gautam produktui suteiktas pET-28c/SynKer-TM pavadinimas.

Sintetinio heterodimero kūrimui strategiškai parinkti *geoker* ir *btker* genai, koduojantys fiziologiškai skirtingus baltymus. Literatūroje aprašytos metodikos dažniausiai rekomenduoja rinktis panašius ar identiškus baltymus<sup>5</sup>, nes tokių baltymų funkciniam aktyvumui nėra sudėtinga parinkti tinkamą aplinką. Šiame darbe SynKer-TM baltymo kūrimas pasirinktas dėl kelių priežasčių:

- Siekiant padidinti rekombinantinio baltymo tirpumą: RecGEOker baltymas yra netirpus ir kaupiamas ląstelės citoplazmoje netirpių kūnelių pavidalu. Tikimasi, kad šį baltymą suliejus su BtKER baltymu, bus padidintas RecGEOker baltymo tirpumas;
- Siekiant sumažinti BtKER baltymo tirpumą arba gauti aktyvią šio baltymo formą: manoma, kad BtKER baltymas degraduoja visus ląstelės baltymus dėl savo aktyvumo arba inicijuodamas ląstelės lizės procesus. Tikimasi, kad suliejus BtKER baltymą su RecGEOker, pavyks gauti netirpius kūnelius – neaktyvią BtKER baltymo formą ląstelės citoplazmoje.

### **3.3.2.2. SynKer-TM raiška**

SynKer-TM raiška vykdoma pagal gamintojo rekomendacijas. Raiškos optimizavimas atliekamas pagal 3.1.7.1. ir 3.1.7.2. skyreliuose aprašytas strategijas. Gauti rezultatai pateikti 3.36 pav.



**3.36 pav.** SynKer-TM raiška. M – Pierce™ Unstained Protein MW Marker. -IPTG – neindukuotų ląstelių baltymų profilis. +IPTG – indukuotų ląstelių baltymų profilis.

Raiškos sąlygos parinktos pagal anksčiau atliktus eksperimentus (indukcijos pradžia 0,4 o. v., 0,5 mM IPTG, indukcijos temperatūra – 30 °C, indukcijos laikas 2 val.). Po pirmos indukcijos valandos matomas visų ląstelės baltymų profilio pasikeitimas. Teoriškai apskaičiuota SynKer-TM molekulinė masė yra 99169,51 Da. 3.36 pav. ties maždaug 100 kDa baltymų dydžio žymeniu identifikuojamas naujas baltymo profilis. Po antros indukcijos valandos daugelis ląstelės baltymų yra degraduojami: atsiranda daug mažos molekulinės masės baltymų. Taip pat yra išlikęs ~100 kDa dydžio baltymas, kuris teoriškai gali būti SynKer-TM. Šio baltymo identifikavimui reikalingi funkcinio aktyvumo testai.

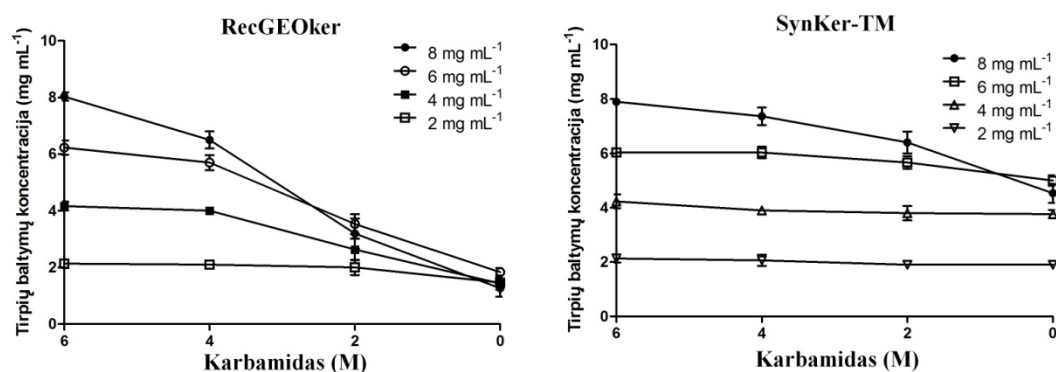
### 3.3.2.3. SynKer-TM savybės

Vykiant *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno peptidazės (RecGEOker) ir *Bacillus* sp. AD-12 kamieno peptidazės (BtKER) suliejimą, tikimasi padidinti rekombinantinio baltymo RecGEOker tirpumą ląstelės citoplazmoje.

#### **SynKer-TM baltymo tirpumas:**

Vykiant SynKer-TM raišką, buvo nustatyta, kad rekombinantinis baltymas yra kaupiamas netirpių kūnelių pavidalu ląstelės citoplazmoje. Baltyminių kūnelių tirpinimas atliekamas pagal 2.2.26.1. metodiką. Siekiant išsiaiškinti baltyminio komplekso SynKer-TM tirpumą, buvo atliekamas

pakopinis karbamido šalinimas, panaudojant 4-ių buferinių tirpalų sistemų (I – 50 mM Tris-HCl, 6 M karbamidas, pH 8; II – 50 mM Tris-HCl, 4 M karbamidas, pH 8; III – 50 mM Tris-HCl, 2 M karbamidas, pH 8; IV – 50 mM Tris-HCl, pH 8). Rezultatai pateikti 3.37 pav.



**3.37 pav.** Tirpių rekombinantinių RecGEOker ir SynKer-TM baltymų tirpumas.

Netirpūs baltyminiai kūneliai yra vienas iš didžiausių heterologinės genų raiškos *E. coli* ląstelėse trūkumų<sup>300</sup>. Iš 3.37 pav. pateiktų kreivių buvo nustatyta, kad sujungus RecGEOker su BtKER baltymus pasiektas 2,78 karto didesnis baltymo tirpumas (IV – 50 mM Tris-HCl, pH 8).

#### SynKer-TM funkcinis aktyvumas:

SynKer-TM – stabilus heterodimerinis fermentas. Buvo siekiama išsiaiškinti, ar šis dimeras turi RecGEOker ir BtKER fermentų aktyvumus. Jau anksčiau nustatyta, kad RecGEOker yra metalo peptidazė, o hipotetinis BtKER baltymas – serino peptidazė. Baltymai fermentinio aktyvumo nustatymui paruošti pagal 2.2.26.1. metodiką. Siekiant įvertinti liakamąjį fermentinį aktyvumą, chimerinis baltymas SynKer-TM inkubuojamas su skirtingais slopikliais. Rezultatai pateikti 3.15 lentelėje.

**3.15 lentelė.** Slopiklių poveikis SynKer-TM fermentui.

Slopiklis	-	Fenantrolinas	Pefabloc <sup>®</sup> SC	Fenantrolinas ir Pefabloc <sup>®</sup> SC
Liekamasis aktyvumas (U)	30 °C	17±2	0	9,33±2,5
	60 °C	128±9,8	19±5,6	119±5,3
				15,3±1,2



Įvertinus fermentinį aktyvumą nustatyta, kad SynKer-TM buvo slopinamas aplinkoje esant tik fenantrolino. Pefabloc® SC ryškaus slopinančio poveikio neturėjo. Galima daryti išvadą, kad SynKer-TM konstrukte veikia tik RecGEOker fermentas. Apibendrinant:

- Nepavyko nustatyti hipotetinio BtKER baltymo aktyvumo;
- Pavyko padidinti RecGEOker fermento tirpumą 2,78 karto (iki 5 mg mL<sup>-1</sup>) (lyginant RecGEOker su SynKer-TM);
- Pavyko sumažinti BtKER baltymo tirpumą jį suliejus su RecGEOker. Patvirtinta hipotezė, kad BtKER suliejus su citoplazmoje netirpiu RecGEOker, gaunamas nedidelis kiekis heterodimerinio baltymo. Šiuo metu galima sakyti, kad *E. coli* ląstelės baltymų hidrolizė vyksta ne dėl BtKER tiesioginio poveikio (fermentinio aktyvumo), o dėl nežinomų viduląstelinių mechanizmų, kurie inicijuoja ląstelės lizę.

### **3.4. Keratino hidrolizės proceso sukūrimas**

Keratinolizinių peptidazių pritaikymas ir hidrolizės potencialo panaudojimas yra vieni svarbiausių uždavinių. Yra tikslinga neefektyvius mechaninius ir cheminius keratino perdirbimo procesus pakeisti į efektyvius ir aplinkai saugius biologinius perdirbimo procesus. Šiame darbe identifikuoti trys keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys mikroorganizmai – *Bacillus* sp. AD-12, *Bacillus* sp. AD-W ir *Bacillus* sp. AD-AA3. Siekiama sukurti hidrolizės procesą, kuriame sinergistinis naudojamų fermentų poveikis būtų maksimaliai išnaudojamas mažos molekulinės masės produktų gamybai.

#### **3.4.1. Fermentų savihidrolizės nustatymas**

Keratinolizinės peptidazės BtKER, PBKer ir BAKer efektyviai hidrolizuoja tiek tirpius, tiek netirpius substratus. Substratinio savitumo nustatyme buvo naudojami įvairūs substratai, tačiau reikia pastebėti, kad BtKER fermentas gali būti atpažintas BPKer ar BAKer kaip substratas ir dalinai ar visiškai hidrolizuotas. Panašus efektas gali būti nustatytas su visomis

naudojamomis peptidazėmis. Kitas svarbus aspektas – sekretominių baltymų hidrolizė. Pavyzdžiui, BtKER fermentas gali atpažinti ir hidrolizuoti ne tik BPKer ar BAKer, o ir baltymus, esančius sekretome. Įvykus tokiai netikslingai hidrolizei bus gautas skirtingos kilmės peptidų mišinys. Netikslingos hidrolizės rezultatai pateikti 3.16 lentelėje.

**3.16 lentelė.** Netikslingos hidrolizės įvertinimas.

Fermentas/ Fermentų rinkinys	BtKER	BPKer	BAKER	BtKER/ BPKer	BtKER/ BAKER	BPKer/ BAKER	BtKER/ BPKer/ BAKER
Aktyvumas (U)	22,7±6	9,3±3,8	0	24±3,6	18,3±6	15±6	32±9,5

Rezultatai pateikti po 4 val. inkubacijos Tris-HCl (pH 7,8), 35 °C temperatūroje, maišant 700 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu. Netikslinga hidrolizė yra išreikšta aktyvumo vienetais (U), kurie apskaičiuojami pagal standartinės fermentinės reakcijos metodiką (2.2.19.).

Įvertinus visų fermentų ir fermentų rinkinių netikslingą hidrolizę (3.16 lentelė) nustatyta, kad daugeliu atveju (išskyrus BAKER) vyksta silpna savihidrolizė ar sekretome esančių baltymų hidrolizė. Ribojant tikslingos hidrolizės laiką, galima iki minimumo sumažinti priemaišinių peptidų kiekį, tačiau visiškai jų išvengti galima tik naudojant BAKER fermentą. Mūsų tikslas yra fermentų komplekso panaudojimas tikslingai hidrolizei, todėl tolimesni eksperimentai atliekami su visomis galimomis fermentų kombinacijomis.

### 3.4.2. Fermentų sinergistinio poveikio įvertinimas

Fermentų komplekso panaudojimas, hidrolizuojant tikslinį substratą, gali turėti ir teigiamą, ir neigiamą efektą. Jei vienas iš fermentų dalinai hidrolizuoja kitą fermentą – galimas neigiamas sinergistinis poveikis, jei kelių fermentų veikimas yra nukreiptas tik į tikslinį substratą – teigiamas sinergistinis poveikis. Rezultatai pateikti 3.17 lentelėje.

### 3.17 lentelė. Sinergistinio poveikio įvertinimas.

Fermentas/ Fermentų rinkinys	BtKER	BPKer	BAKER	BtKER/ BPKer	BtKER/ BAKER	BPKer/ BAKER	BtKER/ BPKer/ BAKER
Aktyvumas (U)	298± 19,2	194,7± 10,5	523,3± 25,4	178,3± 15,9	427,3± 16,3	649,7± 17,6	700,3± 9,1

Rezultatai pateikti po 6 val. inkubacijos Tris-HCl (pH 7,8), 35 °C temperatūroje, maišant 700 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu, naudojant 5 mg mL<sup>-1</sup> vilnos keratino.

Didžiausias aktyvumas, tiriant sinergistinį fermentų poveikį (3.17 lentelė) nustatytas naudojant BPKer/BAKER (649,7±17,6) ir BtKER/BPKer/BAKER (700,3±9,1) fermentų rinkinius, tačiau maksimalus suminis atskirtų fermentų aktyvumas nebuvo pasiektas. Tolimesniems tyrimams pasirinkti trys efektyviausią hidrolizę vykdantys kompleksai:

- BAKER – suteiktas pavadinimas EnzI<sup>HydLys</sup>;
- BPKer/BAKER – suteiktas pavadinimas EnzII<sup>HydLys</sup>;
- BtKER/BPKer/BAKER – suteiktas pavadinimas EnzIII<sup>HydLys</sup>.

### 3.4.3. Hidrolizės proceso temperatūros nustatymas

BPKer ir BAKER keratinolizinių peptidazių fermentinis aktyvumas geriausiai išreikštas esant aukštesnei temperatūrai – 50 °C. Ši temperatūra nėra optimali mūsų kuriamam hidrolizės procesui. Siekiama sukurti efektyviai kambario ar aukštesnėje temperatūroje veikiančią sistemą. Temperatūrinio aktyvumo rezultatai pateikti 3.18 lentelėje.

### 3.18 lentelė. Hidrolizės temperatūros nustatymas.

Kompleksas		EnzI <sup>HydLys</sup>	EnzII <sup>HydLys</sup>	EnzIII <sup>HydLys</sup>
Aktyvumas (U)	25 °C	174,3±7,1	178±7	205,7±9,5
	30 °C	288±19,7	329,7±13,1	439,7±22,5
	40 °C	497,7±29,3	538,7±23,2	561±46,5

Rezultatai pateikti po 3 val. inkubacijos Tris-HCl (pH 7,8), maišant 700 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu, naudojant 5 mg mL<sup>-1</sup> vilnos keratino.

Siekiant nustatyti tinkamą keratino hidrolizės proceso temperatūrą, vilnos keratinas buvo veikiamas anksčiau atrinktais fermentų kompleksais (EnzI<sup>HydLys</sup>, EnzII<sup>HydLys</sup>, EnzIII<sup>HydLys</sup>). Gauti rezultatai patvirtina hipotezę, kad

aukštesnėje temperatūroje hidrolizės procesas yra efektyvesnis. Didžiausias efektyvumas gautas 40 °C temperatūroje, hidrolizei naudojant EnzII<sup>HydLys</sup> ir EnzIII<sup>HydLys</sup> (3.18 lentelė). Apibendrinant:

- Kuo aukštesnėje temperatūroje yra vykdomas keratino hidrolizės procesas, tuo trumpesnis laikas reikalingas visiškai ar daliai substrato degradacijai. Atvirkštinė priklausomybė tarp temperatūros ir hidrolizės laiko;
- Kuo žemesnė temperatūra, tuo ekonomiškai naudingesnis (pigusnis) hidrolizės procesas. Tiesioginė priklausomybė tarp temperatūros ir resursų.

#### 3.4.4. Hidrolizės proceso pH nustatymas

Dėl naudojamų fermentų pH veikimo optimumų skirtumų yra būtina įvertinti ir nustatyti tinkamą pH mūsų kompleksų pritaikymui. Gauti rezultatai pateikti 3.19 lentelėje.

**3.19 lentelė.** Hidrolizės pH nustatymas.

Kompleksas		EnzI <sup>HydLys</sup>	EnzII <sup>HydLys</sup>	EnzIII <sup>HydLys</sup>
Aktyvumas (U)	<i>pH 7</i>	349±8,5	337,3±6,4	353,3±11,1
	<i>pH 8</i>	416,7±14	462,7±9,5	424±16,4
	<i>pH 9</i>	397,3±16,9	482,3±11,7	468±13,1

Rezultatai pateikti po 3 val. inkubacijos 35 °C temperatūroje, maišant 700 aps. min.<sup>-1</sup> greičiu, naudojant 5 mg mL<sup>-1</sup> vilnos keratino.

Geriausi rezultatai gauti vilnos keratino hidrolizę vykdamant pH 9 buferiniame tirpale, naudojant EnzII<sup>HydLys</sup> (3.19 lentelė). Panašūs rezultatai gauti naudojant EnzIII<sup>HydLys</sup> (pH 9) ir EnzII<sup>HydLys</sup> (pH 8). Esant tokiems nereikšmingiems aktyvumo pokyčiams, galima naudoti tiek pH 8, tiek pH 9 buferines sistemas. Rekomendacija: keratino hidrolizės procesui naudoti EnzI<sup>HydLys</sup> (pH 9) arba EnzII<sup>HydLys</sup> (pH 8). Siūloma nenaudoti EnzIII<sup>HydLys</sup> komplekso, nes jo paruošimui reikalingi 3 mikroorganizmų sekretomai, kurių gavimui panaudojami didesni resursai.

Dalinai optimizuotos baltyminės kilmės substratų hidrolizės sąlygos (EnzII<sup>HydLys</sup> kompleksas, 30-35 °C temperatūra, pH 8, 3 inkubavimo val., 5-10 mg mL<sup>-1</sup> vilnos keratino) leido sukurti laboratorinio lygio keratino biodegradacijos sistemą. Siekiant pritaikyti šį procesą pramoninei peptidų gamybai, reikalingos didesnių tūrių sistemos ir išsamesni eksperimentiniai tyrimai. Keičiantis tūriui yra būtina užtikrinti tinkamą temperatūros ir substrato pasiskirstymą visoje sistemoje. Šiam tikslui įgyvendinti yra reikalingi moksliniai ir verslo partneriai iš pramonine biotechnologija užsiimančių sričių.

## 4. APIBENDRINIMAS

Literatūroje keratinolizinės peptidazės ar kitaip vadinamos keratinazės, yra priskiriamos hidrolazinių fermentų klasei ir išsiskiria iš kitų tokio tipo fermentų savo savitu gebėjimu skelti fibrilinius baltymus tarpusavyje laikančias peptidines jungtis<sup>43-45</sup>. Šie fermentai gali veikti ir kaip atskiri biologiniai vienetai, ir kaip sudėtinio fermentų komplekso dalis. Sudėtinga yra priskirti tam tikrus fermentus tiesiogiai keratinazėms todėl, kad daugelis fermentų nėra tikrosios keratinazės: jos geba hidrolizuoti tik baltyminių substratą, kuris dalinai yra praradęs savo natyvią struktūrą. Tikrosios keratinazės geba veikti be kitų fermentų pagalbos ir tiesiogiai veikia į natyvų baltymą<sup>108, 145, 154</sup>.

Šiame darbe buvo siekiama identifikuoti, charakterizuoti ir pritaikyti skirtingų mikroorganizmų – termofilinių ir mezofilinių – sekretuojamas keratinolizines peptidazes. Mokslinių straipsnių duomenų bazėse nuolat atsiranda naujos informacijos apie iki šiol neaprašytas keratinolizines peptidazes ir jų pritaikymo galimybes.

Nustatyta, kad pirmasis mūsų identifikuotas mikroorganizmas yra priskiriamas termofilinių mikroorganizmų *Geobacillus* genčiai. Išsamesnė analizė leido sąlyginai AD-11 izoliatą priskirti *G. stearothermophilus* rūšiai. Keratinolizinė peptidazė, sekretuojama *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno buvo pavadinta GEOker. Sėkminga buvo ir šios keratinolizinės peptidazės produkcinės terpės paieška. Sukurta ir pritaikyta minimali sintetinė terpė, kurioje vienintelis anglies, azoto, sieros ir energijos šaltinis yra vilnos keratinas. Mikroorganizmui esant tokioje aplinkoje yra maksimaliai sintetinamas ir sekretuojamas į aplinką fermentas, galintis vykdyti efektyvią šio vienintelio substrato hidrolizę iki mažos molekulinės masės junginių, kurie jau gali būti panaudojami ląstelės metabolizmui.

Gavus masių spektrometrijos rezultatus buvo galutinai įsitikinta, kad *Geobacillus* sp. AD-11 kamienas sekretuoja GEOker keratinolizinę peptidazę. Detali gautų peptidų sekų analizė duomenų bazėse leido identifikuoti hipotetinį

GEOker baltymą. Nustatyta, kad šis baltymas yra sintetinamas kaip Pre-Pro-fermentas, kuris galutinai įgyja savo funkciškai aktyvią konformaciją tik po sėkmingos sekrecijos į užląstelinę aplinką ir po autokatalizės, kurią vykdo paties fermento N-galinis domenas (Pro-peptidas). GEOker baltymas savo aminorūgščių seka yra panašiausias į baciloliziną (*G. stearothermophilus* ir *G. thermocatenulatus*), termoliziną (*thermolysin-like*), termostabilią neutralią proteinazę (*B. caldolyticus*) ir šarminę metaloproteazę (*B. subtilis*).

Įvykdžius *geoker* geno klonavimo ir raiškos eksperimentus nustatyta, kad aktyvią šio baltymo formą įmanoma gauti tik klonavus GEOker baltymą kartu su jo Pro-seka (GEOker1). Tikėtina, kad Pro-seka nulemia baltymo hidrofobiškumą ir netirpių baltyminių kūnelių susiformavimą rekombinantinių *E. coli* BL21 (DE3) ląstelių citoplazmoje. Dažnu atveju netirpūs baltyminiai kūneliai yra didžiulė problema vykdant heterologinę ar homologinę genų raišką. Mūsų tirtu atveju, šių kūnelių susidarymas nulėmė funkciškai aktyvaus rekombinantinio baltymo RecGEOker gavimą. Taip pat pademonstruota, kad neįvykus autokatalizei – baltymas yra aktyvus.

Fizikinių ir cheminių savybių įvertinimas ir gauti rezultatai papildė literatūros duomenis apie termofilinių mikroorganizmų sekretuojamas keratinolizines peptidazes. Nustatytos optimalios savybės (temperatūra, pH), įvairių cheminių junginių poveikis (metalų jonai, detergentai, organiniai tirpikliai, slopikliai) ir gebėjimas hidrolizuoti įvairius baltyminius substratus. Pademonstruota, kad RecGEOker yra efektyvus ir tinkamas biokatalizatorius mažos molekulinės masės peptidų gamybai.

Identifikuotos ir detalai išanalizuotos 3 mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamos keratinolizinės peptidazės. Nustatyta, kad visi 3 izoliatai – AD-12, AD-W ir AD-AA3 – priklauso *Bacillus* genties bakterijoms. Detalesnė analizė leido AD-12 izoliatą priskirti *B. thuringiensis*, AD-W – *B. altitudinis* ar *B. stratosphericus*, o AD-AA3 – *B. amyloliquefaciens* rūšims. Pasinaudojus *Geobacillus* sp. AD-11 kamieno augimo terpės sudėtimi, buvo modifikuotos ir pritaikytos sintetinės terpės mezofilinių mikroorganizmų sekretuojamų keratinolizinių peptidazių sekrecijai. Pritaikius tą pačią produkavimo strategiją,

buvo sėkmingai gauti fermentai, kurie pavadinti BtKER (*Bacillus* sp. AD-12), BPKer (*Bacillus* sp. AD-W) ir BAKer (*Bacillus* sp. AD-AA3).

Atlikus BtKER baltymo gryninimą, gautas apie 39 kDa dydžio baltymas, kurio funkcinis aktyvumas patvirtintas zimografijos metodu. Siekiant sukurti optimalų biologinės degradacijos procesą, nuspręsta BPKer ir BAKer negryninti, o eksperimentams ir pritaikymui naudoti šias keratinolizines peptidazes sintetinančių mikroorganizmų sekretominius baltymus – sekretomą. Detali fizikinių ir cheminių savybių analizė leido išskirti įvairias fermentų pritaikymo galimybes. Iki šiol literatūroje nebuvo skelbiama informacijos apie *B. thuringiensis* sekretuojamas keratinolizines peptidazes, todėl mūsų gauti rezultatai apie BtKER fermentą yra svarbus indėlis, papildantis informaciją apie šių fermentų įvairovę.

Svarbiausia visų mūsų tirtų mezofilinių mikroorganizmų savybė – gebėjimas hidrolizuoti įvairius baltyminius substratus. Keratinolizinės peptidazės dažniausiai priskiriamos fermentams, kurie efektyviai hidrolizuoja netirpų keratiną, tačiau šie fermentai taip pat efektyviai gali hidrolizuoti ir į keratiną panašius baltyminius substratus - kolageną ar kitus baltymus – želatiną, jaučio serumo albuminą, natrio kazeinatą. Siekiant gauti mažos molekulinės masės peptidus ar biologiškai aktyvius peptidus gali būti panaudojamos įvairios kilmės biologinės žaliavos ir atliekos, todėl fermentų substratinis savitumas yra svarbus faktorius renkantis tinkamus biokatalizatorius.

Remiantis aminorūgščių ir nukleotidų sekų palyginimais buvo identifikuotas galimai BtKER baltymą koduojantis genas. Sėkmingi šio geno klonavimo darbai ir aminorūgščių analizė leido identifikuoti konservatyvią SHD katalizinę triadą, kuri yra būdinga serino proteazėms. BtKER baltymas savo aminorūgščių seka yra panašiausias į šarminę serino proteazę (*B. cereus* ir *B. thuringiensis*), termitazę (*B. cereus*) ir subtilazę (*Bacillus* sp. GeD10). BtKER geno raiškai buvo panaudotos įvairios heterologinės raiškos sistemos (*E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, *E. coli* BW25113) ir raiškos vektoriai (pET-21c(+), pET-28c(+), pBAD30), tačiau tikslinis



rekombinantinis baltymas nebuvo gautas. Yra manoma, kad BtKER baltymas yra toksiškas, todėl sintezės metu yra inicijuojama ląstelės viduląstelių baltymų degradacija. Raiškos sistemos, kurios palaiko žemą baltymų sintezės greitį ar eliminuoja bazinę baltymų sintezę, yra netinkamos BtKER baltymo raiškai.

Genų inžinerijos ir baltymų inžinerijos metodų taikymas ir perspektyvos leidžia sukurti tokius fermentus, kurie natūraliai gamtoje neegzistuoja<sup>110, 293-295</sup>. Taikant šiuos metodus, tampa įmanoma pakeisti daugelį fermentų savybių: termostabilumą<sup>296, 297</sup>, katalizinį aktyvumą<sup>293, 298</sup> ar substratinį savitumą<sup>296</sup>. Taip pat gali būti sukuriama bifunkciniai ar net daugiafunkciniai fermentai, kurie pasižymi dviem ir daugiau skirtingais aktyvumais<sup>5</sup>.

Šiame darbe buvo sukurti du chimeriniai baltymai: homodimerinis SynKer-TT (sintetinė keratinazė, sudaryta iš dviejų GEOker baltymų) ir heterodimerinis SynKer-TM (sintetinė keratinazė, sudaryta iš GEOker ir BtKER baltymų). Homodimerinis SynKer-TT baltymas pasižymėjo iki 11 % didesniu temperatūriniu stabilumu 80 °C temperatūroje, lyginant su monomeriniu RecGEOker baltymu. Suliejus RecGEOker baltymą su BtKER (SynKer-TM) pavyko padidinti RecGEOker baltymo tirpumą 2,78 karto (iki 5 mg mL<sup>-1</sup>). Taip pat pavyko sumažinti BtKER baltymo tirpumą, tačiau nustatyti šio baltymo funkcionalumo nepavyko. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad baltymų inžinerija yra galingas molekulinis įrankis, leidžiantis sukurti patobulintus biokatalizatorius. Literatūroje yra mažai duomenų apie keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčius chimerinius baltymus, todėl mūsų gauti rezultatai yra svarbūs moksliniu aspektu.

Keratinolizinių peptidazių pritaikymas ir hidrolizės potencialo panaudojimas yra vienas svarbiausių šios disertacijos uždavinių. Yra tikslinga neefektyvius mechaninius ir cheminius keratino atliekų (žaliavų) perdirbimo procesus pakeisti į efektyvius ir aplinkai saugius biologinius perdirbimo procesus. Buvo siekiama sukurti hidrolizės procesą, kuriame sinergistinis identifikuotų keratinolizinių peptidazių poveikis būtų maksimaliai išnaudojamas mažos molekulinės masės peptidų gamybai. Eksperimentiškai

nustatytos baltyminės kilmės substrato (vilnos keratino) hidrolizės sąlygos (EnzII<sup>HydLys</sup> fermentų kompleksas, 30-35 °C temperatūra, pH 8 buferinė sistema, 3 inkubavimo valandos, 5-10 mg mL<sup>-1</sup> vilnos keratino) leido sukurti laboratorinio lygio keratino biodegradacijos sistemą. Mūsų sukurta aplinkai draugiška biokonversijos sistema yra tinkama peptidų gamybai, kurie gali būti panaudojami įvairiose biotechnologijos srityse.

## IŠVADOS

- 1) Nustatytos ir įvertintos visų tirtų (*Geobacillus* sp. AD-11, *Bacillus* sp. AD-12, *Bacillus* sp. AD-W ir *Bacillus* sp. AD-AA3) keratinolizinių peptidazių funkcinio aktyvumo priklausomybė nuo įvairių veiksnių: temperatūros, pH, detergentų, organinių tirpiklių, metalų jonų ir slopiklių;
- 2) Šiame darbe aprašytos keratinolizinės peptidazės geba efektyviai hidrolizuoti tirpius ir netirpius substratus iki pridėtinės vertės mažos molekulinės masės produktų;
- 3) Chimerinių (sulietų) keratinolizinių biokatalizatorių SynKer-TT ir SynKer-TM kūrimo strategija leido pagerinti rekombinantinių baltymų temperatūrinio stabilumo ir tirpumo savybes;
- 4) Sukurtos ir optimizuotos laboratorinio lygio (mažo tūrio) biologinės keratino degradacijos sistemos (EnzII<sup>HydLys</sup> ir EnzIII<sup>HydLys</sup>), kurios gali būti pritaikomos atsinaujinančių biologinių žaliavų biokonversijai.

# PUBLIKACIJŲ IR KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

## Publikacijos

### Disertacijos rezultatai paskelbti straipsniuose:

1. **Gegeckas A.**, Gudiukaitė R., Debski J., Citavicius D. Keratinous waste decomposition and peptide production by keratinase from *Geobacillus stearothermophilus* AD-11. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015:75, 158-165;
2. **Gegeckas A.**, Gudiukaitė R., Citavicius D. Keratinolytic proteinase from *Bacillus thuringiensis* AD-12. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014:69, 46-51.

### Kiti straipsniai:

1. Gudiukaitė R., **Gegeckas A.**, Sadauskas M., Citavicius D. Detection of Asp371, Phe375, and Tyr376 influence on GD-95-10 lipase using alanine scanning mutagenesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016:178(4), 654-69;
2. Gudiukaitė R., **Gegeckas A.**, Kazlauskas D., Citavicius D. Influence of N- and/or C-terminal regions on activity, expression, characteristics and structure of lipase from *Geobacillus* sp. 95. *Extremophiles*, 2014:18(1), 131-45.

## Konferencijos

### Disertacijos rezultatai pristatyti konferencijose (dalyvauta 7 konferencijose, iš kurių 6 tarptautinės):

1. **Gegeckas A.**, Simkute A., Gudiukaite R., Citavicius DJ. Keratin waste biodegradation and peptide production by keratinolytic proteinase from *Bacillus methylotrophicus* AD-AA3. VAAM 2015 Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, 13-16 March 2016. Jena, Germany;
2. Simkute A., **Gegeckas A.**, Gudiukaite R., Citavicius DJ. Keratinolytic proteinase from *Bacillus pumilus* AD-W with promising keratin waste biodegradation activity. *Vita Scientia* 2016, 04 January 2016. Vilnius, Lithuania;

3. **Gegeckas A.**, Simkute A., Gudiukaite R., Citavicius DJ. Keratinolytic proteinase from *Bacillus pumilus* AD-W with promising peptide-production activity. BioMicroWorld 2015 6<sup>th</sup> International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 28-30 October 2015. Barcelona, Spain;
4. **Gegeckas A.**, Gudiukaitė R., Šimkutė A., Čitavičius DJ. Keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai: įvairovė ir biotechnologinis potencialas. 2015 m. Jaunųjų mokslininkų konferencija BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos, Gruodžio 10 d., 2015. Vilnius, Lietuva;
5. **Gegeckas A.**, Gudiukaite R., Citavicius DJ. Synthetic homodimer of GEOker keratinase for efficient biodegradation of keratin by-products. BioMicroWorld 2015 6<sup>th</sup> International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 28-30 October 2015. Barcelona, Spain;
6. **Gegeckas A.**, Gudiukaite R., Čitavičius D. Keratinolytic proteinase as a powerful biocatalyst for bio-active peptide production. CBM2014 2<sup>th</sup> Congress of Baltic Microbiologists, 16-19 October 2014. Tartu, Estonia;
7. **Gegeckas A.**, Gudiukaitė R., Čitavičius D. Production, purification and partial characterization of keratinolytic serine peptidase from newly isolated *Bacillus* sp. K1-2 strain. FEMS2013 5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, 20-25 July 2013. Leipzig, Germany.

**Kitos konferencijos:**

1. Malunavicius V., Gudiukaite R., **Gegeckas A.**, Citavicius DJ. Construction of new chimeric lipase using protein engineering methods. Vita Scientia 2016, 04 January 2016. Vilnius, Lithuania;
2. Gudiukaite R., **Gegeckas A.**, Malunavicius V., Citavicius D. Functionality analysis of structural domains from GD-95 lipase by site specific and random mutagenesis. FEMS2015 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, 07-11 June 2015. Maastricht, The Netherlands;
3. Gudiukaite R., **Gegeckas A.**, Čitavičius D. GD-95 lipase - new biocatalyst in wide industry areas. CBM2014 2<sup>th</sup> Congress of Baltic Microbiologists, 16-19 October 2014. Tartu, Estonia;

4. Gudiukaitė R., **Gegeckas A.**, Čitavičius D. *Geobacillus* spp. kamienų rekombinantinių lipazių fizikinių bei cheminių savybių įvairovės įvertinimas. Mokslas Gamtos Mokslų fakultete, 8-ta mokslinė konferencija, Spalio 3 d., 2014. Vilnius, Lietuva;
5. Gudiukaitė R., **Gegeckas A.**, Čitavičius D. Cloning, purification and esterification capability determination of lipase produced by *Geobacillus* sp. 76. FEMS2013 5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, 20-25 July 2013. Leipzig, Germany.

# GYVENIMO APRAŠYMAS

## ASMENINĖ INFORMACIJA

### AUDRIUS GEGECKAS

S. Konarskio 14-6, LT-03124, Vilnius, Lietuva

+370 628 05948

gegeckas.audrius@gmail.com

1987 lapkričio 19 d.

## DARBO PATIRTIS

2013-09 - iki dabar

---

### LEKTORIUS

Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

2014-05 - 2014-12

### VYRESNYSIS SPECIALISTAS

Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

2011-02 - 2013-12

### SPECIALISTAS

Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

2009-01 - 2010-05

### STAŽUOTOJAS

UAB Fermentas (dabar UAB Thermo Fisher Scientific Baltics)

## IŠSILAVINIMAS IR

### KVALIFIKACIJA

2010-09 - 2012-06

---

### MIKROBIOLOGIJOS MAGISTRAS

Vilniaus universitetas

2006-09 - 2010-06

BIOLOGIJOS BAKALAURAS (Molekulinės biologijos kvalifikacija)

Vilniaus universitetas

## PROJEKTAI

---

"Lietuvos mokinių neformaliojo švietimo centro vykdomos moksleivių stovyklos, rengiantis tarptautinei biologijos olimpiadai", Lietuvos Respublikos valstybės ir Lietuvos mokinių neformaliojo švietimo centro remiamas projektas, 2015 m., konsultantas;

Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros (MTEP) skatinimas",  
Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūra (MITA), 2014 m.,  
vyresnysis specialistas

"Mokinių jaunųjų tyrėjų atskleidimo ir ugdymo sistemos  
sukūrimas - II etapas", Europos Sąjungos struktūrinių fondų ir  
Lietuvos Respublikos valstybės remiamas projektas, 2012 - 2015  
m. m., 5,777 mln. Lt., mokslinis konsultantas;

Pramoninės biotechnologijos plėtros Lietuvoje 2011-2013 m.  
programos projektas "Inovatyvios priemonės kosmetikos pramonei  
(COSMETIZYM)", Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūra,  
2011-2013 m. m., 120 tūkst. EUR, specialistas



## **FINANSINĖ PARAMA**

- Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūros (MITA) remiamas Pramoninės biotechnologijos plėtros Lietuvoje 2011-2013 m. programos projektas "Inovatyvios priemonės kosmetikos pramonei (COSMETIZYM)", MITA 31V-18;
- Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūros (MITA) remiama Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros (MTEP) skatinimo programa, MITA 31V-106;
- Lietuvos mokslo tarybos (LMT) stipendija (2014-2016 m.);
- Lietuvos mokslo tarybos (LMT) stipendija mokslinėms išvykoms (2015-2016 m.).

## **PADĖKA**

Noriu išreikšti nuoširdžiausią padėką savo buvusiam darbo vadovui prof. Donaldui Čitavičiui. Ačiū Jums už pasitikėjimą, suteiktą ne vieną galimybę, diskusijas, komentarus, patarimus ir nuolatinį rūpestį. Jūs visada išliksit tikru vadovu.

Esu dėkingas prof. Nomedai Kuisienei už pagalbą rengiant šią disertaciją, už palaikymą, patarimus, skirtą laiką ir rūpestį.

Noriu padėkoti Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros vedėjai prof. Lilijai Kalėdienei už rūpestį ir pagalbą tvarkant įvairius reikalus. Taip pat dėkoju visam Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolektyvui už vertingus patarimus ir padaršimus.

Ypatingai noriu padėkoti savo kolegoms Renatai Gudiukaitei, Raimondai Petkauskaitei, Alisai Gricajevai, Andriui Jasilioniui, Arnoldui Kauniečiui ir Mikui Sadauskui už nepamirštas akimirkas ir puikią laboratorijos aplinką.

Dėkoju savo studentei Aistei Šimkutei už pagalbą atliekant eksperimentus.

Esu dėkingas prof. Rolandui Meškiui ir prof. Editai Sužiedėlienei už galimybę atlikti norimus eksperimentus.

Ačiū savo draugams, ypač Aidai Virkšaitėi ir dr. Giedriui Gasiūnui, kurie skyrė laiko ir prisidėjo prie šio darbo taisymo.

Dėkoju savo Šeimai – už nuolatinį palaikymą, tikėjimą, rūpestį, skatinimą siekti savo tikslų ir niekada nesustoti.

Ypatingas Ačiū savo žmonai Linai, kuri visada buvo ir yra šalia, kuri nuolat palaiko ir supranta.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aspino, S.I., Horn, S.J. & Eijsink, V.G.H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process biochemistry* **40**, 1957-1966 (2005).
2. Gupta, R. & Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology* **70**, 21-33 (2006).
3. Kublanov, I.V. et al. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Applied and environmental microbiology* **75**, 286-291 (2009).
4. Syed, D.G., Lee, J.C., Li, W.J., Kim, C.J. & Agasar, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource technology* **100**, 1868-1871 (2009).
5. Rizk, M., Antranikian, G. & Elleuche, S. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. *Biochemical and biophysical research communications* **428**, 1-5 (2012).
6. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Handbook of the Convention on Biological Diversity Including its Cartagena Protocol on Biosafety, Vol. 3. (2005).
7. Heux, S., Meynial-Salles, I., O'Donohue, M.J. & Dumon, C. White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology advances* **33**, 1653-1670 (2015).
8. Bazzanella, A. SusChem reaction & process design--sustainable and competitive chemical production in Europe. *ChemSusChem* **1**, 775-776 (2008).
9. Johannes, T.W. & Zhao, H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current opinion in microbiology* **9**, 261-267 (2006).
10. Kumar, A. & Singh, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. *Critical reviews in biotechnology* **33**, 365-378 (2013).
11. Demain, A.L. & Adrio, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular biotechnology* **38**, 41-55 (2008).
12. Johnson, E.A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts--the ascomycetes. *Applied microbiology and biotechnology* **97**, 503-517 (2013).
13. Adrio, J.L. & Demain, A.L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* **4**, 117-139 (2014).
14. Kratzer, R., Woodley, J.M. & Nidetzky, B. Rules for biocatalyst and reaction engineering to implement effective, NAD(P)H-dependent, whole cell bioreductions. *Biotechnology advances* **33**, 1641-1652 (2015).

15. Pollard, D.J. & Woodley, J.M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in biotechnology* **25**, 66-73 (2007).
16. Schrewe, M., Julsing, M.K., Buhler, B. & Schmid, A. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. *Chemical society reviews* **42**, 6346-6377 (2013).
17. Hanefeld, U., Gardossi, L. & Magner, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical society reviews* **38**, 453-468 (2009).
18. Schuurmann, J., Quehl, P., Festel, G. & Jose, J. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 8031-8046 (2014).
19. Tsai, S.L., DaSilva, N.A. & Chen, W. Functional display of complex cellulosomes on the yeast surface via adaptive assembly. *ACS synthetic biology* **2**, 14-21 (2013).
20. Besingi, R.N. & Clark, P.L. Extracellular protease digestion to evaluate membrane protein cell surface localization. *Nature protocols* **10**, 2074-2080 (2015).
21. Park, T.J. et al. Surface display of recombinant proteins on *Escherichia coli* by BclA exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbial cell factories* **12**, 81 (2013).
22. Li, Y. et al. Heterologous expression and characterization of two chitinase 5 enzymes from the migratory locust *Locusta migratoria*. *Insect science* (2016).
23. Lohrasbi-Nejad, A., Torkzadeh-Mahani, M. & Hosseinkhani, S. Heterologous expression of a hydrophobin HFB1 and evaluation of its contribution to producing stable foam. *Protein expression and purification* **118**, 25-30 (2016).
24. Pei, X. et al. Heterologous expression of a GH3 beta-glucosidase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* with high purity and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *Protein expression and purification* **119**, 75-84 (2016).
25. Kishishita, S. et al. Cellulose-inducible xylanase Xyl10A from *Acremonium cellulolyticus*: Purification, cloning and homologous expression. *Protein expression and purification* **94**, 40-45 (2014).
26. Levasseur, A., Benoit, I., Asther, M. & Record, E. Homologous expression of the feruloyl esterase B gene from *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein expression and purification* **37**, 126-133 (2004).
27. Sun, B., Kantzow, C., Bresch, S., Castiglione, K. & Weuster-Botz, D. Multi-enzymatic one-pot reduction of dehydrocholic acid to 12-keto-ursodeoxycholic acid with whole-cell biocatalysts. *Biotechnology and bioengineering* **110**, 68-77 (2013).

28. Ninh, P.H. et al. Development of a continuous bioconversion system using a thermophilic whole-cell biocatalyst. *Applied and environmental microbiology* **79**, 1996-2001 (2013).
29. de Regil, R. & Sandoval, G. Biocatalysis for biobased chemicals. *Biomolecules* **3**, 812-847 (2013).
30. Tao, F., Zhang, Y., Ma, C. & Xu, P. One-pot bio-synthesis: N-acetyl-D-neuraminic acid production by a powerful engineered whole-cell catalyst. *Scientific reports* **1**, 142 (2011).
31. Feijoo-Siota, L. et al. Recent patents on microbial proteases for the dairy industry. *Recent advances in DNA & gene sequences* **8**, 44-55 (2014).
32. Moure, A., Dominguez, H. & Parajo, J.C. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 7600-7608 (2005).
33. Novelli, P.K., Barros, M.M. & Fleuri, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food chemistry* **198**, 119-124 (2016).
34. Karn, S.K. & Kumar, A. Hydrolytic enzyme protease in sludge: Recovery and its application. *Biotechnology and bioprocess engineering* **20**, 652-661 (2015).
35. Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. & Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* **42**, D503-509 (2014).
36. Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Finn, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* **44**, D343-350 (2016).
37. Synowiecki, J. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *African journal of biotechnology* **9**, 7020-7025 (2010).
38. Li, Q., Yi, L., Marek, P. & Iverson, B.L. Commercial proteases: present and future. *FEBS letters* **587**, 1155-1163 (2013).
39. Scott, C.J. & Taggart, C.C. Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie* **92**, 1681-1688 (2010).
40. Gupta, A. & Khare, S.K. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource technology* **97**, 1788-1793 (2006).
41. Bruins, M.E., Janssen, A.E. & Boom, R.M. Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. *Applied biochemistry and biotechnology* **90**, 155-186 (2001).
42. Ohgiya, S., Hoshino, T., Okuyama, H., Tanaka, S. & Ishizaki, K. Biotechnology of enzymes from cold-adapted microorganisms. *Springer*, 18-35 (1999).
43. Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A. & Al-Zarban, S. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of

- feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource technology* **66**, 1-11 (1998).
44. Daroit, D.J. & Brandelli, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. *Critical reviews in biotechnology* **34**, 372-384 (2014).
  45. Sahni, N., Sahota, P.P. & Phutela, U.G. Bacterial keratinases and their prospective applications: A review. *International journal of current microbiology and applied sciences* **4**, 768-783 (2015).
  46. Zarai Jaouadi, N. et al. A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. *International journal of biological macromolecules* **79**, 952-964 (2015).
  47. Bouacem, K. et al. Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. *International journal of biological macromolecules* **86**, 321-328 (2016).
  48. Mitsuiki, S., Sakai, M., Moriyama, Y., Goto, M. & Furukawa, K. Purification and some properties of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **66**, 164-167 (2002).
  49. Friedrich, A.B. & Antranikian, G. Keratin Degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a Novel Thermophilic Anaerobic Species of the Order Thermotogales. *Applied and environmental microbiology* **62**, 2875-2882 (1996).
  50. Nam, G.W. et al. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of microbiology* **178**, 538-547 (2002).
  51. Cao, Z.J. et al. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **36**, 181-188 (2009).
  52. Xie, F. et al. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. *Bioresource technology* **101**, 344-350 (2010).
  53. Brandelli, A., Daroit, D.J. & Riffel, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied microbiology and biotechnology* **85**, 1735-1750 (2010).
  54. Anandharaj, M., Sivasankari, B., Siddharthan, N., Rani, R.P. & Sivakumar, S. Production, Purification, and Biochemical Characterization of Thermostable Metallo-Protease from Novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 Isolated from Tannery Waste. *Applied biochemistry and biotechnology* **178**, 1666-1686 (2016).
  55. Tork, S.E., Shahein, Y.E., El-Hakim, A.E., Abdel-Aty, A.M. & Aly, M.M. Production and characterization of thermostable metallo-keratinase from newly isolated *Bacillus subtilis* NRC 3. *International journal of biological macromolecules* **55**, 169-175 (2013).
  56. Zhang, R.X. et al. A metallo-keratinase from a newly isolated *Acinetobacter* sp. R-1 with low collagenase activity and its

- biotechnological application potential in leather industry. *Bioprocess and biosystems engineering* **39**, 193-204 (2016).
57. Jaouadi, N.Z. et al. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *PloS one* **8**, e76722 (2013).
  58. Paul, T. et al. Biochemical and Structural Characterization of a Detergent Stable Alkaline Serine Keratinase from *Paenibacillus Woosongensis* TKB2: A Potential Additive for Laundry Detergent. *Waste and biomass valorization* **5**, 563-574 (2014).
  59. Giongo, J.L., Lucas, F.S., Casarin, F., Heeb, P. & Brandelli, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World journal of microbiology and biotechnology* **23**, 375-382 (2007).
  60. Riffel, A. et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *Journal of biotechnology* **128**, 693-703 (2007).
  61. Lee, Y.J. et al. Biochemical and structural characterization of a keratin-degrading M32 carboxypeptidase from *Fervidobacterium islandicum* AW-1. *Biochemical and biophysical research communications* **468**, 927-933 (2015).
  62. Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., Du, G. & Chen, J. Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. *International biodeterioration and biodegradation* **82**, 166-172 (2013).
  63. Lin, X., Wong, S.L., Miller, E.S. & Shih, J.C. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **19**, 134-138 (1997).
  64. Evans, K.L., Crowder, J. & Miller, E.S. Subtilisins of *Bacillus* spp. hydrolyze keratin and allow growth on feathers. *Canadian journal of microbiology* **46**, 1004-1011 (2000).
  65. Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L. & Nasri, M. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Canadian journal of microbiology* **55**, 427-436 (2009).
  66. Lee, H., Suh, D.B., Hwang, J.H. & Suh, H.J. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Applied biochemistry and biotechnology* **97**, 123-133 (2002).
  67. Ghosh, A., Chakrabarti, K. & Chattopadhyay, D. Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **35**, 825-834 (2008).
  68. Suntornsuk, W. et al. Purification and Characterisation of Keratinase from a Thermotolerant Feather-degrading Bacterium. *World journal of microbiology and biotechnology* **21**, 1111-1117 (2005).

69. Yoshioka, M. et al. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. *Journal of applied microbiology* **102**, 509-515 (2007).
70. Kumar, A.G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N. & Sekaran, G. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *Journal of applied microbiology* **104**, 411-419 (2008).
71. Cai, C.G., Chen, J.S., Qi, J.J., Yin, Y. & Zheng, X.D. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *Journal of zhejiang university. science. B* **9**, 713-720 (2008).
72. Sanghvi, G. et al. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. *International journal of biological macromolecules* **87**, 256-262 (2016).
73. Rai, S.K., Konwarh, R. & Mukherjee, A.K. Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline  $\beta$ -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. *Biochemical engineering journal* **45**, 218-225 (2009).
74. Suh, H.J. & Lee, H.K. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Journal of protein chemistry* **20**, 165-169 (2001).
75. Balaji, S. et al. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). *World journal of microbiology and biotechnology* **24**, 2741-2745 (2008).
76. Thys, R.C. & Brandelli, A. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *Journal of applied microbiology* **101**, 1259-1268 (2006).
77. Ionata, E. et al. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. *pennavorans* bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. *Microbiological research* **163**, 105-112 (2008).
78. Bernal, C., Cairo, J. & Coello, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and microbial technology* **38**, 49-54 (2006).
79. Longshaw, C.M., Wright, J.D., Farrell, A.M. & Holland, K.T. *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. *Journal of applied microbiology* **93**, 810-816 (2002).
80. De Toni, C.H., Richter, M.F., Chagas, J.R., Henriques, J.A. & Termignoni, C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Canadian journal of microbiology* **48**, 342-348 (2002).
81. Zaghoul, T.I. Cloned *Bacillus subtilis* alkaline protease (*aprA*) gene showing high level of keratinolytic activity. *Applied biochemistry and biotechnology* **70-72**, 199-205 (1998).



82. Macedo, A.J. et al. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and environmental microbiology* **71**, 594-596 (2005).
83. Macedo, A.J., Beys da Silva, W.O. & Termignoni, C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. *Canadian journal of microbiology* **54**, 180-188 (2008).
84. Kluskens, L.D. et al. Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*. *Extremophiles: life under extreme conditions* **6**, 185-194 (2002).
85. Kim, J.S., Kluskens, L.D., de Vos, W.M., Huber, R. & van der Oost, J. Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to subtilisin. *Journal of molecular biology* **335**, 787-797 (2004).
86. Eijsink, V.G., Matthews, B.W. & Vriend, G. The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. *Protein science : a publication of the Protein Society* **20**, 1346-1355 (2011).
87. Lin, S., Zhang, M., Liu, J. & Jones, G.S. Construction and application of recombinant strain for the production of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Journal of bioscience and bioengineering* **119**, 284-288 (2015).
88. Briki, S., Hamdi, O. & Landoulsi, A. Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from *Bacillus* sp. SB12. *Protein expression and purification* **121**, 9-16 (2016).
89. Zhang, Z. et al. Identification and Characterization of a New Alkaline Thermolysin-Like Protease, BtsTLP1, from *Bacillus thuringiensis* Serovar Sichuansis Strain MC28. *Journal of microbiology and biotechnology* **25**, 1281-1290 (2015).
90. Demidyuk, I.V. et al. Crystal structure of the protealysin precursor: insights into propeptide function. *The Journal of biological chemistry* **285**, 2003-2013 (2010).
91. Gao, X. et al. Structural basis for the autoprocessing of zinc metalloproteases in the thermolysin family. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* **107**, 17569-17574 (2010).
92. Matthews, B.W., Jansonius, J.N., Colman, P.M., Schoenborn, B.P. & Dupourque, D. Three-dimensional structure of thermolysin. *Nature: new biology* **238**, 37-41 (1972).
93. Inouye, K. et al. Extracellular production of recombinant thermolysin expressed in *Escherichia coli*, and its purification and enzymatic characterization. *Protein expression and purification* **46**, 248-255 (2006).
94. Mansfeld, J., Petermann, E., Durrschmidt, P. & Ulbrich-Hofmann, R. The propeptide is not required to produce catalytically active neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *Protein expression and purification* **39**, 219-228 (2005).

95. Adekoya, O.A. et al. Inhibition of pseudolysin and thermolysin by hydroxamate-based MMP inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* **89**, 340-348 (2015).
96. Kojima, K., Nakata, H. & Inouye, K. Involvement of Val 315 located in the C-terminal region of thermolysin in its expression in *Escherichia coli* and its thermal stability. *Biochimica et biophysica acta* **1844**, 330-338 (2014).
97. Kawasaki, Y., Yasukawa, K. & Inouye, K. Effects of site-directed mutagenesis in the N-terminal domain of thermolysin on its stabilization. *Journal of biochemistry* **153**, 85-92 (2013).
98. Nakanishi, K. & Matsuno, R. Kinetics of enzymatic synthesis of peptides in aqueous/organic biphasic systems. Thermolysin-catalyzed synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-phenylalanine methyl ester. *European journal of biochemistry / FEBS* **161**, 533-540 (1986).
99. Ager, D.J. et al. Commercial, Synthetic Nonnutritive Sweeteners. *Angewandte chemie international edition* **37**, 1802-1817 (1998).
100. Imaoka, Y., Kawamoto, T., Ueda, M. & Tanaka, A. Peptide synthesis with halophenylalanines by thermolysin. *Applied microbiology and biotechnology* **40**, 653-656 (1994).
101. Zander, U. et al. MeshAndCollect: an automated multi-crystal data-collection workflow for synchrotron macromolecular crystallography beamlines. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **71**, 2328-2343 (2015).
102. Gradisar, H., Friedrich, J., Krizaj, I. & Jerala, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and environmental microbiology* **71**, 3420-3426 (2005).
103. Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M. & Verneuil, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and environmental microbiology* **65**, 2570-2576 (1999).
104. Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K. & Tamiya, E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochemical and biophysical research communications* **294**, 1138-1143 (2002).
105. Jankiewicz, U., Larkowska, E. & Swiontek Brzezinska, M. Production, characterization, gene cloning, and nematocidal activity of the extracellular protease from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. *Journal of bioscience and bioengineering* **121**, 614-618 (2016).
106. Ghorbel-Bellaaj, O. et al. *Pseudomonas aeruginosa* A2 elastase: purification, characterization and biotechnological applications. *International journal of biological macromolecules* **50**, 679-686 (2012).

107. Gousterova, A. et al. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in applied microbiology* **40**, 335-340 (2005).
108. Ichida, J.M. et al. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of microbiological methods* **47**, 199-208 (2001).
109. Kim, J.M., Lim, W.J. & Suh, H.J. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process biochemistry* **37**, 287-291 (2001).
110. Gopinath, S.C. et al. Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. *BioMed research international* **2015**, 140726 (2015).
111. Gong, J. et al. A surfactant-stable *Bacillus pumilus* K9  $\alpha$ -keratinase and its potential application in detergent industry. *Chemical research in chinese universities* **31**, 91-97 (2015).
112. T., K.-K. Studies on the decomposition of keratin waste by saprotrophic microfungi. III. Activity and properties of keratinolytic enzymes. *Acta mycologica* **34**, 65-78 (1999).
113. Kunert, J. Physiology of keratinophilic fungi. *Revista iberoamericana de micología*, 77-85 (2000).
114. Dozie, I.N., Okeke, C.N. & Unaeze, N.C. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *World journal of microbiology & biotechnology* **10**, 563-567 (1994).
115. Gupta, R., Sharma, R. & Beg, Q.K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Critical reviews in biotechnology* **33**, 216-228 (2013).
116. Brandelli, A., Sala, L. & Kalil, S.J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food research international* **73**, 3-12 (2015).
117. Wang, S. et al. Culturing fibroblasts in 3D human hair keratin hydrogels. *ACS applied materials & interfaces* **7**, 5187-5198 (2015).
118. Yang, J., Li, J., Mai, Z., Tian, X. & Zhang, S. Purification, characterization, and gene cloning of a cold-adapted thermolysin-like protease from *Halobacillus* sp. SCSIO 20089. *Journal of bioscience and bioengineering* **115**, 628-632 (2013).
119. Rahayu, S., Syah, D. & Suhartono, M.T. Degradation of keratin by keratinase and disulfide reductase from *Bacillus* sp. MTS of Indonesian origin. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* **1**, 152-158 (2012).
120. Leube, R.E., Moch, M., Kolsch, A. & Windoffer, R. "Panta rhei": Perpetual cycling of the keratin cytoskeleton. *Bioarchitecture* **1**, 39-44 (2011).
121. Hill, P., Brantley, H. & Van Dyke, M. Some properties of keratin biomaterials: kerateines. *Biomaterials* **31**, 585-593 (2010).
122. Cohlberg, J.A. Textbook error: the structure of alpha-keratin. *Trends in biochemical sciences* **18**, 360-362 (1993).
123. Hanukoglu, I. & Ezra, L. Proteopedia entry: coiled-coil structure of keratins. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly*

- publication of the international union of biochemistry and molecular biology* **42**, 93-94 (2014).
124. Wang, B., Yang, W., McKittrick, J. & Meyers, M.A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in materials science* **76**, 229-318 (2016).
  125. Karthikeyan, R., Balaji, S. & Sehgal, P.K. Industrial applications of keratins - A review. *Journal of scientific and industrial research* **66**, 710-715 (2007).
  126. Bradbury, J.H. The structure and chemistry of keratin fibers. *Advances in protein chemistry* **27**, 111-211 (1973).
  127. Wang, H. et al. In vitro assembly and structure of trichocyte keratin intermediate filaments: a novel role for stabilization by disulfide bonding. *The journal of cell biology* **151**, 1459-1468 (2000).
  128. Zaghoul, T.I., Embaby, A.M. & Elmahdy, A.R. Key determinants affecting sheep wool biodegradation directed by a keratinase-producing *Bacillus subtilis* recombinant strain. *Biodegradation* **22**, 111-128 (2011).
  129. Xia, Y., Masse, D.I., McAllister, T.A., Beaulieu, C. & Ungerfeld, E. Anaerobic digestion of chicken feather with swine manure or slaughterhouse sludge for biogas production. *Waste management* **32**, 404-409 (2012).
  130. Duarte, T.R. et al. Increased expression of keratinase and other peptidases by *Candida parapsilosis* mutants. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* **44**, 212-216 (2011).
  131. Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J. & Boot-Handford, R.P. Collagens at a glance. *Journal of cell science* **120**, 1955-1958 (2007).
  132. Veit, G. et al. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *The journal of biological chemistry* **281**, 3494-3504 (2006).
  133. Shoulders, M.D. & Raines, R.T. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry* **78**, 929-958 (2009).
  134. Kadler, K.E., Hill, A. & Canty-Laird, E.G. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Current opinion in cell biology* **20**, 495-501 (2008).
  135. Tsai, S.W., Cheng, Y.H., Chang, Y., Liu, H.L. & Tsai, W.B. Type I collagen structure modulates the behavior of osteoblast-like cells. *Journal of the Taiwan institute of chemical engineers* **41**, 247-251 (2010).
  136. Hulmes, D.J., Jesior, J.C., Miller, A., Berthet-Colominas, C. & Wolff, C. Electron microscopy shows periodic structure in collagen fibril cross sections. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **78**, 3567-3571 (1981).

137. Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P. & Regenstein, J.M. Collagen and gelatin. *Annual review of food science and technology* **6**, 527-557 (2015).
138. Gomez-Guillen, M.C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M.E. & Montero, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food hydrocolloids* **25**, 1813-1827 (2011).
139. Aghaei-Ghareh-Bolagh, B., Mithieux, S.M. & Weiss, A.S. Elastic proteins and elastomeric protein alloys. *Current opinion in biotechnology* **39**, 56-60 (2016).
140. Vrhovski, B. & Weiss, A.S. Biochemistry of tropoelastin. *European journal of biochemistry / FEBS* **258**, 1-18 (1998).
141. Kuo, C.J., Ptak, C.P., Hsieh, C.L., Akey, B.L. & Chang, Y.F. Elastin, a novel extracellular matrix protein adhering to mycobacterial antigen 85 complex. *The journal of biological chemistry* **288**, 3886-3896 (2013).
142. Tarakanova, A. & J., B.M. Molecular modeling of protein materials: case study of elastin. *Modelling and simulation in materials science and engineering* **21**, 1-13 (2013).
143. MacEwan, S.R. & Chilkoti, A. Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the controlled release society* **190**, 314-330 (2014).
144. Saxena, R. & Nanjan, M.J. Elastin-like polypeptides and their applications in anticancer drug delivery systems: a review. *Drug delivery* **22**, 156-167 (2015).
145. Kornilowicz-Kowalska, T. & Bohacz, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management* **31**, 1689-1701 (2011).
146. Goddard, D.R. & Michaelis, L. A Study of Keratin. *The Journal of biological chemistry* **106**, 605-614 (1934).
147. Raubitschek, F. Mechanical versus chemical keratolysis by dermatophytes. *Sabouraudia* **1**, 87-90 (1961).
148. Kunert, J. Keratin decomposition by dermatophytes. II. Presence of s-sulfocysteine and cysteic acid in soluble decomposition products. *Zeitschrift fur allgemeine mikrobiologie* **16**, 97-105 (1976).
149. Bockle, B. & Muller, R. Reduction of Disulfide Bonds by *Streptomyces pactum* during Growth on Chicken Feathers. *Applied and environmental microbiology* **63**, 790-792 (1997).
150. Ramnani, P. & Gupta, R. Keratinases vis-à-vis conventional proteases and feather degradation. *World journal of microbiology and biotechnology* **23**, 1537-1540 (2007).
151. Nwadiaro, P.O. et al. Keratin Degradation by *Penicillium purpurogenum* Isolated from Tannery Soils in Jos, Nigeria. *British microbiology research journal* **8**, 358-366 (2015).
152. Kanchana, R. & Mesta, D. Native Feather Degradation by a Keratinophilic Fungus. *International journal of ChemTech research* **5**, 2947-2954 (2013).

153. Queiroga, A.C., Pintado, M.E. & Malcata, F.X. Potential use of wool-associated *Bacillus* species for biodegradation of keratinous materials. *International biodeterioration & biodegradation* **70**, 60-65 (2012).
154. Laba, W. & Rodziewicz, A. Biodegradation of hard keratins by two *Bacillus* strains. *Jundishapur journal of microbiology* **7**, e8896 (2014).
155. Huang, Y., Busk, P.K., Herbst, F.A. & Lange, L. Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non-pathogenic fungus *Onygena corvina*. *Applied microbiology and biotechnology* **99**, 9635-9649 (2015).
156. Jain, R., Jain, P.C. & Agrawal, S.C. Feather degradation by *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068. *Annals of microbiology* **62**, 973-978 (2012).
157. Eslahi, N., Dadashian, F. & Nejad, N.H. An investigation on keratin extraction from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis. *Preparative biochemistry & biotechnology* **43**, 624-648 (2013).
158. Brandelli, A. Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic strain of *Chryseobacterium* sp. kr6. *Annals of microbiology* **55**, 47-50 (2005).
159. Laba, W. et al. Biodegradation of pretreated pig bristles by *Bacillus cereus* B5esz. *International biodeterioration and biodegradation* **100**, 116-123 (2015).
160. Govarthanam, M. et al. Response surface methodology based optimization of keratinase production from alkali-treated feather waste and horn waste using *Bacillus* sp. MG-MASC-BT. *Journal of industrial and engineering chemistry* **27**, 25-30 (2015).
161. Sahoo, D.K., Das, A., Thatoi, H., Mondal, K.C. & Mohapatra, P.K. Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology* **167**, 1040-1051 (2012).
162. Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., Du, G. & Chen, J. Enhancement of the catalytic efficiency and thermostability of *Stenotrophomonas* sp. keratinase KerSMD by domain exchange with KerSMF. *Microbial biotechnology* **9**, 35-46 (2015).
163. Abdel-Naby, M.A., MH, A.I. & El-Refai, H.A. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Bacillus pumilus* FH9 keratinase conjugated with activated pectin. *International journal of biological macromolecules* **85**, 238-245 (2016).
164. Cai, C.G., Lou, B.G. & Zheng, X.D. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang university. Science. B* **9**, 60-67 (2008).
165. Kreplak, L., Doucet, J., Dumas, P. & Briki, F. New aspects of the alpha-helix to beta-sheet transition in stretched hard alpha-keratin fibers. *Biophysical journal* **87**, 640-647 (2004).
166. Coward-Kelly, G., Agbogbo, F.K. & Holtzapple, M.T. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 2. Animal hair. *Bioresource technology* **97**, 1344-1352 (2006).

167. Ng, C.S. et al. Genomic organization, transcriptomic analysis, and functional characterization of avian alpha- and beta-keratins in diverse feather forms. *Genome biology and evolution* **6**, 2258-2273 (2014).
168. Fuchs, E. Keratins and the skin. *Annual review of cell and developmental biology* **11**, 123-153 (1995).
169. Tork, S.E., Shahein, Y.E., El-Hakim, A.E., Abdel-Aty, A.M. & Aly, M.M. Purification and partial characterization of serine-metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* NRC21. *International journal of biological macromolecules* **86**, 189-196 (2016).
170. Sangali, S. & Brandelli, A. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. *Applied biochemistry and biotechnology* **87**, 17-24 (2000).
171. Brandelli, A. Bacterial Keratinases: useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and bioprocess technology* **1**, 105-116 (2008).
172. Lange, L., Huang, Y. & Busk, P.K. Microbial decomposition of keratin in nature-a new hypothesis of industrial relevance. *Applied microbiology and biotechnology* (2016).
173. Moreira-Gasparin, F.G. et al. Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. *Biodegradation* **20**, 727-736 (2009).
174. Prakash, P., Jayalakshmi, S.K. & Sreeramulu, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. *Applied biochemistry and biotechnology* **160**, 1909-1920 (2010).
175. Gupta, R., Rajput, R., Sharma, R. & Gupta, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Applied microbiology and biotechnology* **97**, 9931-9940 (2013).
176. Reddy, N. Non-food industrial applications of poultry feathers. *Waste Management* **45**, 91-107 (2015).
177. Mohorcic, M., Torkar, A., Friedrich, J., Kristl, J. & Murdan, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. *International journal of pharmaceuticals* **332**, 196-201 (2007).
178. Chao, Y.P., Xie, F.H., Yang, J., Lu, J.H. & Qian, S.J. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. *Journal of environmental sciences (China)* **19**, 1125-1128 (2007).
179. Matsui, T. et al. Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328. *Applied microbiology and biotechnology* **82**, 941-950 (2009).
180. Wan, M.Y., Dong, G., Yang, B.Q. & Feng, H. Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysate. *Biotechnology letters* **38**, 643-649 (2015).
181. Chen, C.Y., Rojanatavorn, K., Clark, A.C. & Shih, J.C. Characterization and enzymatic degradation of Sup35NM, a yeast prion-like protein.

- Protein science : a publication of the Protein Society* **14**, 2228-2235 (2005).
182. Mitsuiki, S. et al. Degradation of PrP(Sc) by keratinolytic protease from *Nocardioopsis* sp. TOA-1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **70**, 1246-1248 (2006).
  183. Rajput, R. & Gupta, R. Thermostable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12: production, chitin crosslinking and degradation of Sup35NM aggregates. *Bioresource technology* **133**, 118-126 (2013).
  184. Booth, C.J., Johnson, C.J. & Pedersen, J.A. Microbial and enzymatic inactivation of prions in soil environments. *Soil biology and biochemistry* **59**, 1-15 (2013).
  185. Sharma, R. & Gupta, R. Coupled action of gamma-glutamyl transpeptidase-glutathione and keratinase effectively degrades feather keratin and surrogate prion protein, Sup 35NM. *Bioresource technology* **120**, 314-317 (2012).
  186. Okoroma, E.A. et al. Enzymatic formulation capable of degrading scrapie prion under mild digestion conditions. *PloS one* **8**, e68099 (2013).
  187. Casarin, F., Cladera-Olivera, F. & Brandelli, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. *Food and bioprocess technology* **1**, 301-305 (2008).
  188. Tapia, D.M.T. & Simoes, M.L.G. Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. *African journal of biotechnology* **7**, 296-300 (2008).
  189. Balint, B. et al. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Applied microbiology and biotechnology* **69**, 404-410 (2005).
  190. Yoshikawa, M. Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides* **72**, 208-225 (2015).
  191. Hancock, R.E. & Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* **24**, 1551-1557 (2006).
  192. Yust, M.M. et al. Rapeseed protein hydrolysates: a source of HIV protease peptide inhibitors. *Food chemistry* **87**, 387-392 (2004).
  193. Zeng, M. et al. Antiviral active peptide from oyster. *Chinese journal of oceanology and limnology* **26**, 307-312 (2008).
  194. Murray, B.A. & FitzGerald, R.J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design* **13**, 773-791 (2007).
  195. Gill, H.S., Doull, F., Rutherford, K.J. & Cross, M.L. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *The British journal of nutrition* **84 Suppl 1**, S111-117 (2000).



196. Exposito, I.L. & Recio, I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International dairy journal* **16**, 1294-1305 (2006).
197. Hartmann, R. & Meisel, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology* **18**, 163-169 (2007).
198. Dei Piu, L. et al. Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. *Food chemistry* **155**, 199-206 (2014).
199. Correa, A.P. et al. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides* **61**, 48-55 (2014).
200. Fontoura, R. et al. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. *New biotechnology* **31**, 506-513 (2014).
201. Fakhfakh, N. et al. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process biochemistry* **46**, 1731-1737 (2011).
202. Bose, A., Pathan, S., Pathan, K. & Keharia, H. Keratinolytic Protease Production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B Using Feather Meal as Substrate and Application of Feather Hydrolysate as Organic Nitrogen Input for Agricultural Soil. *Waste and biomass valorization* **5**, 595-605 (2014).
203. Lafarga, T., Aluko, R.E., Rai, D.K., O'Connor, P. & Hayes, M. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food research international* **81**, 91-99 (2016).
204. Quiros, A., Hernandez-Ledesma, B., Ramos, M., Martin-Alvarez, P.J. & Recio, I. Short communication: Production of antihypertensive peptide HLPLP by enzymatic hydrolysis: optimization by response surface methodology. *Journal of dairy science* **95**, 4280-4285 (2012).
205. Coscueta, E.R. et al. Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. *Food chemistry* **198**, 36-44 (2016).
206. Osman, A., Goda, H.A., Abdel-Hamid, M., Badran, S.A. & Otte, J. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT - Food science and technology* **65**, 480-486 (2016).
207. Abeyrathne, E.D., Lee, H.Y., Jo, C., Suh, J.W. & Ahn, D.U. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. *Food chemistry* **192**, 107-113 (2016).
208. Yang, R. et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from *Chum Salmon (Oncorhynchus keta)* in mice. *Food chemistry* **113**, 464-470 (2009).

209. Kim, S. & Wijesekara, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of functional foods* **2**, 1-9 (2010).
210. Korhonen, H. & Pihlanto, A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International dairy journal* **16**, 945-960 (2006).
211. Pedroche, J. et al. Obtaining of Brassica carinata protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food research international* **40**, 931-938 (2007).
212. Agyei, D. & Danquah, M.K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology advances* **29**, 272-277 (2011).
213. Kuisienė, N. Molekulinė taksonomija. (Technologija, Kaunas, 2008).
214. Rosenberg, I.M. Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques, Vol. 2. (Birkhäuser, 2005).
215. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
216. Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Haddar, A., Kanoun, S. & Nasri, M. A novel serine metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather meal: biochemical and molecular characterization. *Applied biochemistry and biotechnology* **162**, 329-344 (2010).
217. Lin, H.H., Yin, L.J. & Jiang, S.T. Cloning, expression, and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**, 3506-3511 (2009).
218. Jain, R., Jain, A., Rawat, N., Nair, M. & Gumashta, R. Feather hydrolysate from *Streptomyces sampsonii* GS 1322: A potential low cost soil amendment. *Journal of bioscience and bioengineering* **121**, 672-677 (2016).
219. Morschheuser, L., Mukusch, S., Riedner, M., Seitz, H. & Rohn, S. High-performance thin-layer chromatography as a fast screening tool for phosphorylated peptides. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **1008**, 198-205 (2016).
220. Gurav, R.G. & Jadhav, J.P. Biodegradation of keratinous waste by *Chryseobacterium* sp. RBT isolated from soil contaminated with poultry waste. *Journal of basic microbiology* **53**, 128-135 (2013).
221. Studholme, D.J. Some (bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microbial biotechnology* **8**, 40-48 (2015).
222. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* **7**, 203-214 (2000).
223. Morgulis, A. et al. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* **24**, 1757-1764 (2008).
224. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**, 406-425 (1987).

225. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791 (1985).
226. Nei, M. & Kumar, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. (Oxford University Press, 2000).
227. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* (2015).
228. Vandamme, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* **60**, 407-438 (1996).
229. Thompson, C.C. et al. Microbial taxonomy in the post-genomic era: rebuilding from scratch? *Archives of microbiology* **197**, 359-370 (2015).
230. Williams, C.M., Richter, C.S., Mackenzie, J.M. & Shih, J.C. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and environmental microbiology* **56**, 1509-1515 (1990).
231. Son, H.J., Park, H.C., Kim, H.S. & Lee, C.Y. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. *Biotechnology letters* **30**, 461-465 (2008).
232. Asahi, M. et al. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *The Biochemical journal* **232**, 139-144 (1985).
233. Wang, S.L., Hsu, W.T., Liang, T.W., Yen, Y.H. & Wang, C.L. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. *Bioresource technology* **99**, 5679-5686 (2008).
234. Tiwary, E. & Gupta, R. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. *Bioresource technology* **101**, 6103-6110 (2010).
235. Hatta, E., Matsumoto, K. & Honda, Y. Bacillolysin, papain, and subtilisin improve the quality of gluten-free rice bread. *Journal of cereal science* **61**, 41-47 (2015).
236. Kohler, M. et al. Detection of the protease bacillolysin in doping-control urine samples. *Drug testing and analysis* **1**, 143-145 (2009).
237. Reese, M.G. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers & chemistry* **26**, 51-56 (2001).
238. Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* **8**, 785-786 (2011).
239. Tjalsma, H. et al. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **68**, 207-233 (2004).
240. Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* **40**, D343-350 (2012).

241. Geer, L.Y. et al. The NCBI BioSystems database. *Nucleic acids research* **38**, D492-496 (2010).
242. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research* **43**, D204-212 (2015).
243. Berman, H.M. et al. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature structural biology* **7 Suppl**, 957-959 (2000).
244. Marchler-Bauer, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research* **43**, D222-226 (2015).
245. Markaryan, A., Lee, J.D., Sirakova, T.D. & Kolattukudy, P.E. Specific inhibition of mature fungal serine proteinases and metalloproteinases by their propeptides. *Journal of bacteriology* **178**, 2211-2215 (1996).
246. Tang, B., Nirasawa, S., Kitaoka, M., Marie-Claire, C. & Hayashi, K. General function of N-terminal propeptide on assisting protein folding and inhibiting catalytic activity based on observations with a chimeric thermolysin-like protease. *Biochemical and biophysical research communications* **301**, 1093-1098 (2003).
247. Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in enzymology* **248**, 183-228 (1995).
248. Yeats, C., Rawlings, N.D. & Bateman, A. The PepSY domain: a regulator of peptidase activity in the microbial environment? *Trends in biochemical sciences* **29**, 169-172 (2004).
249. McIver, K.S., Kessler, E. & Ohman, D.E. Identification of residues in the *Pseudomonas aeruginosa* elastase propeptide required for chaperone and secretion activities. *Microbiology* **150**, 3969-3977 (2004).
250. Adekoya, O.A. & Sylte, I. The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. *Chemical biology & drug design* **73**, 7-16 (2009).
251. Casilag, F. et al. The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infection and immunity* **84**, 162-171 (2015).
252. Wei, G. et al. Identification of Pseudolysin (lasB) as an Aciduric Gluten-Degrading Enzyme with High Therapeutic Potential for Celiac Disease. *The American journal of gastroenterology* **110**, 899-908 (2015).
253. Coleman, J.E. Zinc enzymes. *Current opinion in chemical biology* **2**, 222-234 (1998).
254. Robert, X. & Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research* **42**, W320-324 (2014).
255. Lee, W.M. et al. Molecular identification and quantification of human rhinoviruses in respiratory samples. *Methods in molecular biology* **1221**, 25-38 (2015).
256. Procter, M., Wolf, B. & Mao, R. Forty-eight novel mutations causing biotinidase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* **117**, 369-372 (2016).

257. Korbie, D.J. & Mattick, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols* **3**, 1452-1456 (2008).
258. Quintana-Castro, R., Diaz, P., Valerio-Alfaro, G., Garcia, H.S. & Oliart-Ros, R. Gene cloning, expression, and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic lipase. *Molecular biotechnology* **42**, 75-83 (2009).
259. Shi, T., Zhang, L., Li, Z., Newton, I.P. & Zhang, Q. Expression, purification and renaturation of truncated human integrin beta1 from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* **107**, 13-19 (2015).
260. Singh, A., Upadhyay, V. & Panda, A.K. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *Methods in molecular biology* **1258**, 283-291 (2015).
261. Podoliankaite, M. et al. High-yield expression in *Escherichia coli*, purification and application of budding yeast K2 killer protein. *Molecular biotechnology* **56**, 644-652 (2014).
262. Okegawa, Y., Koshino, M., Okushima, T. & Motohashi, K. Application of preparative disk gel electrophoresis for antigen purification from inclusion bodies. *Protein expression and purification* **118**, 77-82 (2016).
263. Verlotta, A. & Trono, D. Expression, purification and refolding of active durum wheat (*Triticum durum* Desf.) secretory phospholipase A2 from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* **101**, 28-36 (2014).
264. Upadhyay, A.K., Murmu, A., Singh, A. & Panda, A.K. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PloS one* **7**, e33951 (2012).
265. Carrio, M.M. & Villaverde, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of biotechnology* **96**, 3-12 (2002).
266. Kim, Y.K., Bae, J.H., Oh, B.K., Lee, W.H. & Choi, J.W. Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process. *Bioresource technology* **82**, 157-164 (2002).
267. Kananen, A. et al. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. *International dairy journal* **10**, 691-697 (2000).
268. Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S. & Ravel, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS microbiology reviews* **29**, 303-329 (2005).
269. Whiteley, H.R. & Schnepf, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual review of microbiology* **40**, 549-576 (1986).
270. Liu, B. et al. Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its

- application in wool fiber processing. *World journal of microbiology & biotechnology* **29**, 825-832 (2013).
271. Radha, S. & Gunasekaran, P. Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. *Journal of applied microbiology* **103**, 1301-1310 (2007).
  272. Kojima, M. et al. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. *Extremophiles : life under extreme conditions* **10**, 229-235 (2006).
  273. Shivaji, S. et al. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **56**, 1465-1473 (2006).
  274. Priest, F.G., Goodfellow, M., Shute, L.A. & Berkeley, R.C.W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **37**, 69-71 (1987).
  275. Lateef, A., Adelere, I.A. & Gueguim-Kana, E.B. LAU 13: a new source of keratinase and its multi-functional biocatalytic applications. *Biotechnology, biotechnological equipment* **29**, 54-63 (2015).
  276. Yang, L. et al. Construction of a Rapid Feather-Degrading Bacterium by Overexpression of a Highly Efficient Alkaline Keratinase in Its Parent Strain *Bacillus amyloliquefaciens* K11. *Journal of agricultural and food chemistry* **64**, 78-84 (2016).
  277. Bose, A., Pathan, S., Pathak, K. & Keharia, H. Keratinolytic Protease Production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B Using Feather Meal as Substrate and Application of Feather Hydrolysate as Organic Nitrogen Input for Agricultural Soil. *Waste and biomass valorization* **5**, 595-605 (2014).
  278. Rai, S.K. & Mukherjee, A.K. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzziprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical engineering journal* **48**, 173-180 (2010).
  279. Sorci, L. et al. Characterization of bacterial NMN deamidase as a Ser/Lys hydrolase expands diversity of serine amidohydrolases. *FEBS letters* **588**, 1016-1023 (2014).
  280. Menyhard, D.K. et al. A self-compartmentalizing hexamer serine protease from *Pyrococcus horikoshii*: substrate selection achieved through multimerization. *The journal of biological chemistry* **288**, 17884-17894 (2013).
  281. Simon, G.M. & Cravatt, B.F. Activity-based proteomics of enzyme superfamilies: serine hydrolases as a case study. *The journal of biological chemistry* **285**, 11051-11055 (2010).

282. Stano, N.M. & Patel, S.S. T7 lysozyme represses T7 RNA polymerase transcription by destabilizing the open complex during initiation. *The Journal of biological chemistry* **279**, 16136-16143 (2004).
283. Studier, F.W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of molecular biology* **219**, 37-44 (1991).
284. Dubendorff, J.W. & Studier, F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of molecular biology* **219**, 45-59 (1991).
285. Zhang, X. & Studier, F.W. Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme. *Journal of molecular biology* **269**, 10-27 (1997).
286. Spehr, V., Frahm, D. & Meyer, T.F. Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. *Gene* **257**, 259-267 (2000).
287. Carson, M.J., Barondess, J. & Beckwith, J. The FtsQ protein of *Escherichia coli*: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *Journal of bacteriology* **173**, 2187-2195 (1991).
288. Dalbey, R.E. & Wickner, W. Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **260**, 15925-15931 (1985).
289. Guzman, L.M., Barondess, J.J. & Beckwith, J. FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **174**, 7716-7728 (1992).
290. Kuhn, A. & Wickner, W. Isolation of mutants in M13 coat protein that affect its synthesis, processing, and assembly into phage. *The Journal of biological chemistry* **260**, 15907-15913 (1985).
291. Russell, C.B., Stewart, R.C. & Dahlquist, F.W. Control of transducer methylation levels in *Escherichia coli*: investigation of components essential for modulation of methylation and demethylation reactions. *Journal of bacteriology* **171**, 3609-3618 (1989).
292. San Millan, J.L., Boyd, D., Dalbey, R., Wickner, W. & Beckwith, J. Use of phoA fusions to study the topology of the *Escherichia coli* inner membrane protein leader peptidase. *Journal of bacteriology* **171**, 5536-5541 (1989).
293. Yang, H. et al. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 23-29 (2014).
294. Vogl, T., Hartner, F.S. & Glieder, A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current opinion in biotechnology* **24**, 1094-1101 (2013).
295. Damborsky, J. & Brezovsky, J. Computational tools for designing and engineering enzymes. *Current opinion in chemical biology* **19**, 8-16 (2014).

296. Rajput, R., Tiwary, E., Sharma, R. & Gupta, R. Swapping of pro-sequences between keratinases of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus*: altered substrate specificity and thermostability. *Enzyme and microbial technology* **51**, 131-138 (2012).
297. Parashar, D. & Satyanarayana, T. A chimeric alpha-amylase engineered from *Bacillus acidicola* and *Geobacillus thermoleovorans* with improved thermostability and catalytic efficiency. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **43**, 473-484 (2016).
298. Telke, A.A. et al. Construction and characterization of chimeric cellulases with enhanced catalytic activity towards insoluble cellulosic substrates. *Bioresource technology* **112**, 10-17 (2012).
299. Chen, X., Zaro, J.L. & Shen, W.C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews* **65**, 1357-1369 (2013).
300. Costa, S., Almeida, A., Castro, A. & Domingues, L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology* **5**, 63 (2014).