



Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

Mikrobiologijos magistrantūros studijų programos

II kurso studentė

Skaistė JANČAUSKYTĖ

Magistro darbas

Proteoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų biosintezė

Darbo vadovas dr. Audrius Gegeckas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorija

Vilnius

2024

TURINYS

ĮVADAS	2
1. LITERATŪROS APŽVALGA	4
1.1 Fermentai – baltyminiai katalizatoriai	4
1.2 Proteazės – fermentai, pasižymintys proteoliziniu aktyvumu	4
1.3 Keratinazės – keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai.....	5
1.4 Keratinazes sintetinantys mikroorganizmai	6
1.5 Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų sinergija	8
1.6 Keratinas – keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų substratas.....	8
1.7 Keratino degradacijos mechanizmas.....	10
1.8 Faktoriai aktyvuojantys ir slopinantys keratinazių veikimą	12
1.9 Keratinolizinį aktyvumą turinčių fermentų heterologinė raiška	13
1.10 Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų pritaikymas.....	15
1.10.1 Keratinazių pritaikymas tekstilės pramonėje	16
1.10.2 Keratinazių pritaikymas odos apdorojime	16
1.10.3 Keratinazių pritaikymas ploviklių gamyboje	17
1.10.4 Keratinazių pritaikymas prionų eliminacijoje	17
1.10.5 Keratinazių pritaikymas atliekų tvarkyme	18
1.10.6 Keratinazių pritaikymas farmacijoje.....	18
1.10.7 Keratinazių pritaikymas kosmetikoje	18
1.11 Hidrolizatai – biologiniu aktyvumu pasižymintys peptidai.....	19
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	20
2. 1 Naudotos medžiagos, prietaisai, bakterijų kamienai ir terpės	20
2.1.1 Darbe naudotos medžiagos	20
2.1.2 Darbe naudoti prietaisai	20
2.1.3 Darbe naudoti bakterijų kamienai	21
2.1.4 Darbe naudoti vektoriai.....	21

2.1.5 Darbe naudoti pradmenys	21
2.1.6 Darbe naudotos terpės bakterijų kultivavimui	22
2.2 Mitybinių terpių ruošimas	23
2.3 Genominės DNR skyrimas	23
2.4 DNR elektroforezė agaroziniame gelyje	23
2.5 Keratinolizinių fermentų genų pagausinimas PGR metodu	23
2.6 Tikslinių genų klonavimas į pJET1.2/blunt vektorių.....	24
2.7 Chemiškai kompetentinių ląstelių ruošimas	24
2.8 Cheminė ląstelių transformacija	25
2.9 Teigiamų transformantų atranka	25
2.10 Plazmidinės DNR skyrimas.....	25
2.11 Restrikcinė analizė	25
2.12 Ligavimas į raiškos vektorius	26
2.13 Kolonijų PGR	26
2.14 Rekombinantinių baltymų sintezė.....	26
2.15 Glicininė baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis.....	27
2.16 Zimografija – aktyvumo gelyje nustatymas	27
2.17 Tirpių ir netirpių baltymų frakcijų atskyrimas.....	27
2.18 Rekombinantinių baltymų gryninimas	28
2.19 Rekombinantinių baltymų dializė	28
2.20 Fermento aktyvumo įvertinimas agarozės šulinėlių metodu	29
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
3.1 Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčio mikroorganizmo genomo analizė.....	30
3.1.1 Į CtpA panaši serino proteazė	31
3.1.2 Maža ekstraląstelinė neutrali proteazė.....	32
3.1.3 Aminopeptidazė N.....	32
3.1.4 Ekstraląstelinė peptidazė.....	33
3.1.5 Į tripsiną panaši proteazė	35

3.1.6 Pre-pro-metalo proteazė PrtV.....	36
3.2 Hipotetinių keratinolizinių fermentų genų klonavimas.....	37
3.3 Hipotetinių keratinolizinių aktyvumą turinčių fermentų sintezė	45
3.4 Tirpių ir netirpių <i>E. coli</i> baltymų frakcijų atskyrimas.....	50
3.5 Tikslinių baltymų gryninimas.....	51
3.6 Rekombinantinių fermentų aktyvumo atstatymas	51
IŠVADOS	54
SANTRAUKA	55
SUMMARY	56
LITERATŪROS SĄRAŠAS	57
FINANSINĖ PARAMA	69
PADĖKA.....	70

SANTRUMPOS

APS – amonio persulfatas;

BLASTp – aminorūgščių sekų palyginių paieškos programa (angl. *Nucleotide BLAST*);

DFP – diizopropilfluorofosfatas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

FMSF – fenilmetansulfonilfluoridas;

LB – mitybinis lizogeninis bulijonas (angl. *lysogeny broth*), turintis Lennox, Burtani ir Luria variacijas.

MWCO – molekulinės masės riba (angl. *Molecular weight cut-off*);

NCBI – JAV nacionalinis biotechnologinės informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*);

NDS – natrio dodecilsulfatas;

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

PrP^{Sc} – prioninis baltymas;

TAE – Tris-Acetatinis-EDTA buferinis tirpalas;

TEMED – tetrametiletildiaminas;

TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis.

IVADAS

Keratinas – tai netirpus fibrilinis baltymas, kurio tvirta struktūra padaro jį sunkiai skaidomu substratu plačiai paplitusiems proteoliziniams fermentams (Nnolim, Udenigwe ir kiti, 2020). Keratinazės priklauso proteazių klasės fermentams, kurie gali skaidyti keratino turinčius substratus, tokius kaip plunksnos, nagai, ragai, vilna ir kitos panašios struktūros, kurios nuolat kaupiasi gamtoje (Q. Li, 2021). Šie fermentai yra laikomi labai vertingais daugelyje biotechnologinių procesų ne tik dėl to, jog geba skaidyti sudėtingos struktūros substratus, bet ir dėl didelio stabilumo ekstremaliomis sąlygomis, nes pasižymi plačiu temperatūros bei pH diapazonu. Keratininių atliekų kaupimasis gamtoje yra opi taršos problema. Kadangi šių atliekų deginimas reikalauja didelių išlaidų, šios atliekos dažniausiai būna laikomos sąvartynuose, o tai sukelia įvairias ekologines ir sanitarines problemas, kurios gali neigiamai paveikti ekosistemas ir kelti didelį pavojų žmonių ir gyvulių sveikatai. Dėl šios priežasties yra reikalingi atliekų šalinimo būdai, kurie būtų saugūs, ekonomiškai pagrįsti ir nepavojingi aplinkai (Abdel-fattah ir kiti, 2015). Mikroorganizmų sintetinės keratinazės geba keratino turinčias atliekas paversti į pridėtinės vertės produktus, tokius kaip bioaktyvūs peptidai (Q. Li, 2021). Šie mažos molekulinės masės hidrolizės produktai gali veikti kaip daugelio fiziologinių procesų ir endokrininės, imuninės, kraujotakos, nervų ir virškinimo sistemų reguliatoriai. Daugelis bioaktyvių peptidų gali turėti antioksidacinį, priešvėžinį, priešuždegiminį ir antimikrobinį poveikius (Białkowska ir kiti, 2017; Zaky ir kiti, 2022). Keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai gali būti naudojami ne tik siekiant sumažinti aplinkos taršą, skaidant keratino turinčius substratus, tačiau ir panaudojant farmacijos, medicinos, kosmetikos, tekstilės, žemės ūkio pramonėje. Literatūroje yra pabrėžiamas cheminių medžiagų pakeitimas keratinazėmis, nes, lyginant su chemikalais, fermentai yra ekologiški, biologiškai skaidūs, negamina kenksmingų šalutinių produktų ir demonstruoja labai efektyvius rezultatus (Ul Haq ir Akram, 2019).

Nepaisant tam tikros pažangos, padarytos atliekant struktūrinius keratinazių tyrimus ir biocheminį šių fermentų charakterizavimą, tyrimai siekiantys detaliau iširti keratinazes, vis dar yra reikalingi (Q. Li, 2021). Dėl didėjančios keratinazių paklausos pramonėje, daugumos tyrimų dėmesys skiriamas fermentų gamybos pagerinimui. Keratinazių biosintezė naudojant heterologines sistemas yra perspektyvus įrankis pasiekti šį tikslą, nes gaunamas didesnis keratinazių kiekis, lyginant su natūraliais šeimininkais. Šis metodas duoda pagrindą genetinėms manipuliacijoms, baltymų inžinerijai ir didelio masto fermentų gamybai (Nnolim, Udenigwe ir kiti, 2020).

Šio darbo metu buvo atlikti *Streptomyces* sp. SK-91 kamieno, galimai keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų, heterologinės sintezės tyrimai. Šie eksperimentai praplečia keratinazių panaudojimo galimybes įvairiose srityse ir skatina biotechnologinių tyrimų plėtrą.

Darbo tikslas:

Sukurti ir optimizuoti keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų heterologinę biosintezės sistemą.

Darbo uždaviniai:

- 1) Atlikti atrinkto mikroorganizmo genominę analizę ir nustatyti hipotetinius keratinazes koduojančius genus.
- 2) Sukurti atrinktų genų konstruktus, tinkamus heterologinei raiškai.
- 3) Parinkti tinkamą *Escherichia coli* kamieną tikslinio baltymo sintezei.
- 4) Nustatyti optimalią induktoriaus koncentraciją.
- 5) Nustatyti optimalią indukcijos trukmę.
- 6) Išgryninti tikslius baltymus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

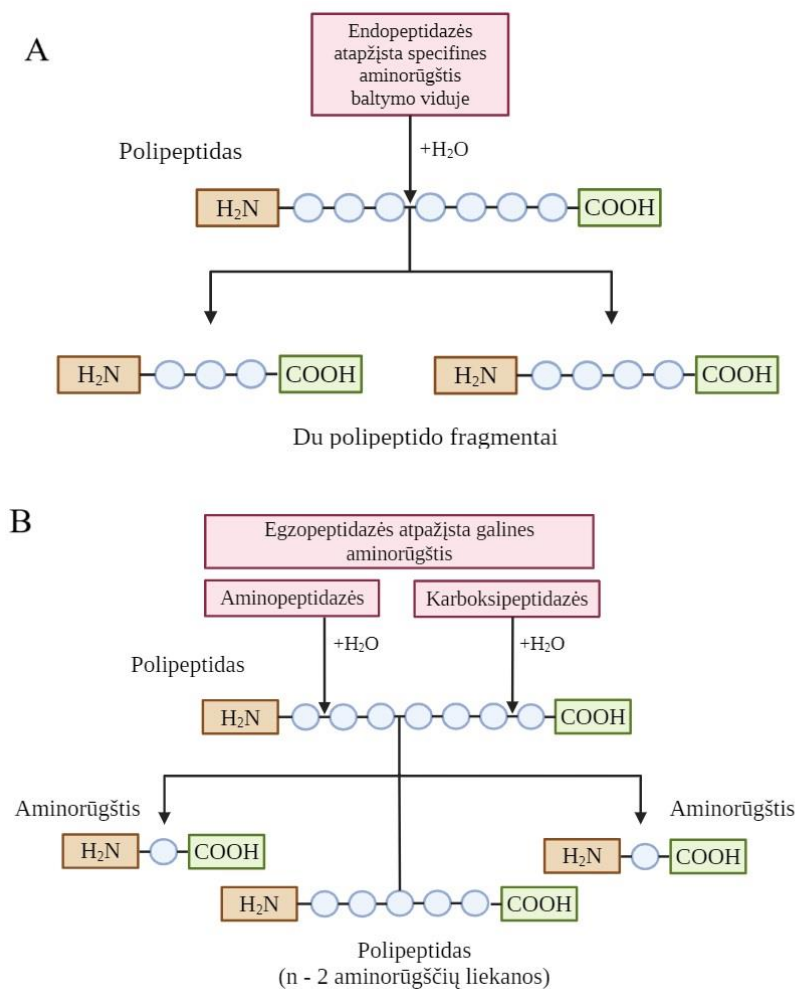
1.1 Fermentai – baltyminiai katalizatoriai

Fermentai yra specializuoti baltymai, kurie veikia kaip katalizatoriai, palengvinantys chemines reakcijas, sudarydami arba skaidydami molekules visuose gyvuose organizmuose (Shakilanishi ir Shanthi, 2024). Šie biokatalizatoriai paprastai greitina vieną arba glaudžiai susijusių biocheminių reakcijų grupę (Bhatia, 2018). Jie gali būti išgaunami iš ląstelių ir naudojami katalizuoti įvairius komerciškai svarbius procesus, todėl yra plačiai naudojami maisto, gėrimų, medicinos, tekstilės, odos, detergentų bei kitose pramonės šakose (Robinson, 2015). Pagrindinis fermentų šaltinis yra mikroorganizmai, nes jie per trumpą laiką gali būti užauginami dideliais kiekiais, kultyvavimo terpės yra pigios, o siekiant paskatinti fermentų gamybą yra galimybė atlikti genetines manipuliacijas su mikroorganizmų ląstelėmis. Be to, dėl didesnio aktyvumo ir stabilumo, mikrobiniams fermentams buvo skiriama daugiau dėmesio nei augaliniams ar gyvūniniams (Anbu ir kiti, 2017).

1.2 Proteazės – fermentai, pasižymintys proteoliziniu aktyvumu

Proteazės (EC 3.4) – tai fermentai, priklausantys fermentų hidrolazių klasei (EC 3) ir skeliantys peptidines jungtis, esančias aminorūgščių polipeptidinėje grandinėje. Ekonominiu požiūriu naujų proteazių tyrimai nuolat auga, nes jos sudaro 60 % visų pasaulyje parduodamų fermentų. Šiuo metu proteazių pramoninis pritaikymas apima daugybę pramonės šakų, pavyzdžiui, odos, ploviklių, maisto technologijų ir farmacijos gamybą (David Troncoso ir kiti, 2022). Proteazių grupę sudaro fermentų konsorciumas, apimantis proteinazes, peptidazes ir amidazes. Proteinazės dalyvauja visos baltymo molekulės hidrolizėje, išskirdamos peptidus ir aminorūgštis. Peptidazės sukelia peptidų hidrolizę ir išskiria aminorūgštis, o amidazės katalizuoja aminorūgščių hidrolizę ir išskiria amoniaką (Naveed ir kiti, 2021; Razzaq ir kiti, 2019).

Remiantis fermento kataliziniu mechanizmu ir aminorūgščių liekana (-omis) fermento aktyviajame centre, proteazės gali būti suskirstytos į tam tikras grupes: cisteino, serino, treonino, aspartato ir glutamato. Taip pat išskirta atskira peptidazių klasė, kuri katalizei naudoja metalų jonus. Šios peptidazės vadinamos metaloproteazėmis (Ozhelvaci ir Steczkiewicz, 2023). Pagal atpažįstamą molekulės-substrato specifinę vietą, proteazės dar yra skirstomos į endopeptidazes ir egzopeptidazes. (1.1 pav.)



1.1 pav. Endopeptidazių (A) veikimas, skeliant polipeptidą ir egzopeptidazių (B) veikimas, pašalinantis galines aminorūgščių liekanas nuo polipeptido, turinčio n liekanų. Rodyklės nurodo peptidinių jungčių skėlimo vietą. Sudaryta pagal Idowu ir kiti, 2021.

Endopeptidazės atpažįsta specifines aminorūgštis baltymo viduryje, o egzopeptidazės atpažįsta vieną ar dvi galines aminorūgštis. Egzopeptidazės, kurios skelia peptidus iš N galo (pašalinamos atskiros aminorūgštys arba dipeptidas), vadinamos (dipeptidil) aminopeptidazėmis, o peptidazės, skeliančios C galą, vadinamos karboksipeptidazėmis (Van Der Velden, Hulsmann, 1999).

1.3 Keratinazės – keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai

Keratinazės (EC 3.4.4.25) yra proteolizinių aktyvumą turintys fermentai, galintys hidrolizuoti keratino turinčius substratus, paversdami juos aukštos pridėtinės vertės produktais, tokiais kaip aminorūgštys ar bioaktyvūs peptidai. Unikali savybė, išskirianti keratinazes nuo kitų proteazių, yra gebėjimas prisijungti prie tvirtų ir netirpių substratų (plunksnų, vilnos, šilko, kolageno, elastino, ragų, raginio sluoksnio, plaukų, azokeratino ir nagų) (R. Gupta ir Ramnani, 2006).

Siekiant pritaikyti keratinazes pramonėje, labai svarbu žinoti šių fermentų biochemines savybes. Daugelis keratinazių yra aktyviausios 7–9 pH diapazone (Abdel-Fattah ir kiti, 2018; Barman ir kiti, 2017; Kim, 2007), tačiau kai kurios keratinazės, kaip pavyzdžiui, fermentas iš *Streptomyces*

aureofaciens optimaliai veikia esant pH 12, o keratinazė iš *Bacillus halodurans* net pH 13 (Gong ir kiti, 2015; Takami ir kiti, 1999).

Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų temperatūros diapazonas taip pat yra labai platus. Tyrimai rodo, jog keratinazė iš *Bacillus* sp. Nnolim-K1 kamieno optimaliai veikia 25 °C temperatūroje, o *Fervidobacterium islandicum* AW-1 fermento optimali temperatūra siekia net 100 °C (Nam ir kiti, 2002; Nnolim, Mpaka ir kiti, 2020), tačiau dauguma keratinazių geriausiai veikia 37–65 °C temperatūroje (Barman ir kiti, 2017; Hassan ir kiti, 2020; J. J. Wang ir Shih, 1999; W. L. Wu ir kiti, 2017).

Dažniausiai keratinazės būna monomerinės, tačiau yra aprašyta ir multimerinių keratinazių (Xie ir kiti, 2010). Šie fermentai pasižymi labai įvairia molekuline mase. Keratinazės iš *Bacillus subtilis* 1273 kamieno molekulinė masė siekia vos 13 kDa, o *Bacillus* sp. A5.3 kamieno sintetinama keratinazė yra ~ 250 kDa dydžio (Aktayeva ir kiti, 2022; Mazotto ir kiti, 2011). Patogeninių grybų, pavyzdžiui *Trichophyton mentagrophytes* keratinazė siekia net 440 kDa dydį (R. Gupta ir Ramnani, 2006). Didesnė fermento molekulinė masė siejama su termofiliniais mikroorganizmais (Brandelli ir kiti, 2010). Nors fermento molekulinės masės ribos yra plačios, tačiau dauguma fermentų yra 30–40 kDa dydžio (Nnolim, Udenigwe ir kiti, 2020; Samuel ir kiti, 2018; Batool ir kiti, 2021; Uttangi ir Aruna, 2018).

Proteazės, pasižyminčios gebėjimu skaidyti keratino turinčius substratus, priklauso serino, metalo arba serino-metalo proteazių klasei. Serino proteazės naudoja Ser / His / Asp katalizinę triadą, kur serinas veikia kaip nukleofilinė aminorūgštis fermento aktyviajame centre ir yra svarbus skeliant peptidinius ryšius. Viena iš serino proteazių skiriamųjų savybių yra katalizinio mechanizmo slopinimas DFF arba FMSF (Ekici ir kiti, 2008; Riffel ir kiti, 2003). Metaloproteazės yra fermentų klasė, kuri naudoja su baltymu susietą (-us) metalo joną (-us) ir vandens molekulę, kad katalizuotų vandens prijungimą prie peptidinės jungties. Dažniausiai naudojamas Zn^{2+} , o kartais ir Co^{2+} arba Mn^{2+} . Priklausomai nuo katalizei reikalingo metalo jonų skaičiaus, metaloproteazės galima suskirstyti į dvi grupes: pirmajai grupei reikalingi du metalo jonai, o antrajai grupei užtenka tik vieno (Supuran ir kiti, 2002). Metalo proteazės išsiskiria tuo, jog šiai klasei priklausančias keratinazes slopina EDTA (Riffel ir kiti, 2003). Serino-metalo proteazių klasei priskiriamos keratinazės, kurios yra slopinamos tiek EDTA, tiek FMSF (Riffel ir kiti, 2003).

1.4 Keratinazes sintetinantys mikroorganizmai

Keratinolizinių aktyvumą turintys fermentai yra sintetinami visų trijų gyvybės domenų atstovų: eukariotų, bakterijų bei archėjų, kurie geba keratiną panaudoti kaip anglies bei azoto šaltinį (Vidmar ir Vodovnik, 2018). Nors eukariotų domenui priklausančios grybai naudodamiesi hifais gali lengviau kolonizuoti tvirtos struktūros keratiną, dėl didesnio bakterijų augimo greičio šie prokariotiniai

mikroorganizmai įprastai yra pasirenkami naudoti pramonėje (Gopinath ir kiti, 2015). Gebėjimas skaidyti keratiną dažniau pastebimas tarp gramteigiamų nei tarp gramneigiamų bakterijų (R. Gupta ir Ramnani, 2006). Literatūroje aprašytas keratinazių gamybos potencialas tokiose bakterijų gentyse kaip: *Bacillus*, *Vibrio*, *Chryseobacterium*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Fervidobacterium*, *Microbacterium*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Geobacillus*, *Amycolatopsis*, *Meeniobacterium*, *Meeniobacillus* (Williams ir kiti, 1990; Friedrich ir Antranikian, 1996; Sangali ir Brandelli, 2000; Riffel ir Brandelli, 2006; Yamamura ir kiti, 2002; Bach ir kiti, 2011; Fang ir kiti, 2013; Kuo ir kiti, 2012; Jaouadi ir kiti, 2013; Paul ir kiti, 2014; Stiborova ir kiti, 2016; Alahyaribeik ir kiti, 2020; Falco ir kiti, 2019; Nnolim, Okoh ir kiti, 2020; Abdel-Fattah ir kiti, 2018). Vis dėlto, dažniausiai pasitaikantys keratiną skaidantys mikroorganizmai priklauso *Bacillus* genčiai: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Bacillus cereus* ir *Bacillus pumilus* rūšims (Mamangkey ir kiti, 2019). Šios gramteigiamos bakterijos pasižymi įvairiomis fiziologinėmis savybėmis, leidžiančiomis joms gyventi įvairiomis aplinkos sąlygomis. Literatūroje aprašytos keratiną degraduojančios bakterijų gentys, išskirtos iš dirvožemio, sąvartynų, paukštynų, geoterminių vandens telkinių, netgi iš Amazonės upės žuvų žarnyno (Almahasheer ir kiti, 2022; Cavello ir kiti, 2020; Daroit ir kiti, 2009; Nnolim, Okoh ir kiti, 2020; Sivakumar ir Raveendran, 2015).

Vieni žymiausių keratinolizinių aktinomicetų priklauso *Streptomyces* genčiai. Nemažai tyrimų rodo, jog aktinobakterijos gali gaminti termiškai stabilias keratinazes, turinčias didelį potencialą panaudojimui pramonėje (Nnolim ir Nwodo, 2021). *Streptomyces* keratinazės veikia netirpius keratino substratus ir gali veikti įvairios kilmės baltyminius substratus. Šie fermentai naudojami plaukų šalinimo procesams odos pramonėje (Allure ir kiti, 2015). Aprašytas *Streptomyces* sp. SCUT-3 kamienas gali efektyviai skaidyti plunksnas iki produktų, kuriuose yra daug aminorūgščių, kurios yra gyvūnų, augalų ir mikroorganizmų mitybos šaltinis (Z. W. Li ir kiti, 2020; Abdelmoteleb ir kiti, 2023).

Keratinofiliniai grybai gali naudoti keratiną kaip vienintelį anglies, azoto ir sieros šaltinį. Grybai, pasižymintys gebėjimu skaidyti keratiną, dažniausiai priklauso *Aspergillus*, *Penicillium* ir *Fusarium* gentims (Kannahi ir Ancy, 2012; Nwadiaro ir kiti, 2015; Falco ir kiti, 2019). Literatūroje aprašyta, kad tokie grybai kaip *Chrysosporium* (Gurung ir kiti, 2018) ir *Trichophyton* (M. Zhang ir kiti, 2019) taip pat gali skaidyti keratino turinčius substratus. Nustatyta, jog kai kurie patogeniniai grybai sintetina keratinazes, kurios yra svarbios patogeno invazijai, suardant barjerą tarp audinio ir aplinkos (Q. Li, 2021). Nuo žmonių galvos plaukų izoliuota *Aspergillus stelliformis* keratinazė pasižymi ypač dideliu aktyvumu degraduojant keratininius substratus, todėl yra tiriamas šių grybų pritaikymas keratininių atliekų tvarkyme, paukštininkystės pramonėje (Alwakeel ir kiti, 2021). Aplinkosaugai svarbius biotechnologinius procesus galima atlikti naudojant *Fusarium oxysporum* grybus, kurie rodo didelį aktyvumą skaidant kiaulių plaukus (Preczeski ir kiti, 2020). Grybelis

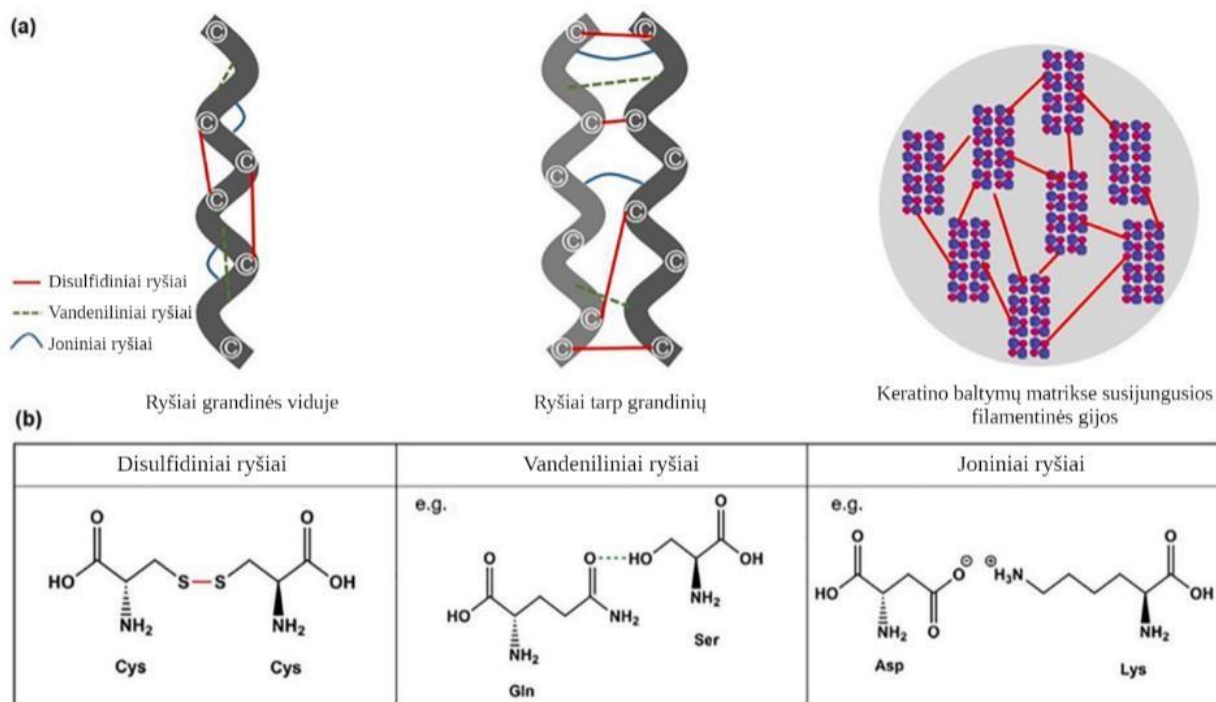
Chrysosporium tropicum, izoliuotas nuo Egipte esančio paukštyno vištų plunksnų yra laikomas galingu keratinazes sintetinančiu mikroorganizmu ir pasižymi charakteristikomis, kurios leidžia keratino atliekas paversti gyvulių pašarų papildais arba veiksmingomis dirvožemio trąšomis (Koutb ir kiti, 2023).

1.5 Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų sinergija

Su atskirais kamienais buvo pasiekta didelių laimėjimų biotechnologijų ir pramonės srityse, tačiau dabar didelis dėmesys skiriamas mikroorganizmų konsorciūmų naudojimui, atsižvelgiant į jų funkcinį stabilumą ir efektyvumą (D. Kang ir kiti, 2020). Hidrolizuota plunksnų biomasė, gauta naudojant keratinolizinių fermentų mišinį iš keratinolizinių bakterijų konsorciūmo, žymiai padidino avinžirnių sėklų daigumą, palyginti su bandomąja kontrole (Jadhav ir Pathade, 2019). Taip pat atlikti tyrimai rodo, jog mikroorganizmų konsorciūmas KMCG6, kuriame daugiausia buvo *Bacteroidetes* ir *Proteobacteria* atstovų, pasižymėjo efektyvesniu keratinoliziniu aktyvumu. Bakterijos, veikdamos sinergiškai, suskaidė 25 % daugiau substrato (D. Kang ir kiti, 2018). Mikroorganizmų konsorciūmų surinkimas iš įvairių aplinkos bendruomenių vis dar nėra paprasta užduotis dėl didelės įvairovės ir biotinių sąveikų poveikio (D. Kang ir kiti, 2020).

1.6 Keratinas – keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų substratas

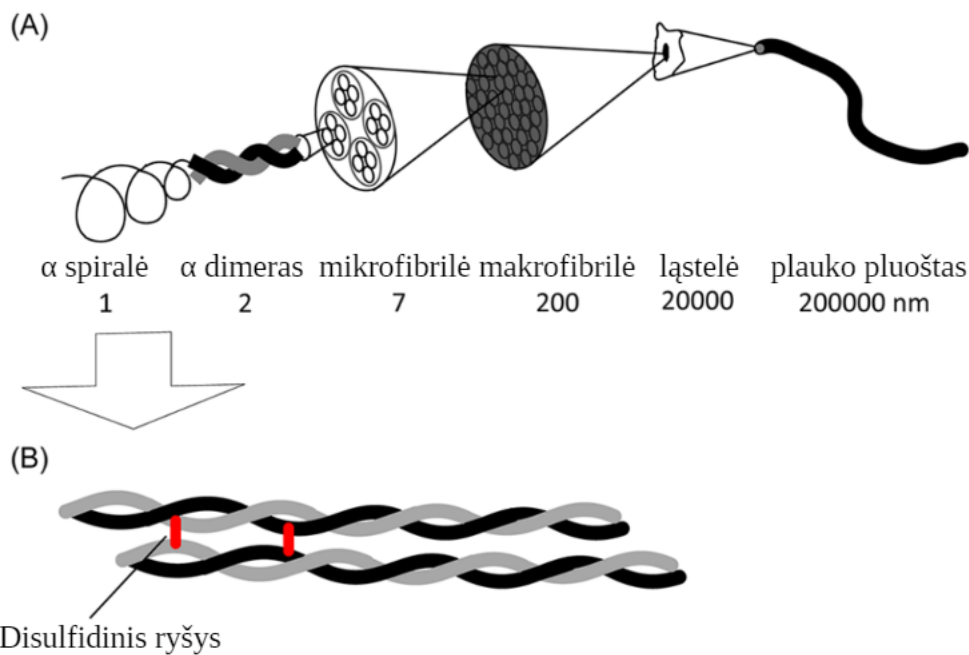
Keratinas – pagrindinė plunksnų, nagų, plaukų, vilnos, kanopų, žvynų (kietų keratinų) ir raginio sluoksnio (minkštojo keratino) sudedamoji dalis. Šis baltymas yra itin stabilus, skaidulinis ir netirpus skleroproteinas (Devi ir kiti, 2022). Keratino stabilumą, atsparumą ir netirpumą lemia tvirta tinklo struktūra, kurią sudaro daugybė stiprių kovalentinių disulfidinių ryšių tarp tiolio (-SH) grupių, esančių cisteino liekanose, keratino polipeptiduose ir tarp jų (Callegaro ir kiti, 2019). Struktūrinį stabilumą taip pat palaiko grandinių viduje esantys bei skirtingas grandines jungiantys vandeniliniai ir joniniai ryšiai (1.2 pav.). Daugiapakopė struktūra ir didelis kryžminių jungčių skaičius lemia didelį atsparumą mechaniniams, cheminiams ir fiziniams veiksniams. Keratinas yra skirstomas pagal antrinę struktūrą (α spiralės ir β struktūros), sieros kiekį (minkštas keratinas, turintis 1 % sieros ir kietas keratinas, turintis 5 % sieros) (Karthikeyan ir kiti, 2007), aminorūgščių sudėtį (šarminis, rūgštinis arba neutralus), molekulinę masę ir kilmės šaltinį (Sypka ir kiti, 2021).



1.2 pav. Keratino struktūroje esantys ryšiai. a) grandinės viduje esantys ryšiai, ryšiai tarp grandinių ir filamentinės gijos, jungiančios keratino baltymų matricą; b) Disulfidinių ryšių (cisteino-cisteino), vandenilinių ryšių (pvz., glutamino-serino) ir joninių ryšių (pvz., aspartato-lizino) susidarymas baltymuose (Qiu ir kiti, 2020).

α -keratinas yra randamas žinduoliuose ir yra pagrindinė vilnos, plaukų, nagų, kanopų, ragų ir raginio sluoksnio (išorinio sluoksnio) sudedamoji dalis. β -keratinas yra pagrindinė paukščių ir roplių audinių, tokių kaip paukščių plunksnos, nagai ir snapai, roplių žvynai ir nagai, sudedamoji dalis. *Pholidota* eilės atstovai – žinduoliai, turintys ir α , ir β keratino (B. Wang ir kiti, 2016). α -keratiną nuo β -keratino skiria filamentinių gijų tinklo formavimas.

Nustatyta, kad α -keratino baltymai turi hierarchinę struktūrą (1.3 pav.), pradedant nuo dimero, sudaryto iš dviejų spirališkai susuktų polipeptidų grandinių, kurias stabilizuoja vandeniliniai ryšiai spiralės viduje (Pauling ir kiti, 1951). Tuomet 16 tokių dimerų sudaro mikrofibrilę, kuri susijungusi su matricos baltymais tampa makrofibrile, kurios jungiasi į ląsteles ir galiausiai turimas pilnas plauko pluoštas. Tyrimai rodo, kad disulfidiniai ryšiai, susidarę tarp dimerų, atlieka svarbų vaidmenį apibrėžiant šio baltymo stabilumą ir lemia mechanines savybes. Siera turtinga amorfinė keratino matrica susideda iš baltymų grandinių, kuriose yra daug cisteino arba glicino, tirozino ir fenilalanino liekanų. Disulfidinė jungtis gali susidaryti tik tarp dviejų cisteino liekanų ir paprastai atsiranda oksiduojančioje aplinkoje (Fraser ir kiti, 1988; Chou ir Buehler, 2012).



1.3 pav. Žmogaus plauko struktūra. (A) Hierarchinė plauko sudėties schema (B) scheminė vizualizacija, parodanti, kaip du dimerai yra sujungti intramolekuliais disulfidiniais ryšiais (Chou ir Buehler, 2012).

B. Wang ir kiti (2016) nurodo, kad β -keratino struktūrinį vienetą sudaro šonu susijungusios β gijos, kurios gali būti išsidėsčiusios lygiagrečiai arba nelygiagrečiai (stabilus išsidėstymas), o grandinės laikomos kartu tarpmolekuliais vandeniliais ryšiais. β -keratino gija susiformuoja, kai polipeptidinės grandinės centrinė sritis susilanksto, kad susidarytų keturios šoninės β grandinės, kurios vėliau susijungia per vandenilinį ryšį, susisuka ir suformuoja iškreiptą β struktūrą. Dvi susijungusios β struktūros sudaro β keratino giją.

Keratinas taip pat skirstomas į I ir II tipo keratinus, kurie yra tarpinius siūlus formuojantys baltymai, sintetinami epitelio ląstelėse (Jacob ir kiti, 2018). I tipo baltymai paprastai būna mažesni (40–56,5 kDa) ir rūgštiniai (pI 4,5–6,0), o II tipo keratinai yra didesni (50–70 kDa) ir neutralūs bei šarminiai (pI 6,5–8,5) (Moll ir kiti, 1982).

1.7 Keratino degradacijos mechanizmas

Keratino skilimas yra sudėtingas procesas, kurio mechanizmas nėra iki galo išaiškintas. Tyrimai rodo, kad šių fibrilinių baltymų skaidymo procesas yra padalintas į du etapus – disulfidinių ryšių skilimą ir denatūruotų baltymų hidrolizę. Pirmasis keratino skaidymo žingsnis yra redukcinis disulfidinių ryšių skilimas, kuris atpalaiduoja keratino struktūrą, padidina jo tirpumą ir atidengia baltymo struktūrą proteazėms. Antrajame keratino skaidymo etape keratinazės vykdo denatūruoto keratino hidrolizę (Z. Wang ir kiti, 2023).

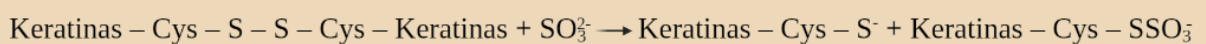
Kai kurios keratinazės, vadinamos tikrosiomis keratinazėmis, geba skaidyti substratą be papildomos pagalbos, tačiau dauguma fermentų priklauso nuo redukuojančių veiksnių, kurie padeda nutraukti disulfidinius ryšius (Navone ir Speight, 2018). Tai padaryti padeda mikroorganizmai, kurie

gamina disulfidinių jungčių reduktazes. Pavyzdžiui, *Stenotrophomonas* sp. D-1 kamienas izoliuotas nuo elnio kailio sintetino du ekstraląstelinius fermentus: serino proteazę ir disulfidinės jungties reduktazę. Šiems fermentams veikiant kartu keratino hidrolizės greitis padidėjo 50 kartų, palyginus su vienos pačios keratinazės veikimu (Yamamura ir kiti, 2002).

Nustatyta, jog ląstelės redokso reakcijos gali padėti suardyti disulfidinius ryšius keratine. Biologinio membranos potencialo teorija, dar vadinama ląstelių membranos paviršiaus redokso teorija, pabrėžia nepažeistų ląstelių ir ląstelių membranų buvimo svarbą, siekiant suardyti keratino disulfidinius ryšius. Mokslininkai teigia, kad ląstelių membranos potencialas vaidina esminį vaidmenį keratino skaidyme. Pavyzdžiui, nustatyta, jog *Streptomyces pactum* šviežios kultūros filtratas ir homogenatas turėjo mažą redukcinę galią, o gyvos ląstelės turėjo didelę disulfidinių jungčių redukavimo galią (Bo ir Mu, 1997). Biologinio membranos potencialo teorija remiasi gyvų ląstelių aktyvumu, siekiant sukurti neribotą redukcijos pajėgumą disulfidiniams ryšiams nutraukti.

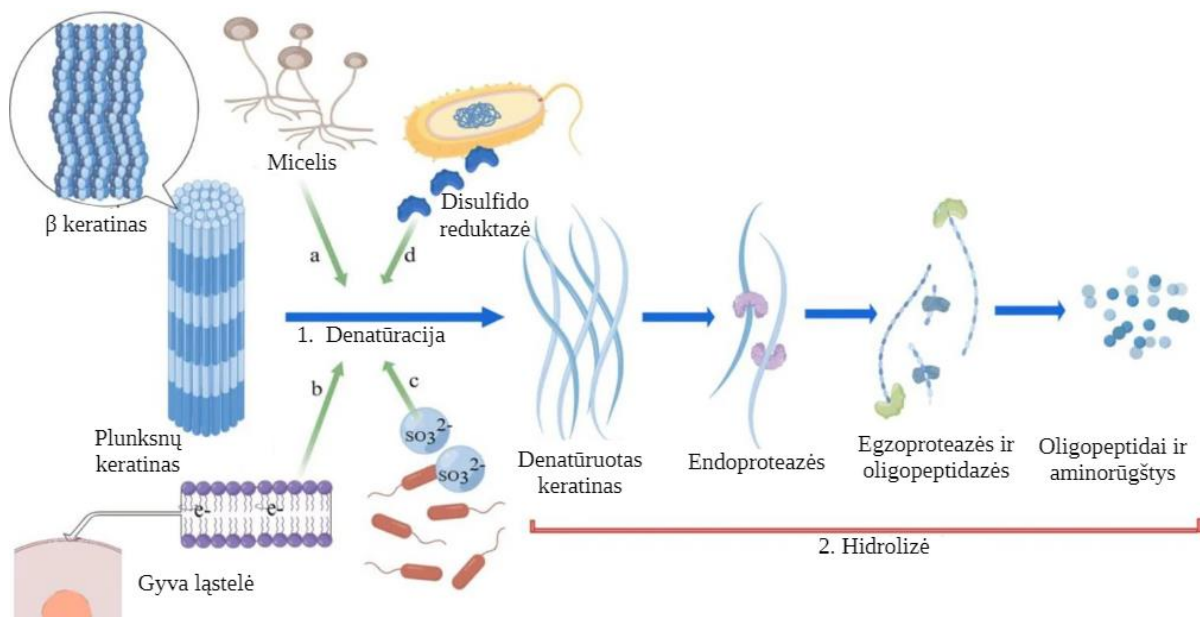
Taip pat yra žinoma, jog mechaninis spaudimas, kurį sukelia grybo micelis, prasiskverbiantis į keratino struktūrą, gali prisidėti prie šios struktūros suardymo, palengvindamas keratinazių patekimą į substratą (Martinez ir kiti, 2020). Nustatyta, kad *Chrysosporium* rūšių grybiene gali įsiskverbti į tankios keratino struktūros vidų (plauką) (Mitola ir kiti, 2003). Tokia savybė taikoma ir aktinomicetams. Literatūroje aprašytas *Streptomyces* SCUT-3 kamienas, kurio micelio ilgėjimas ir susiraizgymas skatino plunksnų degradaciją (Z. W. Li ir kiti, 2020). Gamtoje šie mechanizmai veikia sinergiškai su keratinazėmis ir pagreitina keratino skaidymą (Martinez ir kiti, 2020).

Mikroorganizmų, galinčių redukuoti disulfidus, išskiriami kofaktoriai (pvz., β-merkaptioetanolis, merkaptacetatas, ditiotreitolis arba sulfitas) vaidina lemiamą vaidmenį sulfitolizėje, mikroorganizmams skaidant keratiną. Disulfidiniai ryšiai yra suardomi sulfitu ir susidaro cisteino tiolis bei cisteino-S-sulfonato liekanos (1.4 pav.).



1.4. pav. Sulfitolizės proceso schema (Sinkiewicz ir kiti, 2017).

Nutrūkus keratino disulfidiniams ryšiams, pradeda veikti keratinolizinės endoproteazės. Šie fermentai suardo keratininį substratą iki mažesnių peptidų. Reakcijoje dalyvauja ir keratinolizinės egzoproteazės, kurios peptidines grandines skelia iš abiejų galų, o oligopeptidazės hidrolizuoja oligopeptidus, kad susidarytų atskiros aminorūgštys arba mažesni peptidai (1.5 pav.) (Qiu ir kiti, 2020a).



1.5 pav. Plunksnų keratino degradacijos mechanizmo schema. Keratino skilimo procesas yra padalintas į du etapus: denatūraciją ir hidrolizę. Keratino denatūravimo procesas gali vykti dėl a) mechaninio spaudimo b) biologinio membranų potencialo teorijos c) tiolizės d) disulfidų reduktazių poveikio (Z. Wang ir kiti, 2023).

Tyrimai rodo, jog neapdorota mikroorganizmų kultūra pasižymi didesniu keratino skaidymo efektyvumu nei išgrynintos keratinazės (Q. Li, 2021). Fermentų mišinys veikia sinergiškai ir greičiau hidrolizuoja substratą. Analizuojant literatūros šaltinius galima rasti daug mokslinių šaltinių, kuriuose yra charakterizuojamos keratinazės, tačiau molekulinis mikrobinės keratinolizės mechanizmas dar nėra iki galo išaiškintas.

1.8 Faktoriai aktyvuojantys ir slopinantys keratinazių veikimą

Tyrimai rodo, jog keratinolizinių fermentų aktyvumui įtakos turi įvairūs katijonai. Nustatyta, kad 5 mM divalenčių metalų jonų, tokių kaip Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ir Ca^{2+} , Mg^{2+} ir Mn^{2+} didina *Bacillus amyloliquefaciens* S13 keratinazių aktyvumą, tačiau tokie metalų jonai kaip Ni^{2+} , Cd^{2+} ir Hg^{2+} fermentinį aktyvumą slopina (Hamiche ir kiti, 2019). *Bacillus polyfermenticus* B4 kamieno keratinazių aktyvumą skatina Fe^{2+} ir Mn^{2+} , o slopina Zn^{2+} ir Ni^{2+} (Dong ir kiti, 2017). Yra ir keratinazių, kurias slopina dauguma metalų jonų. Pavyzdžiui, keratinazė iš *Bacillus* sp. CSK2 kamieno, buvo slopinama tokių metalų jonų kaip Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , Li^+ , Hg^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , o didesnis poveikis buvo pastebėtas esant trivalenčių metalų jonams Al^{3+} ir Fe^{3+} (Nnolim ir Nwodo, 2020).

Analizuojant literatūrą, galima daryti išvadą, kad keratinazės yra slopinamos arba aktyvuojamos, kai yra veikiamos nejoninių ploviklių ir tirpiklių. Šios medžiagos turi didelę įtaką baltymų struktūrai (R. Gupta ir Ramnani, 2006). *S. aureofaciens* mutantinio varianto keratinazė pasižymėjo sumažėjusiu stabilumu, kai buvo veikiamas karbamiidu ir NDS, aktyvumas sumažėjo beveik 80 %. Nepaisant to, kito šio mikroorganizmo mutantinio varianto keratinazė toleravo NDS ir

karbamidą ir netgi pasižymėjo didesniu aktyvumu, veikiant fermentus šiomis medžiagomis (Fang ir kiti, 2016). Kiti tyrimai rodo, jog keratinazė iš *B. subtilis* kamieno tapo efektyvesne, kai buvo veikiami NDS, EDTA ar DMSO (Cai ir kiti, 2008). Mokslininkai nustatė, kad tokie detergentai, kaip Tween-20, Tween-80 ar Triton X-100 turi teigiamos įtakos efektyvesnei keratino hidrolizei (Bhari ir kiti, 2019; Gong ir kiti, 2015). Taip pat yra atlikta tyrimų, kurių metu buvo išsiaiškinta, jog šios medžiagos gali ir slopinti keratinolizinių fermentų aktyvumą. *B. polyfermenticus* B4 kamieno keratinazių aktyvumą slopino tokios medžiagos kaip EDTA, FMSF ir β -merkaptoetanolis (Dong ir kiti, 2017).

Tyrimai rodo, jog angliavandeniai, tokie kaip gliukozė, laktozė ar krakmolas gali veikti keratinolizinių fermentų gamybą. Nors šios medžiagos gali slopinti kai kurių keratinazių gamybą (e Silva ir kiti, 2014), yra aprašyta atvejų, kai gliukozė stimuliuoja *Bacillus pumilis*, o sacharozė stimuliuoja *B. subtilis* kamieną KD-N2 (Cai ir kiti, 2008; Son ir kiti, 2008). Šie rezultatai rodo, kad anglis nėra ribojantis veiksnys ir kad bakterijos hidrolizuoja keratiną tam, kad gautų daugiau azoto.

1.9 Keratinolizinių aktyvumą turinčių fermentų heterologinė raiška

Fermentus galima gauti iš įvairių šaltinių, įskaitant augalus, gyvūnus, žmones ir mikroorganizmus. Šiuo metu daug komercinių fermentų gaunami biotechnologiniu būdu, taikant rekombinantinės DNR technologijos metodus. Naudojant rekombinantinės DNR technologiją per trumpą laiką galima pagaminti didelį kiekį baltymų. Išsamiai analizuojant biokatalizatorių biochemines savybes ir mechanizmus, mokslininkai siekia sukurti fermentus, kurių katalizinis efektyvumas prilygtų natūralių fermentų kataliziniams gebėjimams ir tuo pačiu turėtų savybių, kurios leidžia efektyviau sintetinti šiuos rekombinantinius baltymus skirtinguose šeiminiuose (Salleh, 2020).

Natūralūs keratinazes gaminantys mikroorganizmai turi trūkumų, įskaitant mažą sintetinio fermento išėgą ir aktyvumą, lėtą mikroorganizmų augimą, o tai trukdo keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų pritaikymui pramonėje. Heterologinė baltymo sintezė gali padėti įveikti tokius sunkumus (Park ir kiti, 2020).

E. coli yra geriausiai ištirtas modelinis mikroorganizmas, todėl plačiai naudojamas kaip rekombinantinių keratinazių sintezės šeimininkas. Keratinazių iš įvairių bakterijų, tokių kaip *B. licheniformis* (Nnolim, Mpaka ir kiti, 2020), *B. subtilis* (S. Gupta ir kiti, 2017), *B. pumilus* (Rajput ir Gupta, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (Pan ir kiti, 2021), *Actinomadura viridilutea* (Ben Elhouli ir kiti, 2016) ir *Deinococcus radiodurans* (Tang ir kiti, 2021) heterologinė sintezė buvo atlikta būtent *E. coli* bakterijose. Keratinolizinių fermentų sintezė šiuose mikroorganizmuose turi nemažai privalumų: greitas bakterijų augimas, rekombinantinės keratinazės indukcijai kontroliuoti ir gryninimo procesams supaprastinti galima naudoti daugybę vektorių, rekombinantinės keratinazės

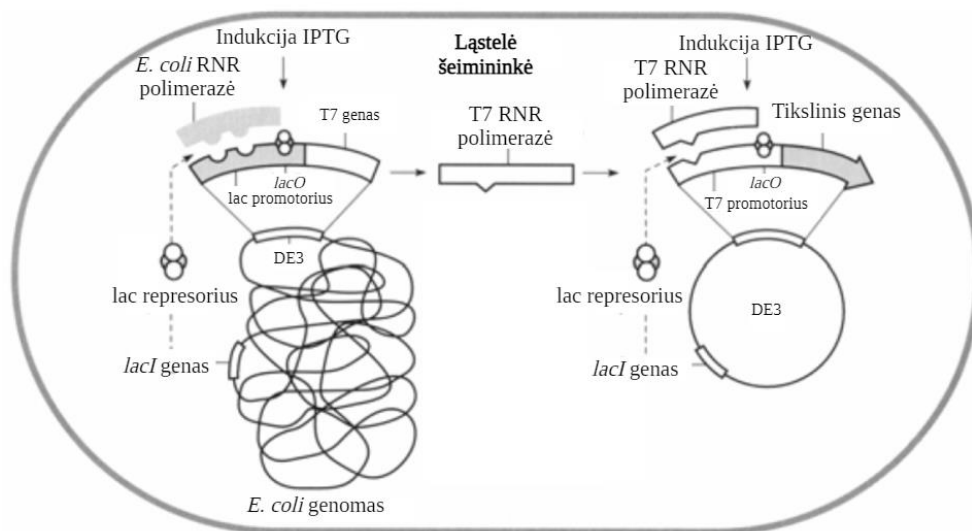
sintezę galima reguliuoti konstitutyviais, indukciniais arba savaime indukuojamais promotoriais (Yahaya ir kiti, 2021). Siekiant optimizuoti rekombinantinio baltymo sintezę gali būti naudojami įvairūs *E. coli* kamienai.

Vienas dažniausiai naudojamų *E. coli* kamienų heterologinei keratinazių sintezei atlikti yra BL21(DE3) (Rahimnahal ir kiti, 2023; Parinayawanich ir kiti, 2021; Ma ir kiti, 2024). Šios ląstelės neturi Lon proteazės, kuri skaido daugelį svetimų baltymų bei proteazės OmpT, kuri geba skaidyti ekstraląstelinius baltymus. Taip pat šis kamienas turi lizogeninį λ profagą DE3 ir T7 RNR polimerazės geną, todėl gali būti derinamas su T7 raiškai skirta sistema (Gottesman, 1996).

Nors BL21(DE3) kamiene sėkmingai susintetinta tūkstančiai rekombinantinių baltymų dideliais kiekiais, tačiau kartais sintezė nepavyksta dėl baltymo toksiškumo, kuris gali sukelti net ląstelių lizę. Siekiant išvengti tokio rezultato, baltymų sintezei gali būti naudojamas iš *E. coli* BL21(DE3) išvestas C41(DE3) kamienas, turintis susilpnintą $P_{lacWeak}$ promotorių, kuris padeda apsaugoti ląsteles nuo lizavimosi ir leidžia ląstelėms sintetinti toksiškus baltymus (Dumon-seignovert ir kiti, 2004).

Kita problema su kuria galima susidurti vykdant rekombinantinių baltymų sintezę heterologiniame šeimininke, tai kodonų naudojimo skirtumai tarp organizmų. Raiškos šeimininko naudojami kodonai kartais sukelia rėmelio poslinkį, priešlaikinį transliacijos nutraukimą ir klaidingą aminorūgščių inkorporavimą, dėl kurių sumažėja produkto kokybė arba negaunama gera sintezės išėiga. Siekiant įveikti tokią problemą, galima pasirinkti *E. coli* Rosetta (DE3) kamieną, kuris yra skirtas sustiprinti baltymų, turinčių *E. coli* retai naudojamų kodonų, sintezę. Rosetta (DE3) turi pRARE plazmidę, kurioje kartu ekspresuojami Arg, Ile, Leu, Leu, Pro ir Gly aminoacil-tRNR sintezės genai (De ir kiti, 2010).

Norint susintetinti rekombinantinį baltymą, reikia pasirinkti vektorių, kuriame bus įliguotas tikslinis genas. Daugumoje mokslinių tyrimų, siekiant sukurti heterologinės raiškos sistemą *E. coli* bakterijose, yra naudojami pET serijos raiškos vektoriai (Zhang ir kiti, 2020; Rahimnahal ir kiti, 2023). Jie turi T7 RNR polimerazės promotorių ir lac operatorių (1.6 pav.). Šie vektoriaus elementai užtikrina, kad tikslinio baltymo sintezė būtų kuo mažesnė iki jo raiškos indukcijos. Kol terpėje nėra induktoriaus, lac operatorius neaktyvus, T7 RNR polimerazė nėra sintetinama arba sintetinama labai silpnai, todėl baltymo genas netranskribuojamas (Sevastyanovich ir kiti, 2010). Naudojant T7 RNR polimerazės/promotoriaus sistemą, po indukcijos tikslinis baltymas gali sudaryti net apie 50 % visų ląstelės baltymų (Graumann ir Premstaller, 2006). Naudojant šią sistemą reikia pasirinkti tinkamą bakterijų kamieną, kuris turi lizogeninį λ DE3 profagą, T7 RNR polimerazės geno kopiją ir šio geno raišką reguliuojantį lac represorių (Dyson ir kiti, 2004).



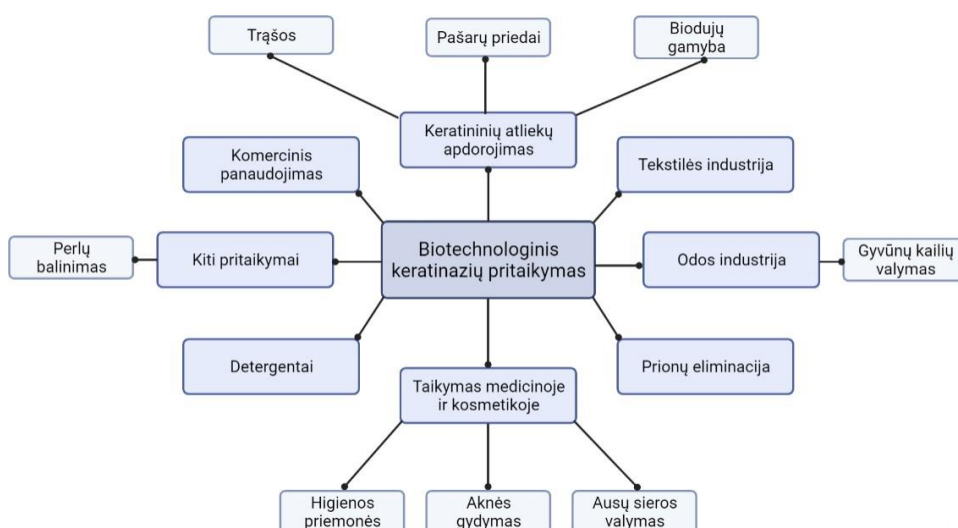
1.6 pav. Genų ekspresijos reguliavimo strategija naudojant pET raiškos sistemą (Beselin ir Lilly, 2014).

Naudojant pET vektorių sistemą yra paprasta prie baltymo prikabinti žymę, pvz. His inkarinę seką, kuri padės išgryninti rekombinantinį baltymą. Esant šiai žymei keratinazę galima gryninti naudojant Ni^{2+} giminingumo chromatografiją, išvengiant klaidingo sulankstymo atvejų (Dedavid E Silva ir kiti, 2014). Kita vertus, jei rekombinantinės keratinazės nepavyktų išgryninti šiuo metodu dėl didelio joninių arba hidrofobinių liekanų kiekio, galima pritaikyti kitus gryninimo metodus. Pavyzdžiui, dviejų rekombinantinių keratinazių KerSMF ir KerSMD iš *Stenotrophomonas maltophilia*, kurios turėjo daug hidrofobinių liekanų, išgryninti naudojant Ni^{2+} giminingumo chromatografiją nepavyko, tačiau fermentai buvo sėkmingai išgryninti taikant hidrofobinės sąveikos chromatografiją (Fang ir kiti, 2014).

Siekiant padidinti rekombinantinio baltymo sintezės išėigą, galima pašalinti baltymo sekoje esančią signalinę seką, kuri padeda baltymui patekti į ekstraląstelinę ertmę. Literatūroje pranešama, kad keratinazės iš *B. licheniformis* MKU3 sintezė *E. coli* BL21(DE3) bakterijose buvo sumažėjusi, kai iš sekos nebuvo pašalintas signalinis peptidas. Pašalinus šią seką, sintezės išėiga padidėjo (Rahimnahal ir kiti, 2023).

1.10 Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų pritaikymas

Keratinazės yra nepaprastai svarbi fermentų grupė dėl plačios jų pritaikymo srities. Keratinazės yra naudojamos tekstilės pramonėje, odos apdorojime, ploviklių gamyboje (Akhter ir kiti, 2020; Bhanghe ir kiti, 2016; Srivastava ir kiti, 2020). Taip pat šie fermentai naudingi siekiant eliminuoti prionus, perdirbti keratino atliekas, farmacijos bei kosmetikos pramonėje, naudojant keratinazes gydymui (Friedrich ir kiti, 2005; Ningthoujam ir kiti, 2019; Verma ir kiti, 2017). 1.7 paveikslėlyje pavaizduotos keratinolizinių fermentų pritaikymo sritys.



1.7 pav. Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų pritaikymo sritys (Vidmar ir Vodovnik, 2018).

Keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai, turi platų biotechnologinių pritaikymų spektrą dėl savo gebėjimo hidrolizuoti įvairius, natūraliai besikaupiančius gamtoje, keratino turinčius substratus bei veikti net ir ekstremaliomis sąlygomis (Goda ir kiti, 2020).

1.10.1 Keratinazių pritaikymas tekstilės pramonėje

Audinio susitraukimas bei apnašos ant vilnos pluošto paviršiaus sukelia daugybę problemų vilnos pramonėje. Vilnos audiniai veliasi ir susidaro barjeras, kuris neleidžia prasiskverbti dažams, norint nudažyti audinį. Anksčiau cheminiai metodai buvo pagrindinis šių problemų sprendimo būdas, tačiau šie metodai sumažina pluošto stiprumą. Fermentinis apdorojimas yra alternatyva gerinant vilninių audinių kokybę (Demir ir kiti, 2008). Dažniausiai naudojami fermentai, siekiant pagerinti vilnos pluoštų kokybę, yra pasižymintys keratinoliziniu aktyvumu. Keratinazės hidrolizuoja kryžminius disulfidinius ryšius tarp pluoštų, taip suteikdamos vilnos audiniams hidrofiliškumą, atsparumą susitraukimui ir geresnę prieigą dažui (Gunes ir kiti, 2018).

Siekiant pašalinti susikaupusias organines medžiagas (išmatos, šiaudai, dirvožemis) gyvulių kailyje, galima naudoti keratinazes, kurios padeda atkabinti atliekas nuo kailio. Šis procesas ne tik padės tekstilės pramonėje, tačiau taip pat sumažins gyvūnų mėsos užteršimo tikimybę (Navone ir Speight, 2020).

1.10.2 Keratinazių pritaikymas odos apdorojime

Odos pramonėje ir odos raugyklose yra sukaupiamas didelis atliekų kiekis. Šios liekanos teršia vandenį, dirvožemį ir atmosferą bei sukelia rimtų sveikatos sutrikimų žmonėms. Didžiąją dalį toksiškų atliekų odos pramonėje sukuria cheminis plaukų šalinimo procesas (Akhter ir kiti, 2020). Du pagrindiniai odos pramonės teršalai yra kalkės ir natrio sulfidas (Briki ir kiti, 2016). Sulfido koncentracijai viršijus 1 ppm, sukliamas dirginimas, galvos skausmas ir pykinimas. Mirtina sulfido

koncentracija žmogui yra 800 mg. Siekiant išvengti šių gamtą teršiančių problemų, mokslininkai ieško alternatyvų, jog būtų galima išvengti šių sunkumų. *Bacillus paralicheniformis* MKU3 kamieno sintetinės keratinazės gebėjimas hidrolizuoti plaukus, yra labai efektyvus. Atlikus odos fizinių savybių analizę nustatyta, jog fermentinis apdorojimas neturi neigiamo poveikio odos kokybei (Santha Kalaikumari ir kiti, 2019). *Bacillus subtilis* ES5 kamienas taip pat sintetina keratinazę, kurią galima pritaikyti odos pramonėje, ekologišku būdu šalinant plaukus nuo gyvulių odos (Alamnie ir kiti, 2023).

1.10.3 Keratinazių pritaikymas ploviklių gamyboje

Fermentų naudojimas ploviklių sudėtyje pagerina ploviklių gebėjimą pašalinti įsisenėjusias dėmes ir daro ploviklį saugiu aplinkai. Šie fermentai, palyginus su įprastomis proteazėmis, pasižymi didesniu substrato specifiškumu tiek tirpiems, tiek netirpiems baltymams. Šie fermentai gali lengvai išvalyti pieno, prakaito dėmes, kurias yra sunku pašalinti naudojant įprastas valymo priemones (Gong ir kiti, 2015). Šiais laikais daugelio skalbinių ploviklių sudėtyje yra fermentų mišinių, kuriuos sudaro tokie fermentai kaip amilazės, celiulazės ir lipazės (Hmidet ir kiti, 2009). Keratinazės yra tinkami fermentai naudoti plovikliuose. Pavyzdžiui, aktinobakterijos *Actinoalloteichus* sp. MA-32 kamieno keratinazė pasižymi dideliu stabilumu ir suderinamumu su dauguma išbandytų komercinių skalbinių ploviklių, o tai rodo, kad ji gali būti įtraukta į skalbinių ploviklio sudėtį. Kita keratinazė, išskirta iš *Paenibacillus woosongensis* TKB2, naudojama skalbimo pramonėje, siekiant pašalinti dėmes nuo drabužių, nepažeidžiant audinio tekstūros, o termostabilios keratinazės, išskirtos iš *Bacillus* sp. NDS-10 turi pastebimą potencialą pašalinti kraujo dėmes iš medvilnės audinio (Akram ir kiti, 2021; Paul, Das, Mandal, Jana ir kiti, 2014). Remiantis šiais rezultatais galima teigti, kad šios keratinazės gali būti naudinga alternatyva ir aplinkai nekenksminga ploviklių sudedamoji dalis (Manivasagan ir kiti, 2014).

1.10.4 Keratinazių pritaikymas prionų eliminacijoje

Prionai yra netaisyklingai susilankstę baltymai, sukiantys mirtinas neurodegeneracines ligas (Terry ir Wadsworth, 2019). Siekiant eliminuoti prionus, buvo naudojami įvairūs fiziniai bei cheminiai metodai, tokie kaip autoklavavimas, veikimas natrio hidroksidu arba apšvitinimas γ spinduliuote (Ernst ir Race, 1993; Gibbs ir kiti, 1978). Alternatyvus būdas yra fermentinis prionų degradavimas naudojant mikrobines keratinazes (Ningthoujam ir kiti, 2019). Šie fermentai yra perspektyvus prionų nukenksminimo įrankis, nes prioninio baltymo (PrPSc) agreguota struktūra, sudaryta iš β struktūrų, yra panaši į β -keratino struktūrą. Dėl šios priežasties keratinazės blokuoja amiloidinio branduolio susidarymą bei atstato netaisyklingai susilanksčiusius baltymus į neagreguotą būseną (Rajput ir Gupta, 2013; Ningthoujam ir kiti, 2019). Yra nustatyta, jog *B. licheniformis* PWD-

1 kamieno ir *Streptomyces* sp. keratinazės geba eliminuoti prionus (Rajput ir Gupta, 2013; Tsiroulnikov ir kiti, 2004). Taip pat literatūroje aprašyta keratinazė KerZJ iš *Stenotrophomonas* sp. LMY gali efektyviai hidrolizuoti žmogaus prionų baltymus švelniomis sąlygomis, tad turi potencialą būti pritaikyta medicinos pramonėje (Peng ir kiti, 2024).

1.10.5 Keratinazių pritaikymas atliekų tvarkyme

Vienas iš svarbiausių keratinazių pritaikymų yra keratininių atliekų apdorojimas, naudojant, pavyzdžiui, vištų plunksnas kaip fermentacijos substratą. Šių atliekų naudojimas yra skirtas dviem tikslams: sumažinti fermentacijos išlaidas fermentų gamybai ir taip pat sumažinti atliekų kiekį aplinkoje (Verma ir kiti, 2017). Plunksnos sudaro iki 10 % viso viščiuko svorio, o kasmetinis plunksnų, kaip šalutinio paukštininkystės pramonės produkto, kiekis siekia daugiau nei $7,7 \times 10^8$ kg per metus. Ši perteklinė, sunkiai skaidoma medžiaga dažnai būna išmetama į aplinką, o tai gali tapti rimta gamtos problema, nes yrant plunksnoms išsiskiria siera turtingos medžiagos, kurios kenkia aplinkai (Grazziotin ir kiti, 2006). Keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai geba efektyviai skaidyti keratino turinčias paukščių plunksnas ir padėti išvengti šios taršos problemos. Iki šiol atrasta efektyviausia keratinazė, skaidanti paukščių plunksnas, yra *B. licheniformis* sintetinama keratinazė (Manczinger ir kiti, 2003).

1.10.6 Keratinazių pritaikymas farmacijoje

Dažniausia keratinazių panaudojimo sritis farmacijos pramonėje yra susijusi su fungicidinių vaistų panaudojimu (Vidmar ir Vodovnik, 2018). Vienas iš grybelinių nagų infekcijų gydymo būdų yra antimikotinių vaistų vartojimas tiesiogiai ant pažeistos vietos. Pagrindinis šio metodo trūkumas yra nago paviršiaus nepralaidumas, turintis įtakos vaistų įsiskverbimui ir gydymo efektyvumui. Siekiant pagerinti vaisto įsisavinimą, naudojami įvairūs mechaniniai (nagų dildinimas ir atskyrimas), fiziniai (apdorojimas lazeriu ir drėkinimas) ir cheminiai (veikimas karbamide, tioglikolio rūgštimi, salicilo rūgštimi) metodai (Shivakumar ir kiti, 2014). Keratinazės, skirtingai negu cheminiai metodai, gali būti labai veiksmingos atpalaiduojant nagų plokšteles, esant mažoms fermento koncentracijoms. Atliktų tyrimų metu išsiaiškinta, jog *Paecilomyces marquandii* keratinazė yra tinkama siekiant pagerinti prasiskverbimą per keratininį nago sluoksnį (Mohorčič ir kiti, 2007).

1.10.7 Keratinazių pritaikymas kosmetikoje

Keratinazės yra svarbūs fermentai ir dėl potencialaus pritaikymo kosmetikos srityje. Šie fermentai gali būti naudojami sausos odos šalinimui, aknės bei žvynelinės gydymui (Vidmar ir Vodovnik, 2018). Taip pat, vis daugėja tyrimų įrodančių, jog šie fermentai gali būti įtraukiami į depiliacinio kremo sudėtį. Skirtingų gamintojų plaukų šalinimo kremai skiriasi, tačiau dauguma naudoja tokias chemines medžiagas, kaip tioglikolatą, sumaišytą su natrio hidroksidu arba kalcio

hidroksidu, kad pašalintų plaukelius nuo odos epidermio. Išsiaiškinta, jog šias chemines medžiagas galima pakeisti naudojant išgrynintas keratinazes. Atlikti tyrimai su *B. subtilis* DP1 kamieno keratinaze ir nustatyta, jog šis fermentas yra tinkamas naudoti norint pašalinti plaukelius nuo odos (Sanghvi ir kiti, 2016).

1.11 Hidrolizatai – biologiniu aktyvumu pasižymintys peptidai

Keratino atliekų kiekis nuolat auga, todėl keratiną hidrolizuojantys mikroorganizmai gali būti naudojami ne vien tik siekiant tvarkyti atliekas, bet ir kaip priemonė išgauti pridėtinės vertės turinčius produktus – bioaktyvius peptidus (Sypka ir kiti, 2021). Bioaktyvūs peptidai yra mažos molekulinės masės baltymų fragmentai, susidedantys iš 2–20 aminorūgščių liekanų, kurios turi teigiamą fiziologinį poveikį *in vivo* (Martinez-Villaluenga ir kiti, 2017). Jie gali pasižymėti antioksidaciniu, priešūždegiminiu, priešvėžiniu, antimikrobiniu, imunomoduliuojančiu ir antihipertenziniu poveikiais (Zaky ir kiti, 2022). Remiantis 2023 m. duomenimis apskaičiuota, kad produktų, kurių sudėtyje yra peptidų, rinka siekia daugiau nei 4,961 mlrd. JAV dolerių per metus, o iki 2030 m. tikimasi, jog rinka sieks 10,711 mlrd. JAV dolerių per metus (*Bioactive Peptides Market...*, 2024).

Viena iš keratininių substratų hidrolizatų panaudojimo sričių – plunksnų atliekų perdirbimas į plunksnų miltus, kurie naudojami kaip gyvulių pašaras ar pašarų papildai. Šiuose perdirbtuose produktuose yra gausu hidrofobinių aminorūgščių bei svarbių aminorūgščių, tokių kaip cisteinas, argininas ir treoninas. Be to, pasitelkus šį fermentinį atliekų apdorojimo metodą, gauti plunksnų miltai pasižymi didesniu virškinamumu (Tiwary, 2012). Dėl šios priežasties pašarų papildams gaminti naudojamos komercinės keratinazės (Versazyme) iš *B. licheniformis* PWD-1 kamieno (Lionela ir kiti, 2021). Taip pat keratino turinčių atliekų (plunksnų, vilnos) hidrolizės produktai naudojami organinių trąšų arba augalų biostimuliatorių gamyboje (Zoccola ir kiti, 2015). Keratino hidrolizatus galima panaudoti ir tokiose srityse kaip nanotechnologijos. 2019 m. Agarwal ir kiti nustatė, jog keratino hidrolizatas buvo naudojamas stabilizuoti metalinių nanodalelių preparatus.

Tyrimai susiję su keratinolizininiais fermentais yra labai aktualūs visame pasaulyje. Keratinas yra netirpi, sparčiai gamtoje besikaupianti medžiaga. Šiais laikais labai svarbu didelį dėmesį skirti tyrimams, kurie siekia atrasti ekologiškus metodus šalinant keratino turinčias atliekas. Seni cheminiai bei fizikiniai atliekų perdirbimo metodai teršia aplinką bei prisideda prie klimato kaitos, tad fermentų panaudojimas šalinant atliekas prisidėtų prie šių opių problemų sprendimo. Keratinoliziniu aktyvumu pasižymintys fermentai atlieka svarbų vaidmenį keratino perdirbime, o gauti hidrolizatai yra pritaikomi įvairiose srityse. Norint geriau suprasti keratinazių veikimą bei plėsti šių fermentų pritaikymą, šios krypties moksliniai tyrimai yra būtini.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2. 1 Naudotos medžiagos, prietaisai, bakterijų kamienai ir terpės

2.1.1 Darbe naudotos medžiagos

Bio-Rad, JAV: TEMED.

Carl Roth, Vokietija: agaras (Agar-Agar, BioScience), akrilamidas, amonio persulfatas, ampicilinas, APS, bisakrilamidas, CaCl₂, glicerolis, glicinas, kanamicinas, karbamidas, mielių ekstraktas, NDS, peptonas, TRIS.

HiMedia, Indija: K₂HPO₄.

HoneyWell, Prancūzija: etanolis.

Viskase, JAV: Membra-Cel MD34 14K MWCO membrana.

Merck, Vokietija: Chloramfenikolis, HCl, lizocimas, NaCl, pieno baltymai.

Sigma Aldrich, Vokietija: bromfenolio mėlynasis, EDTA, etidižio bromidas, NH₄Cl, triton X-100.

Thermo Fisher Scientific, JAV: rinkiniai – DreamTaq PCR Master Mix (2X), GeneJET Genomic DNA Purification Kit, GeneJET PCR Purification Kit, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, CloneJET PCR Cloning Kit, Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix. DNR ir baltymų dydžio žymenys – GeneRuler™ 1kb DNR žymuo, GeneRuler™ 1 kb Plus DNR žymuo, PageRuler Unstained Protein Ladder baltymų molekulinės masės žymuo, Pierce™ baltymų molekulinės masės žymuo, SeeBlue™ baltymų molekulinės masės žymuo. Kiti – agarozė, 6× TriTrack DNA Loading Dye mėginių užnešimo dažas, PageBlue staining solution baltymų dažas, restrikcijos endonukleazė FastDigest *NdeI* ir FastDigest *XhoI*, T4 ligazė.

Tokyo Chemical Industry, Japonija: vilnos keratinas.

VWR (BDH), JAV: KH₂PO₄.

2.1.2 Darbe naudoti prietaisai

Autoklavas – VX-150 (Systec);

Baltymų elektroforezės aparatas – Mini-PROTEAN Tetra (BioRad);

Dezintegratorius (Sonics);

Didelio tūrio centrifūga – Sigma 3-30K (Sigma);

Elektroforezės rezultatų fiksavimo sistema – MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems);

Elektroninės svarstyklės (KERN ADB);

Elektros srovės šaltinis (Amersham Biosciences Electrophoresis power supply EPS 601);

Gelių vartyklė (Biosan); Termocikleris – T100 (Bio-Rad);

Inkubatorius (Binder);

Laminarinis boksas – SAFE 2020.09 (ThermoScientific);

Magnetinė Maišyklė (IKA RH Basic 2);

Lašelinis bekiuvis spektrofotometras – NanoDrop™ (ThermoFisherScientific);

pH matuoklis (Mettler toledo);

Purtyklė (GFL 1083);

Spektrofotometras – Ultrospec 5300 pro (Amersham Biosciences);

Stalinė centrifūga (Eppendorf 5424);

Terminė purtyklė (Biosan);

UV šviestuvai (Merck);

Vorteksas (VELP Scientifica).

2.1.3 Darbe naudoti bakterijų kamienai

Šiame darbe naudoti bakterijų kamienai pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe naudotų bakterijų kamienų pavadinimai bei jų aprašymai.

Kamienas	Aprašymas	Šaltinis
SK-91	Mezofilinės <i>Streptomyces</i> bakterijos	Šis darbas
<i>E. coli</i> DH5α	ϕ 80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 gyrA96 λ-thi-1 relA1	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	Novagen
<i>E. coli</i> C41 (DE3)	<i>F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)</i>	Lucigen
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	<i>F-ompThsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)</i>	Novagen

2.1.4 Darbe naudoti vektoriai

Šiame darbe naudoti vektoriai pateikti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Darbe naudotų vektorių pavadinimai bei aprašymai.

Vektorius	Aprašymas	Šaltinis
pJET1.2/blunt	Klonavimo vektorius, Amp ^r	Thermo Fisher Scientific
pET-21c(+)	Raiškos vektorius, Amp ^r	Novagen
pET-28b(+)	Raiškos vektorius, Kan ^r	Novagen

2.1.5 Darbe naudoti pradmenys

Šiame darbe naudoti pradmenys pateikti 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Darbe naudotų pradmenų pavadinimai, jų seka bei seka, kurią siekiama pagausinti. Restrikcijos endonukleazių *NdeI* ir *XhoI* atpažinimo sekos pabrauktos.

Pradmens pavadinimas	Tikslinė seka	Pradmens seka
SJ1F	Į CtpA panaši serino proteazė	5'TCCGATCGCCACTTCTGTAT 3'
SJ2R		5'TCCGAGGCCACTCAATACCG 3'

2.3 lentelės tęsinys.

Pradmens pavadinimas	Tikslinė seka	Pradmens seka
SJ3F	Maža ekstraląstelinė neutrali proteazė	5'AAAATGCGTCACCCCAAGGTC 3'
SJ4R		5'TCAGAAGGTCTTGAACGCGGA 3'
SJ5F	Aminopeptidazė N	5'AAAATGCCGCTCGTCCGAAAC 3'
SJ6R		5'AAATCACCCGGGTTTCACCGC 3'
SJ7F	Ekstraląstelinė peptidazė	5'AGTCATATCCGTGGTCGCGAG 3'
SJ8R		5'TCAGAAGGTGAGGTTCCACGAG 3'
SJ9F	Į tripsiną panaši proteazė	5'TGAGAAGGCTCATGGCCAC 3'
SJ10R		5'TACGCTGAGGCTCAGAGCC 3'
SJ11F	Į tripsiną panaši proteazė	5'GTGAAGAAGAACCGACTGGTCA 3'
SJ12R		5'TTCACGGGTTACAGCGTGG 3'
SJ13F	Pre-pro-metalo proteazė PrtV	5'TACATCAAGTGACCAACAGACGA 3'
SJ14R		5'TTTATCGACTACTTGGTCGACGG 3'
RSJ34F28	Maža ekstraląstelinė neutrali proteazė	5'ATTATCATATGCGTCACCCCAAGGTCCTCAA 3'
RSJ34R28		5'ATTATCTCGAGTCAGAAGGTCTTGAACGCGGAGG T 3'
RSJ34R21		5'ATTATCTCGAGGAAGGTCTTGAACGCGGAGGT 3'
BSRSJ34F		5' ATTACATATGGCCGACACCGACAGGGCTGT 3'
RSJ78F28		5' ATTATCATATGGTCGCGAGCGCCGCGATC 3'
RSJ78R28	Ekstraląstelinė peptidazė	5'ATTATCTCGAGTCAGAAGGTGAGGTTCCACGAGT 3'
RSJ78R21		5'ATTATCTCGAGGAAGGTGAGGTTCCACGAGTCGA TGTAGCCGGT 3'
BSRSJ78F		5' ATATTATCATATGGCCGCCCCGGGCGCTGC 3'
RSJ910F28	Į tripsiną panaši proteazė	5' ATATTACATATGGCCACGGTCGCGGGGGC 3'
RSJ910R28		5'ATTATACTCGAGTCAGAGCCGGTCCGGGCGCT 3'
RSJ910R21		5'ATTATCTCGAGGAGCCGGTCCGGGCGCTTCC 3'
BSRSJ910F		5'ATTACATATGGTCGTCGGAGGGCAGGAGGC 3'
RSJ1314F28	Pre-pro-metalo proteazė PrtV	5'ATTATCATATGACCAACAGACGACGGGCGATCA 3'
RSJ1314R28		5'ATTATCTCGAGCTACTTGGTCGACGGGCCAACCTG AA 3'
RSJ1314R21		5'ATTATCTCGAGCTTGGTCGACGGGCCAACCTGAA 3'
BSRSJ1314F		5'ATTACATATGGACAGCGACGGCAACGTGTC 3'
T7 prom-F	Vektoriaus seka tarp T7 promotoriaus ir terminatoriaus	5'TAATACGACTCACTATAGGG 3'
T7 term-R		5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

2.1.6 Darbe naudotos terpės bakterijų kultivavimui

Šiame darbe naudotos bakterijų kultivavimo terpės pateiktos 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Mitybinės terpės bakterijų kultivavimui ir jų sudėtys.

Auginimo terpė	Sudėtis
LB	1 % peptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl.

2.4 lentelės tęsinys.

Auginimo terpė	Sudėtis
Pusiaus sintetinė keratino terpė	0,05 % NH ₄ Cl, 0,05 % NaCl, 0,03 % K ₂ HPO ₄ , 0,03 % KH ₂ PO ₄ , 0,01 % mielių ekstraktas, 0,1 % vilnos keratinas (standžiai terpei 1,5 % agaras).
Pieno terpė	0,05 % NH ₄ Cl, 0,05 % NaCl, 0,03 % K ₂ HPO ₄ , 0,03 % KH ₂ PO ₄ , 0,01 % mielių ekstraktas, 0,1 % pieno milteliai (standžiai terpei 1,5 % agaras).

Mitybinių terpių paruošimo metodas aprašytas 2.2 skyriuje.

2.2 Mitybinių terpių ruošimas

Komponentai (2.4) sudedami į kolbą, ištirpinami ir iki reikiamo tūrio terpė privedama vandeniu. Skysta terpė išpilstoma į mėgintuvėlius. Terpės sterilizuojamos 112 °C arba 121 °C temperatūroje, susidarius 0,5 arba 1 atmosferos slėgiui – 15 min. arba 20 min. Jeigu reikia, po sterilinimo įdedama ampicilino, chloramfenikolio ir (ar) kanamicino. Sterilios terpės su agaru išpilstomos į Petri lėkštes po 25 mL.

2.3 Genominės DNR skyrimas

Izoliatas SK-91 pademonstravęs didelį keratinolizinį aktyvumą buvo auginamas skystoje LB terpėje 8–16 val. 30 °C temperatūroje, 180 aps./min. greičiu. Siekiant išskirti genominę DNR buvo naudojamas GeneJET Genomic DNA Purification Kit rinkinys.

2.4 DNR elektroforezė agaroziniame gelyje

Norint vizualizuoti DNR, vykdoma DNR elektroforezė agaroziniame gelyje. Geliui formuoti naudojamas 1× TAE buferinis tirpalas (40 mM Tris, 20 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA), kuriame šildant buvo ištirpinama 0,8 % agarozės. Tirpalui atvėsus įdedama 0,5 µg/mL etidžio bromido. Tirpalas supilamas į gelio formavimo indelį ir įstatomos šukutės, kurios suformuoja šulinėlius. Po 30 min., geliui sustingus, indelis perkeliamas į vonelę ir panardinamas 1× TAE buferiniame tirpale. Į pirmąjį šulinėlį įleidžiami 5 µL GeneRuler™ 1 kb DNR žymens. DNR mėginys sumaišomas su 6× užnešimo dažu ir įleidžiamas į gelio šulinėlį. Elektroforezė vykdoma esant 100 V įtampai. Po elektroforezės gelis vizualizuojamas naudojant UV šviesą MiniBIS Pro aparatu.

Išskirtos genominės DNR sekoskaita atliekama įmonėje „Nanodiagnostika“. Gavus genomo sekoskaitos rezultatus, buvo vykdomas genomo surinkimas, naudojant Shovill algoritmą bei genomo anotavimas, naudojant Prokka įrankį. Tuomet atlikta bioinformatinė genomo analizė ir remiantis moksline literatūra atrinkti septyni fermentai galimai atsakingi už keratino skaidymą.

2.5 Keratinolizinių fermentų genų pagausinimas PGR metodu

Atrinktų, galimai keratinolizinį aktyvumą turinčių, fermentų genai buvo gausinami PGR metodu

naudojant *Phusion* Hot Start II High Fidelity PCR Master Mix rinkinį. *Phusion* polimerazė buvo pasirinkta tam, jog išvengti mutacijų tikslinių genų sekose, nes ši polimerazė pasižymi „klaidas taisančiu“ 3' → 5' egzozonukleaziniu aktyvumu. Pradmenys SJ1F, SJ2R, SJ3F, SJ4R, SJ5F, SJ6R, SJ7F, SJ8R, SJ9F, SJ10R, SJ11F, SJ12R, SJ13F ir SJ14 buvo sukurti pagal atrinktų fermentų genų sekas. Ruošiama 50 µL reakcijos mišinio, kurį sudaro 1× *Phusion* HS II HF Master Mix, po 0,5 µM tiesioginio ir grįžtamojo pradmenų, SK-91 izoliato genomine DNR (2.3) ir H₂O iki reikiamo reakcijos mišinio tūrio. Kontrolinis mėginys ruošiamas genomine DNR pakeičiant H₂O. Paruošti mėginiai ir kontrolinis mėginys dedami į Bio-Rad termociklerį. Reakcija vykdoma nustatant šias sąlygas: 1. Pirminė DNR denatūracija – 98 °C 3 min., 2. DNR denatūracija – 98 °C 8 sek., 3. Pradmenų prilydimas – temperatūra parenkama priklausomai nuo pradmenų sekų 20 sek., 4. Sintezė – 72 °C 1 min. 30 sek., 5. Reakcijos užbaigimas – 72 °C 8 min. 2–4 ciklai kartojami 34 kartus. Pagausinti PGR produktai po analizės (2.4) išskiriami iš agarozės gelio naudojant GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį arba gryninami iš PGR reakcijos mišinio naudojant GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį. Mėginių koncentracija nustatoma naudojant NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) aparatą. Pagausinti fragmentai siunčiami sekoskaitai į įmonę „Nanodiagnostika“, o gauti rezultatai naudojami palyginti gautas sekas su teorinėmis atrinktų fermentų sekomis.

Įstikinus, jog gauti fragmentai atitinka tikslinių genų sekas, sukurti pradmenys su *NdeI* ir *XhoI* restrikcijos endonukleazių atpažinimo vietomis (2.3 lentelė), kurie PGR metu leido padauginti pilnus tikslinius genus bei genus be siganlinės sekos. Tuomet atliktas PGR pagal anksčiau nurodytas sąlygas, o išgryninti fragmentai naudojami klonavimo darbams vykdyti.

2.6 Tikslinių genų klonavimas į pJET1.2/blunt vektorių

Siekiant atlikti pirminį PGR produktų klonavimą, pasirinkta naudoti pJET1.2/blunt klonavimo vektorių, kuris turi atsparumo ampicilinui geną. Šis vektorius yra skirtas klonavimui bukais galais, todėl tiksliniai genai buvo pagausinti, naudojant *Phusion* polimerazę (2.5). Ligavimo reakcija buvo atliekama naudojant CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį. Ligavimo sąlygos ir reagentų santykiai pasirinkti pagal gamintojo nurodymus.

2.7 Chemiškai kompetentinių ląstelių ruošimas

Reikiami bakterijų kamienai užsėjami ant agarizuotos LB terpės su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais) ir inkubuojami 37 °C temperatūroje 16–20 val. Užaugus ląstelėms, viena kolonija užsėjama į 5 mL LB terpę su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais) ir auginama 37 °C temperatūroje per naktį maišant 180 aps./min. greičiu. Į 100 mL LB terpės su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais) inokuliuojama 1 % naktinės kultūros. Toliau auginama tol, kol ląstelės pasiekia 0,4 optinio vieneto tankį (matavimas atliekamas naudojant spektrofotometrą esant 600 nm bangos ilgiui). Auginimas sustabdomas perkeliant

kultūrą 10 min. į ledo vonią. Ląstelės surenkamos 4 °C temperatūroje centrifuguojant 30 sek. 10 000 × g greičiu. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 1 mL atšaldyto sterilaus 100 mM CaCl₂ tirpalo. CaCl₂ padeda sumažinti krūvių atostūmį tarp neigiamai įkrautos ląstelės membranos bei neigiamą krūvį turinčios DNR (Rahimzadeh ir kiti, 2016). Po 30 min. šaldymo 4 °C temperatūroje ląstelės surenkamos centrifuguojant 30 sek. 10 000 × g greičiu, supernatantas nupilamas, ląstelės resuspenduojamos 0,2 mL atšaldyto 100 mM CaCl₂ tirpalo. Kultūra valandai perkeliama į 4 °C temperatūrą.

2.8 Cheminė ląstelių transformacija

Siekiant transformuoti bakterijų ląsteles, 0,2 mL šaltai laikomų kompetentinių ląstelių atsargiai sumaišomos su 5 µL DNR. Mišinys valandą inkubuojamas 4 °C temperatūroje. Tuomet ląstelės su ligatu perkeliama 2 min. į 42 °C temperatūrą tam, jog membranoje susidarytų poros. Po inkubacijos ląstelės perkeliama į ledo vonią ir šaldomos 2 min., kad susiformavusios poros susitrauktų. Atliekamas ląstelių gaivinimas su 0,2 mL LB terpės termomaišyklėje 37 °C temperatūroje, purtant ląsteles 220 aps./min. greičiu 1 valandą. Po gaivinimo, ląstelės glaistymo metodu išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais) ir auginamos 37 °C temperatūroje 16 val.

2.9 Teigiamų transformantų atranka

Po cheminės *E. coli* DH5α ląstelių transformacijos (2.8) teigiami klonai buvo atrenkami pagal neigiamų klonų eliminavimo metodą. pJET1.2/blunt klonavimo vektorius turi letalų geną, kuris yra inaktyvuojamas, kai į vektoriaus multikloninį saitą įsiterpia tikslinis genas ir pertraukia nukleazės geną. Tokiu atveju ląstelės gali augti ant terpės su ampicilinu. Jeigu tikslinis genas nebūtų įterptas, vektorius susiliguotų su savimi ir būtų sintetinama nukleazė, kuri suardytų DNR. Siekiant atrinkti transformantus su raiškos vektoriais, atranka vykdoma su atitinkamais antibiotikais bei atliekant kolonijų PGR metodą (2.13)

2.10 Plazmidinės DNR skyrimas

Transformantų kolonija užsėjama į 5 mL LB mitybinės terpės su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais) ir auginama 12–16 val. 37 °C temperatūroje, 180 aps./min. greičiu. Plazmidinė DNR išskiriama iš *E. coli* ląstelių naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį. Reakcijos atliekamos remiantis gamintojo nurodymais. Išskirtos plazmidės buvo patikrinamos DNR elektroforezės agaroziniame gelyje metodu (2.4).

2.11 Restrikinė analizė

Išskirtos plazmidės patikrinamos restrikinės analizės metodu. Siekiant iškirpti tikslinį fragmentą atliekama dviguba restrikcija naudojant dvi restrikcijos endonukleazes *NdeI* ir *XhoI*. Reakcijos mišinį

sudaro 10× buferinis tirpalas, restrikcijos endonukleazė (fermento kiekis pasirenkamas priklausomai nuo norimo sukarpyti DNR kiekio), DNR, H₂O iki reikiamo reakcijos tūrio. Komponentai sumaišomi ir inkubuojami 5 min. 37 °C temperatūroje. Reakcija vykdoma pagal gamintojo nurodymus (Thermo Fisher Scientific). Sukarpyti mėginiai analizuojami DNR elektroforezės metodu (2.4).

2.12 Ligavimas į raiškos vektorius

Po dvigubos restrikcijos (2.11), tiksliniai fragmentai išgryninami iš gelio ir liguojami su pET-21c(+) bei pET-28b(+) raiškos vektoriais, kurie buvo linearizuoti *Nde*I ir *Xho*I restriktazių ir išvalyti iš agarozės gelio. Ligavimo reakcija vykdoma 16 val. 4 °C temperatūroje naudojant T4 ligazę. Reakcijos sąlygos parinktos pagal gamintojo nurodymus (Thermo Fisher Scientific).

Po reakcijos gautas ligato mišinys cheminės transformacijos būdu (2.8) buvo transformuojamas į chemiškai kompetentines *E. coli* DH5α ląsteles (2.7). Po transformacijos ląstelės turinčios pET-21c(+) vektorių buvo išsėtos ant selektyvios agarizuotos LB terpės su ampicilinu (100 µg/mL), o ląstelės turinčios pET-28b(+) vektorių išsėtos ant standžios LB terpės su kanamicinu (50 µg/mL).

2.13 Kolonijų PGR

Tam, jog įsitikinti, ar transformantai turi vektorių su tiksliniu genu, vykdomas kolonijų PGR metodas. PGR atliekamas naudojant DreamTaq PCR Master Mix (2X) rinkinį. Ruošiama 20 µL reakcijos mišinio, kurį sudaro 1× DreamTaq PCR Master Mix, po 0,5 µM tiesioginio T7 promotoriaus ir grįžtamojo T7 terminatoriaus pradmenų, transformantų kolonijų biomasė ir H₂O iki reikiamo reakcijos mišinio tūrio. Paruošti mėginiai dedami į Bio-Rad termociklerį. Reakcija vykdoma nustatant šias sąlygas: 1. Pirminė DNR denatūracija – 95 °C 2 min. 30 sek., 2. DNR denatūracija – 95 °C 30 sek., 3. Pradmenų prilydimas – 49 °C 30 sek., 4. Sintezė – 72 °C 2 min. 30 sek., 5. Reakcijos užbaigimas – 72 °C 10 min. 2–4 ciklai kartojami 30 kartų. Rezultatai analizuojami DNR elektroforezės metodu (2.4).

2.14 Rekombinantinių baltymų sintezė

E. coli transformantai, turintys reikiamą raiškos vektorių su tiksliniu genu auginami LB terpėje su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais) 12–16 val. 37 °C temperatūroje, maišant 180 aps./min. greičiu. Po auginimo 1 % naktinės kultūros perkeliama į 100 mL LB terpę su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais). Toliau auginama tol, kol ląstelės pasiekia 0,4 optinio vieneto tankį (matavimas atliekamas naudojant spektrofotometrą esant 600 nm bangos ilgiui). Pasiekus reikiamą optinį tankį, į terpę su *E. coli* įdedama 0,5–1 mM galaktozės analogo izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozido (IPTG), siekiant nustatyti optimalias tikslinio baltymo sintezės sąlygas. Po indukcijos ląstelės auginamos 24 val. Pirmas 3 valandas kas valandą bei 24-tą valandą nuo indukcijos pradžios imami indukuotų ir neindukuotų ląstelių mėginiai. Ląstelių imama tiek, kad jų kiekis indukcijos pradžioje (nulinę valandą) ir analizuojamą valandą būtų

vienodas. Indukuotos ir neindukuotos ląstelės surenkamos centrifuguojant $20\,000 \times g$ greičiu 30 sek. ir užpilamos $4\times$ baltymų užnešimo buferiniu tirpalu (240 mM Tris-HCl pH 6,8; 40 % glicerolio; 8 % NDS; 0,04 % bromfenolio mėlynojo). Baltymų mėginių profilio analizė atliekama natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezės (NDS-PAGE) metodu (2.15).

2.15 Glicininė baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis

Tam, jog įsitikinti, ar bakterijos sintetina rekombinantinį baltymą, molekulinės masės analizė vykdoma atliekant baltymų frakcionavimą natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezės metodu. Gelis frakcionavimui formuojamas tarp dviejų stikliukų. Frakcionavimui buvo paruošiami du geliai: 12 % skirstomasis gelis (12 % akrilamidas / bisakrilamidas (29:1); 390 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % NDS; 0,1 % APS; 0,001 % TEMED; dist. H₂O) ir 4 % koncentruojamasis gelis (4 % akrilamidas / bisakrilamidas (29:1); 130 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % NDS; 0,1 % APS; 0,001 % TEMED; dist. H₂O). Visų pirma, pilamas skirstomasis gelis, o ant jo pilamas vanduo. Gelis paliekamas stingti kambario temperatūroje. Po 30 min., kai gelis sustingsta, vanduo nupilamas ir užpilamas koncentruojamasis gelis, įstatomos šukutės, kurios formuoja šulinėlius ir kai gelis sustingsta, yra ištraukiamos. Suformuotas frakcionavimo gelis perkeliamas į elektroforezės aparatą, į kurį iki tam tikros ribos yra įpilamas Tris-glicino-NDS elektroforezės buferinis tirpalas (190 mM glicinas; 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 0,1 % NDS). Mėginiai paruošiami naudojant $4\times$ baltymų užnešimo buferinį tirpalą (40 % glicerolis; 240 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 % NDS; 0,04 % bromfenolio mėlynasis). Į pirmąjį šulinėlį įnešama tinkamo 5 μ L baltymų standartų mišinio, o į kitus įnešama po 20 μ L paruošto mėginio. Elektroforezei atlikti naudojamas 20 mA srovės stipris, kuris mėginiams perėjus į skirstomąjį gelį yra pakeliamas iki 40 mA. Po elektroforezės, atsiskybę baltymai plaunami distiliuotu vandeniu 3 kartus po 10 min. ir per naktį dažomi su PageBlue Staining Solution dažu. Nudažius gelį, jis atplaunamas distiliuotu vandeniu ir fotografuojamas MiniBIS Pro aparatu.

2.16 Zimografija – aktyvumo gelyje nustatymas

Po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis (2.15), gelis 30 min. plaunamas Tris-HCl 7,8 pH buferyje su 2,5 % Triton X-100. Po to, gelis plaunamas 3 kartus po 10 min. Tris-HCl 7,8 pH buferyje, tačiau šį kartą be Triton X-100. Po plovimų, gelis dedamas į sterilią Petri lėkštelę ir yra užpilamas standžia pusiau sintetinė keratino ir pieno terpe. Lėkštelės inkubuojamos 30 °C temperatūroje iki kol bus matoma hidrolizės zona.

2.17 Tirpių ir netirpių baltymų frakcijų atskyrimas

Siekiant atskirti tirpių ir netirpių baltymų frakcijas, *E. coli* transformantai, turintys tikslinius genus, klonuotus į pET šeimos vektorius, auginami LB terpėje su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais).

Vykdoma indukcija nustatytais optimaliais sąlygomis. Terpė su ląstelėmis centrifuguojama $8500 \times g$ 15 min. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 7,8 pH 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale. Tuomet ląstelės surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis ir vėl suspenduojamos pH 7,8 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale santykiu 1:4 (ląstelės:buferinis tirpalas). Vėliau ląstelės centrifuguojamos $8000 \times g$ 15 min., suspenduojamos 8 pH 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale ir ardamos ultragarsu 15 min. naudojant 10 sek. : 20 sek. (ardymas : šaldymas) intervalą (Sonics). Tuomet mėginys centrifuguojamas $15000 \times g$ 10 min. – tokiu būdu yra atskiriamos tirpi ir netirpi baltymų frakcijos. Baltymų gryninimui iš netirpių baltymų frakcijos naudojami 6 M karbamido turintys buferiniai tirpalai. Gautos baltyminės nuosėdos suspenduojamos su 50 mM Tris-HCl, 1 % Triton X-100, pH 8 plovimo buferiniu tirpalu santykiu 1:10 ir inkubuojama 60 min. kambario temperatūroje. Tuomet nuosėdos surenkamos centrifuguojant $12000 \times g$ 10 min., suspenduojamos su 50 mM Tris-HCl, pH 8 plovimo buferiniu tirpalu santykiu 1:10 ir inkubuojama 60 min. kambario temperatūroje. Toliau nuosėdos surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis ir tirpinamos 50 mM Tris-HCl, 6 M karbamido, pH 8 buferiniame tirpale 60 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos ištirpintų baltymų frakcija atskiriama centrifuguojant $12000 \times g$ 10 min. Paruošti mėginiai analizuojami glicininės baltymų elektroforezės metodu (2.15).

2.18 Rekombinantinių baltymų gryninimas

Baltymų gryninimas atliekamas su frakcija, kurioje identifikuotas rekombinantinis baltymas. Siekiant išgryninti tikslinius baltymus, buvo atliekamas gryninimas naudojant Ni^{2+} giminingumo chromatografiją. Gryninimo procedūra paremta baltymo gale esančių šešių histidino aminorūgščių liekanų inkaro sąveika su Ni^{2+} jonais. Eliucija vykdoma su 500 mM imidazolu, eliucijos frakcijos surenkamos ir analizuojamos NDS-PAGE (2.15) metodu.

2.19 Rekombinantinių baltymų dializė

Baltymų dializė atliekama naudojant Membra-Cel MD34 14K MWCO membraną. Membrana su baltymų ekstraktu (2.18) panardinama 10 kartų didesnio tūrio atitinkamame 7,8 pH buferyje (2.5 lentelė). Mėginys buferiniame tirpale laikomas 24 val. (po 12 val. buferinis tirpalas pakeičiamas nauju) 4 °C temperatūroje, naudojant magnetinę maišyklę.

2.5 lentelė. Dializės buferiniai tirpalai ir jų sudėtis.

Dializės buferinio tirpalo pavadinimas	Dializės buferinio tirpalo sudėtis
Buferinis tirpalas A	50 mM Tris-HCl 7,8 pH

2.5 lentelės tęsinys.

Dializės buferinio tirpalo pavadinimas	Dializės buferinio tirpalo sudėtis
Buferinis tirpalas B	4 M karbamido, 50 mM Tris-HCl 7,8 pH
Buferinis tirpalas C	2 M karbamido, 50 mM Tris-HCl 7,8 pH
Buferinis tirpalas D	1 M karbamido, 50 mM Tris-HCl 7,8 pH

Po dializės, baltymai analizuojami NDS-PAGE (2.15) metodu. Taip pat analizė atliekama zimografijos (2.16) bei agarozės šulinėlių (2.20) metodais.

2.20 Fermento aktyvumo įvertinimas agarozės šulinėlių metodu

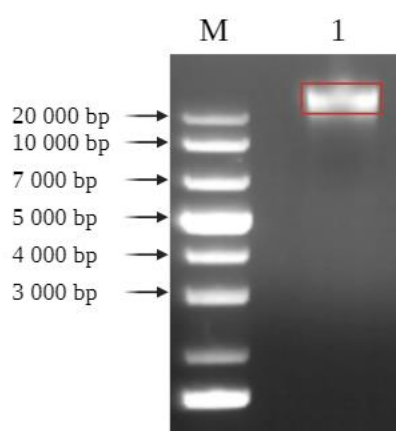
Siekiant nustatyti išgrynintų rekombinantinių baltymų aktyvumą, 100 µL gryninto rekombinantinio baltymo supilama į agarizuotos pusiau sintetinės keratino terpės bei agarizuotos pieno terpės šulinėlius. Lėkštelės inkubuojamos 30 °C temperatūroje. Po inkubacijos keratinolizinis aktyvumas įvertinamas atsižvelgiant į hidrolizės zonos diametrą ir ryškumą.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Remiantis bakalaurinio darbo metu atlikto tyrimo rezultatais, pasirinkta dirbti su *Streptomyces* sp. SK-91 kamieniu, kuris pademonstravo didelį aktyvumą skaidant keratino baltymų turinčius substratus. Norint sukurti efektyvią heterologinę keratinolizinių genų raiškos sistemą, pirmiausia yra būtina atlikti genomo analizę bei atrinkti keratinolizinius baltymus koduojančius genus.

3.1 Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčio mikroorganizmo genomo analizė

Siekiant atrinkti baltymus, kurie turėtų keratinolizinį aktyvumą, pasirinkta atlikti *Streptomyces* genčiai priklausančio mikroorganizmo genomo sekoskaitą. Šiuo tikslu, buvo išskirta atrinkto izoliato genomine DNR (3.1 pav.).



3.1 pav. DNR elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. Paaiškinimai: M – Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNR žymuo. 1 – *Streptomyces* sp. SK-91 izoliato genomine DNR. Tikslinis fragmentas apibrėžtas raudona spalva.

Gavus sekoskaitos rezultatus, buvo vykdomas genomo surinkimas, naudojant Shovill algoritmą, bei genomo anotavimas, naudojant Prokka įrankį. Tuomet atlikta bioinformatinė genomo analizė naudojantis SnapGene programa ir remiantis moksline literatūra atrinkti septyni fermentai galimai atsakingi už keratino skaidymą (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. *Streptomyces* genčiai priklausančio izoliato fermentai, kurie yra potencialiai atsakingi už keratino skaidymą.

Fermentas	Suteiktas fermentą koduojančio geno pavadinimas	Fermento geno dydis (bp)
Į CtpA panaši serino proteazė	<i>ker12</i>	1170
Maža ekstraląstelinė neutrali proteazė	<i>ker34</i>	657
Aminopeptidazė N	<i>ker56</i>	1491
Ekstraląstelinė peptidazė	<i>ker78</i>	1803
Į tripsiną panaši proteazė	<i>ker910</i>	789

3.1 lentelės tęsinys.

Fermentas	Suteiktas fermentą koduojančio geno pavadinimas	Fermento geno dydis (bp)
Į tripsiną panaši proteazė	<i>ker1112</i>	783
Pre-pro-metalo proteazė PrtV	<i>ker1314</i>	2409

Atrinktų genų dydis svyruoja nuo 657 bp iki 2409 bp.

3.1.1 Į CtpA panaši serino proteazė

Pasinaudojus NCBI Blastp algoritmu nustatyta, jog į CtpA panašios serino proteazės *ker12* geno seka turi 99,74 % panašumą su *Streptomyces gardneri* S41 šeimos peptidaze. Analizuojant MEROPS ir NCBI duomenų bazes, nustatytos baltymo aktyviajame centre esančios aminorūgštys, kurios sudaro katalizinę diadą: 304-oje pozicijoje esantis serinas ir 329-oje pozicijoje lizinas. Tokia katalizinė diada yra konservatyvi ir būdinga S41 šeimai priklausančioms serino proteazėms (3.2 pav.). Nustatyta, jog baltymas priklauso S41A peptidazių pošeimiui pagal aktyviojo centro sekoje, esančius motyvus: Gly-Thr-Met-Ser ir Thr-Phe-Gly-Lys.

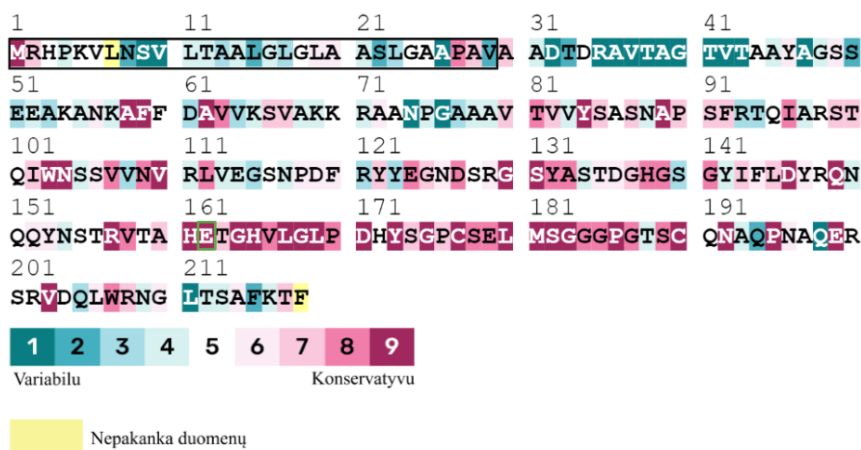


3.2 pav. *ker12* geno koduojamo į CtpA panašios serino proteazės aminorūgščių seka. Juoda spalva apibrėžtas signalinis peptidas, žalia spalva apibrėžtos katalizinės liekanos.

Literatūros analizės metu nustatyta, jog S41 šeimai priklausančios proteazės turi gebėjimą skaidyti keratino turinčius substratus, pavyzdžiui vištų plunksnas (Qiu ir kiti, 2020). 2019 m. Kang ir kiti nustatė, jog auginant *Fervidobacterium islandicum* AW-1 kamieną ant terpės papildytos vištų plunksnomis, sustiprėja S41 šeimos peptidazės sintezė ląstelėse, o tai gali būti tiesiogiai susiję su plunksnų irimu. Siekiant patvirtinti šiuos duomenis, reikalinga atlikti šio baltymo sintezę.

3.1.2 Maža ekstraląstelinė neutrali proteazė

Pasinaudojus NCBI Blastp algoritmu nustatyta, jog mažos ekstraląstelinės neutralios proteazės *ker34* geno seka turi 100 % panašumą su *Streptomyces gardneri* snapalizinio baltymu. Analizuojant MEROPS ir NCBI duomenų bazes, nustatyta, jog baltymas priklauso M7 šeimos metaloendopeptidazėms, kurioms yra būdingas konservatyvus His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-Asp motyvas. Aktyviajame centre, 162-oje pozicijoje esanti glutamo rūgštis, yra katalizinė liekana (3.3 pav.).



3.3 pav. *ker34* geno koduojamos mažos ekstraląstelinės neutralios proteazės aminorūgščių seka. Juoda spalva apibrėžtas signalinis peptidas, žalia spalva apibrėžta katalizinė liekana.

Literatūros analizės metu nustatyta, jog ši cinko metaloendoproteazė iš *Streptomyces caespitosus* yra viena iš mažiausių proteazių. Fermentas demonstruoja didelį aktyvumą skaidant plataus specifiskumo substratą – azokazeiną (Kurisu ir kiti, 1997). Siekiant patvirtinti šiuos duomenis reikalinga atlikti šio baltymo sintezę.

3.1.3 Aminopeptidazė N

Pasinaudojus NCBI Blastp algoritmu nustatyta, jog aminopeptidazės N *ker56* geno seka turi 100 % panašumą su *Streptomyces gardneri* M1 šeimai priklausančia metalopeptidaze. Atlikus analizę naudojant MEROPS ir NCBI duomenų bazes, nustatyta jog tikslinis baltymas priklauso M1 šeimai, nes katalizinį cinko joną jungia du histidiniai ir glutamatas. Histidiniai yra His-Glu-X-X-His motyve vienoje ilgoje spiralėje, o glutamatas kitoje antilygiagrečioje spiralėje. Manoma, kad katalizinis mechanizmas priklauso nuo vandens molekulės aktyvavimo cinko jonu. Žinoma, kad glutamatas esantis 325-oje pozicijoje yra svarbus katalizei, tačiau taip pat šiame procese gali būti įtrauktas ir tirozinas esantis 374-oje pozicijoje (3.4 pav).



3.4 pav. *ker56* geno koduojamos aminopeptidazės N aminorūgščių seka. Juoda spalva apibrėžtas signalinis peptidas, žalia spalva apibrėžtos katalizinės liekanos.

Literatūros analizės metu nustatyta, jog aminopeptidazė randama *Streptomyces fradiae* var. k11 kamiene yra atsakinga už keratino degradaciją vištų plunksnose. Mokslininkai sėkmingai susintetino rekombinantinį baltymą *E. coli* BL21 (DE3) kamieno ląstelėse. Nustatyta, jog genas be C-galo propeptido koduoja funkcionalų fermentą. Išgryninto rekombinantinio baltymo aktyvumui optimali temperatūra nustatyta 60 °C ir pH 8 (B. Wu ir kiti, 2010). Norint išsiaiškinti, ar šio darbo metu tiriamas fermentas turi keratinolizinį aktyvumą, reikia atlikti šio baltymo sintezės eksperimentus.

3.1.4 Ekstraląstelinė peptidazė

Pasinaudojus NCBI Blastp algoritmu nustatyta, jog ekstraląstelinės peptidazės *ker78* geno seka turi 100 % panašumą su *Streptomyces gardneri* S8 šeimai priklausančia serino peptidaze. Atlikus analizę naudojant MEROPS ir NCBI duomenų bazes, nustatytos baltymo aktyviajame centre esančios aminorūgštys, kurios sudaro katalizinę triadą: 169-oje pozicijoje esanti asparto rūgštis, 230-oje pozicijoje histidinas ir 420-oje pozicijoje esantis serinas. Tokia katalizinė triada yra konservatyvi ir būdinga S8 šeimos S8A pošeimiui, nes turi atitinkamus motyvus: Asp-Thr-Gly, His-Gly-Thr-His ir Gly-Thr-Ser-Met-Ala-X-Pro (3.5 pav.).



3.5 pav. *ker78* geno koduojamos ekstraląstelinės peptidazės aminorūgščių seka. Juoda spalva apibrėžtas signalinis peptidas, žalia spalva apibrėžtos katalizinės liekanos.

Literatūros analizės metu nustatyta, jog S8 šeimai priklausančios peptidazės gali turėti keratinolizinį aktyvumą. S8 šeima šiuo metu yra antra pagal dydį serino proteazių šeima ir iki šiol plačiausiai apibūdinta. Dauguma keratinazių yra S8A pošeimyje, įskaitant septynias keratinazes, pateiktas 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. S8A šeimai priklausančios keratinazės bei jų šeiminkai.

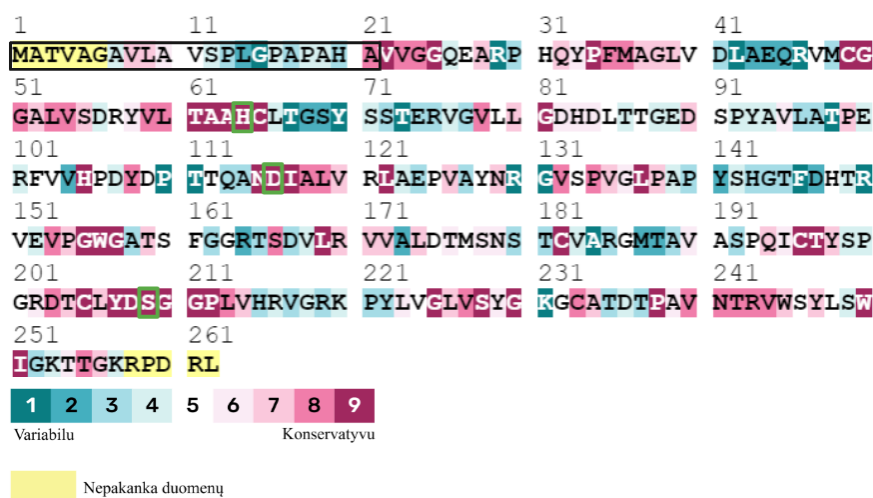
Organizmas	Keratinazės pavadinimas	Šaltinis
<i>B. licheniformis</i> RPK	KerRP	(Fakhfakh ir kiti, 2009)
<i>S. maltophilia</i>	KerSMD	(Fang ir kiti, 2014)
<i>S. maltophilia</i>	KerSMF	(Fang ir kiti, 2014)
<i>B. pumilus</i> A1	KerA1	(Fakhfakh-Zouari ir kiti, 2010)
<i>B. cereus</i> DCUW	Vpr	(Ghosh ir kiti, 2009)
<i>Thermoactinomyces</i> sp. CDF	Protease C2	(L. Wang ir kiti, 2015)
<i>Meiothermus taiwanensis</i> WR-220	rMtaKer	(W. L. Wu ir kiti, 2017)

Pavyzdžiui, remiantis literatūros šaltiniais, *S. maltophilia* BBE11-1 kamieno sintetamos KerSMD ir KerSMF serino peptidazės priklauso S8A šeimai ir geba skaidyti keratino turinčius substratus. Šias keratinazes koduojantys genai buvo klonuojami į pET22b(+) vektorių, o sintezė vykdoma *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse. Nustatyta, jog šios keratinazės, sintetamos su signaliniais peptidais, nėra kataliziškai aktyvios, o tai rodo, kad *E. coli* ląstelės negeba skelti šios sekos arba

keratinazės yra netinkamai sulankstomos *E. coli* ląstelėse (Fang ir kiti, 2014). Atsižvelgiant į tai, šio darbo metu, konstruktai kuriami su ir be signalinių sekų, siekiant gauti aktyvų fermentą.

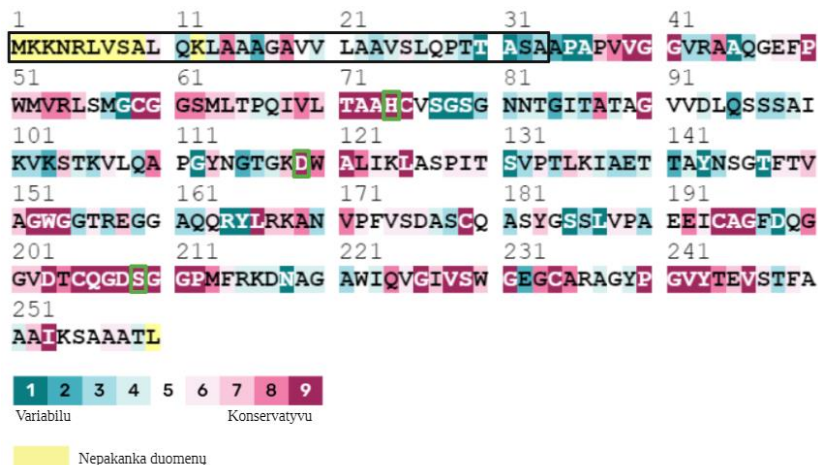
3.1.5 Į tripsiną panaši proteazė

Pasinaudojus NCBI Blastp algoritmu nustatyta, jog *ker910* geno, kuris koduoja tikslinį baltymą, seka turi 100 % panašumą su *Streptomyces gardneri* serino proteaze. Naudojant MEROPS ir NCBI duomenų bazes, nustatytos fermento aktyviajame centre esančios aminorūgštys, kurios sudaro katalizinę triadą: 64-oje pozicijoje esantis histidinas, 116-oje pozicijoje aspartatas ir 209-oje pozicijoje esantis serinas. Tokia katalizinė triada yra būdinga serino proteazėms (3.6 pav.). Nustatyta, jog baltymas priklauso S1C peptidazių pošeimiui pagal aktyviojo centro sekoje, esančius motyvus: Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys, Aps-Ile-Ala-Leu-Val-Arg ir Tyr-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu.



3.6 pav. *ker910* geno koduojamos į tripsiną panašios proteazės aminorūgščių seka. Juoda spalva apibrėžtas signalinis peptidas, žalia spalva apibrėžtos katalizinės liekanos.

Pasinaudojus NCBI Blastp algoritmu nustatyta, jog į tripsiną panašios proteazės *ker1112* geno seka turi 100 % panašumą su *Streptomyces gardneri* serino proteaze. Naudojant MEROPS ir NCBI duomenų bazes, nustatytos fermento aktyviajame centre esančios aminorūgštys, kurios sudaro katalizinę triadą: 74-oje pozicijoje esantis histidinas, 119-oje pozicijoje aspartatas ir 209-oje pozicijoje esantis serinas. Tokia katalizinė triada yra būdinga serino proteazėms (3.7 pav.).

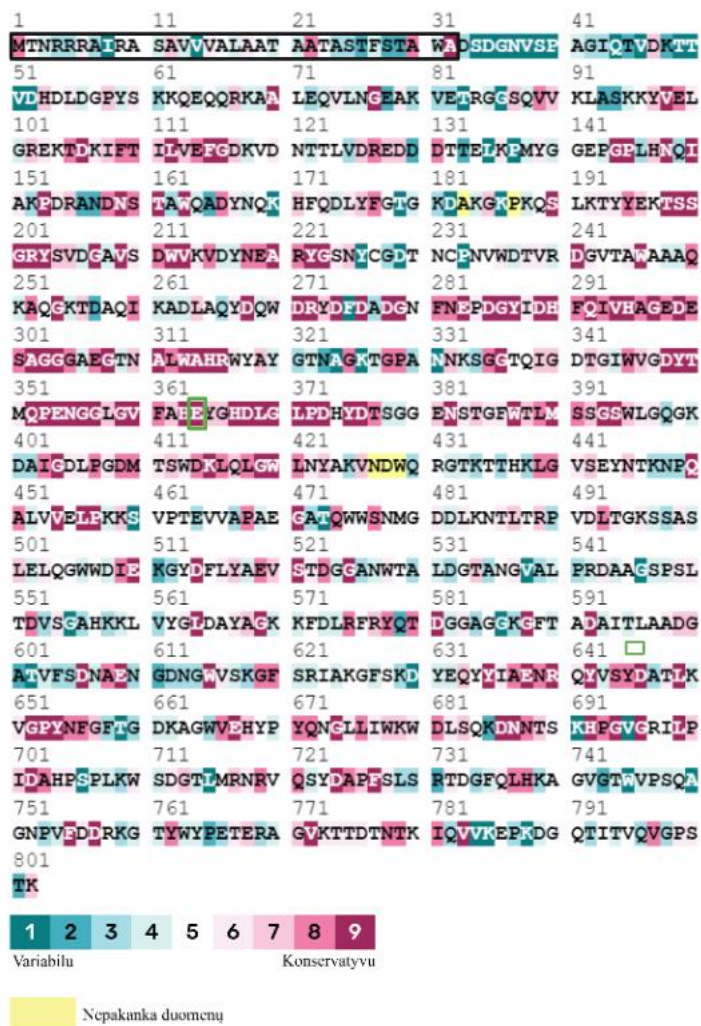


3.7 pav. *ker1112* geno koduojamos į tripsiną panašios proteazės aminorūgščių seka. Juoda spalva apibrėžtas signalinis peptidas, žalia spalva apibrėžtos katalizinės liekanos.

Literatūros analizės metu nustatyta, jog į tripsiną panaši serino proteazė iš *Bacillus* sp. 8A6 kamieno gali prisidėti prie vištų plunksnų ir gyvulių šerių bei kanopų skaidymo (Huang ir kiti, 2020). Mokslininkai nustatė, kad tirtuose keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčiose kultūrose auginamose terpėje su keratinu yra sintetinama daug į tripsiną panašios proteazės fermentų. Pirmą kartą į tripsiną panaši proteazė, prisidėjusi prie keratino skaidymo, buvo išskirta iš *B. licheniformis* kamieno auginamo su maltomis vištų plunksnomis (Rozs ir kiti, 2001).

3.1.6 Pre-pro-metalo proteazė PrtV

Pasinaudojus NCBI Blastp algoritmu nustatyta, jog pre-pro-metalo proteazės PrtV genas *ker1314* turi 100 % sekos panašumą su *Streptomyces gardneri* A domeną turinčiu baltymu, priklausančiu M6 baltymų šeimai. Naudojant MEROPS ir NCBI duomenų bazes, nustatytos fermento aktyviajame centre esančios aminorūgštys. Aktyviajame centre, 364-oje pozicijoje esanti glutamo rūgštis, yra katalizinė liekana. Nustatyta, jog baltymas priklauso M6 peptidazių pošeimiui pagal aktyviojo centro sekoje, esantį motyvą His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-Asp (3.8 pav.). Šį motyvą galima sutikti ir M7 šeimai priklausančių baltymų sekose.

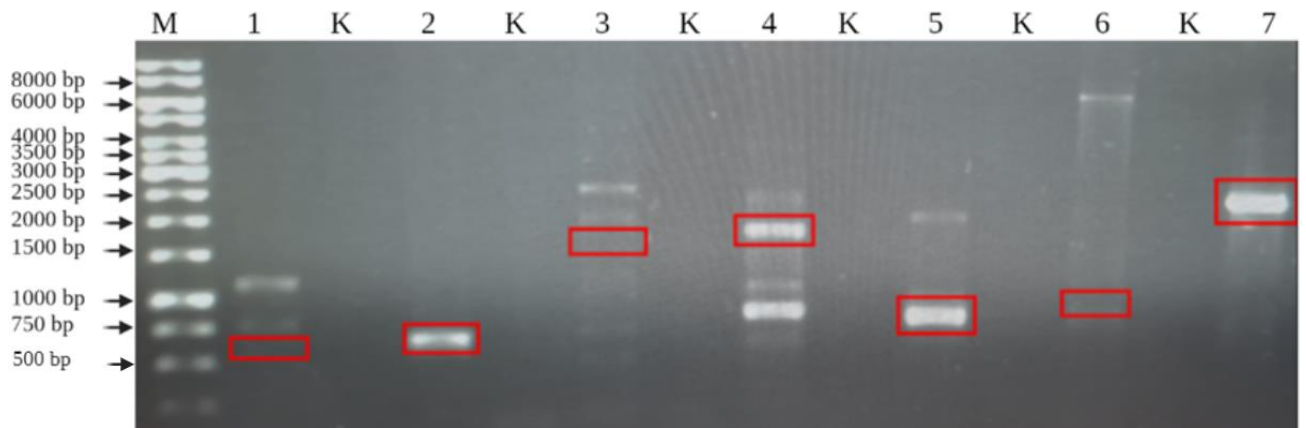


3.8 pav. *ker1314* geno koduojamos pre-pro-metalo proteazė PrtV aminorūgščių seka. Juoda spalva apibrėžtas signalinis peptidas, žalia spalva apibrėžta katalizinė liekana.

Literatūroje aprašytas PrtV metaloproteazės proteolizinis aktyvumas skaidant fibrilinį baltymą fibrinogeną (Edwin ir kiti, 2014). Taip pat literatūroje aprašytas iš jūrinių aktinobakterijų *Streptomyces* sp. G11C išskirtas baltymas priklausantis M6 proteazių šeimai, kuris prisideda prie keratino turinčių substratų skaidymo (González ir kiti, 2020). Siekiant išsiaiškinti, ar tikslinis šio darbo fermentas galėtų skaidytų keratiną, pirmiausia reikia atlikti šio baltymo sintezę.

3.2 Hipotetinių keratinolizinių fermentų genų klonavimas

Naudojantis tikslinių fermentų genų sekomis, sukurti PGR pradmenys, siekiant pagausinti genus, koduojančius hipotetinius keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčius baltymus. Pradmenų sekos pateiktos 2.3 lentelėje.



3.9 pav. PGR produktų elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. Paaiškinimai: M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo; 1 – ĩ CtpA panašios serino proteazės genas (*ker12*). 2 – mažos ekstraląstelinės neutralios proteazės genas (*ker34*). 3 – aminopeptidazės N genas (*ker56*). 4 – ekstraląstelinės peptidazės genas (*ker78*). 5 – ĩ tripsiną panašios peptidazės genas (*ker910*). 6 – ĩ tripsiną panašios peptidazės genas (*ker1112*). 7 –pre-pro-metalo proteazės PrtV genas (*ker1314*). K – PGR mišinys be DNR. Raudona spalva apibrėžti tikslinių genų dydžiai.

Žvelgiant ĩ elektroforezės agaroziniame gelyje nuotrauką (3.9 pav.) galime teigti, jog PGR metodu sėkmingai pavyko padauginti mažos ekstraląstelinės neutralios proteazės geną *ker34*, ekstraląstelinės peptidazės geną *ker78*, ĩ tripsiną panašios proteazės geną *ker910* ir pre-pro-metalo proteazės PrtV geną *ker1314*. Likusių tikslinių genų galėjo nepavykti pagausinti dėl keletos priežasčių. Gal buvo naudojamas per mažas PGR ciklų skaičius arba per trumpa DNR sintezės trukmė, todėl nebuvo pagausinti tiksliniai fragmentai. Taip pat gali būti, jog buvo naudojama per trumpa pradmenų prilydymo trukmė. Gelyje matoma ir nespecifiškai padaugintų fragmentų, kurie galėjo susidaryt dėl per ilgo sintezės etapo trukmės (Lorenz, 2012). Dėl šios priežasties, siekiant išsigryninti tikslinius fragmentus, buvo atliekamas gryninimas iš gelio. Sėkmingai padaugintiems genams buvo atlikta sekoskaita.

In silico analizė parodė, jog PGR metu padaugintas ekstraląstelinės neutralios proteazės genas *ker34* atitinka teorinį 657 bp dydį. Baltymą sudaro 218 aminorūgštys, kurio molekulinė masė siekia 22951,34 Da (Apskaičiuota naudojant ProtParam programą). Naudojant SignalP-5.0 programą buvo identifikuotas 29 aminorūgščių signalinis peptidas (Pre-seka). Pašalinus šį peptidą gaunamas 189 aminorūgščių subrendęs baltymas, kurio molekulinė masė 20169,98 Da. Teorinis geno dydis bei seka sutapo su šio tyrimo metu identifikuotu fermentu.

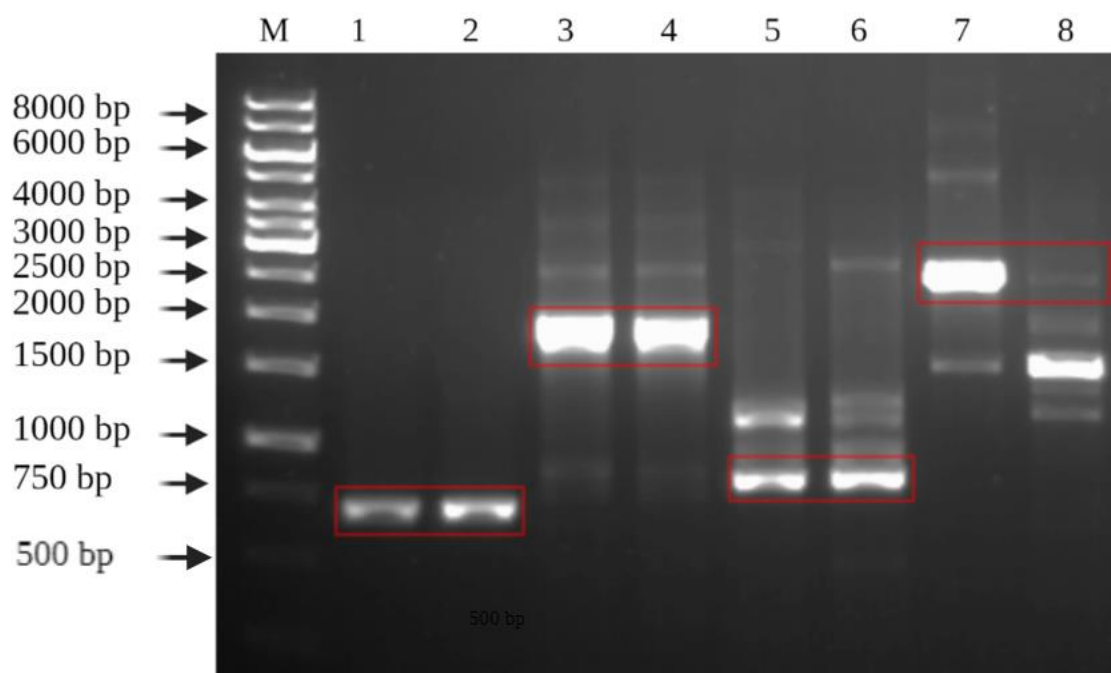
Bioinformatinė analizė parodė, jog PGR metu padaugintas ekstraląstelinės neutralios proteazės genas *ker78* atitinka teorinį 1803 bp geno dydį. Šį hipotetinį keratinolizinį baltymą sudaro 600 aminorūgščių, o molekulinė masė siekia 60393,49 Da (Apskaičiuota naudojant ProtParam programą). Naudojant SignalP-5.0 programą buvo nustatytas 31 aminorūgščių signalinė seka. Pašalinus šią seką gaunamas 569 aminorūgščių subrendęs baltymas, kurio molekulinė masė 57716,38 Da. Teorinis geno dydis bei seka sutapo su šio tyrimo metu identifikuotu fermentu.

In silico analizė atskleidė, jog PGR metu padaugintas ĩ tripsiną panašios proteazės genas *ker910* atitinka teorinį 789 bp dydį. Šį hipotetinį keratinolizinį baltymą sudaro 262 aminorūgštys, o molekulinė baltymo masė siekia 27644,32 Da (Apskaičiuota naudojant ProtParam programą). Atlikus analizę su

SignalP-5.0 programa, buvo nustatytas 21 aminorūgšties signalinis peptidas. Šią seką pašalinus, gaunamas 241 aminorūgščių subrendęs baltymas, kurio molekulinė masė 25761,08 Da. Teorinis geno dydis bei seka sutapo su šio tyrimo metu identifikuotu fermentu.

Bioinformatinė analizė atskleidė, jog PGR metu padaugintas Pre-pro-metalo proteazės PrtV genas *ker1314* atitinka teorinį 2409 bp dydį. Šį hipotetinį keratinolizinį baltymą sudaro 802 aminorūgštys, o molekulinė baltymo masė siekia 87610,24 Da (Apskaičiuota naudojant ProtParam programą). Pasinaudojus SignalP-5.0 programa, buvo aptiktas 32 aminorūgšties signalinis peptidas. Šią seką pašalinus, gaunamas 770 aminorūgščių subrendęs baltymas, kurio molekulinė masė 84334,46 Da. Teorinis geno dydis bei seka sutapo su šio tyrimo metu identifikuotu fermentu.

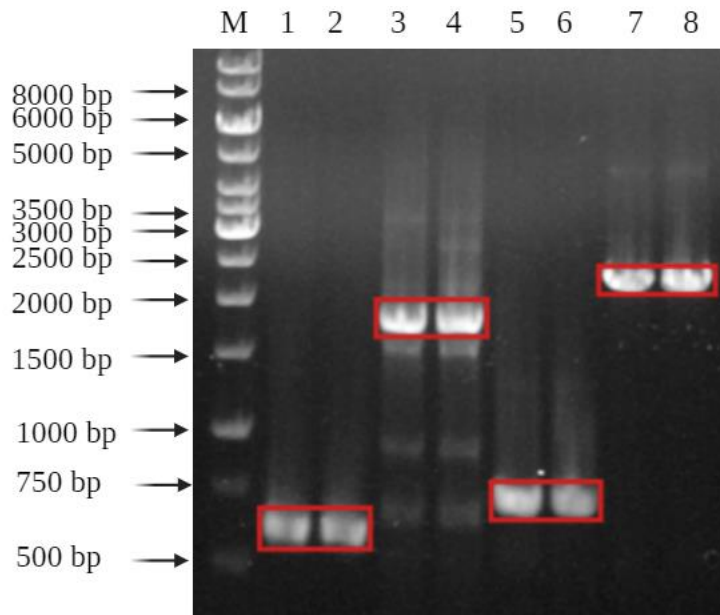
Pagal žinomas genų *ker34*, *ker78*, *ker910* ir *ker1314* sekas kuriami pradmenys su *NdeI* ir *XhoI* restrikcijos endonukleazių atpažinimo taikiniais genų pradžioje ir gale (2.3 lentelė), kurie yra reikalingi siekiant tikslius genus įsiūti į raiškos vektorius. Taip pat, kuriami pradmenys, siekiant pagausinti fermentų genų sekas be signalinio peptido (2.3 lentelė). Atliekamas PGR, siekiant pagausinti fragmentus su restrikcijos fermentų atpažinimo vietomis.



3.10 pav. PGR produktų elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. Pagausinti genai su signalinėmis sekomis. M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo; 1,2 – mažos ekstraląstelinės neutralios proteazės genas *ker34* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 3, 4 – ekstraląstelinės peptidazės genas *ker78* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 5,6 – į tripsiną panašios peptidazės genas *ker910* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 7, 8 – Pre-pro-metalo proteazės PrtV genas *ker1314*, į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. Raudona spalva apibrėžti tikslių genų dydžiai.

Analizuojant agarozės gelio elektroforezės nuotrauką (3.10 pav.), matoma, jog naudojant pradmenis su restrikcijos atpažinimo vietomis *NdeI* ir *XhoI*, sėkmingai pagausinti visi genai su signalinėmis sekomis, išskyrus pre-pro-metalo proteazės PrtV geną, kuris turėjo būti klonuojamas į pET28b(+) vektorius. Genas *ker34* matomas ties ~658 bp žymeniu, genas *ker78* matomas ties ~1803 bp riba, genas *ker910* ties ~789bp žymeniu, o genas *ker1314* matomas prie ~2409 bp ribos. Siekiant

pagausinti geną *ker1314* klonuojamą į pET28b(+), matoma ryškių nespecifinių fragmentų. Taip galėjo įvykti dėl nespecifinio pradmenų prilydimo, dimerų susidarymo (Garafutdinov ir kiti, 2020).

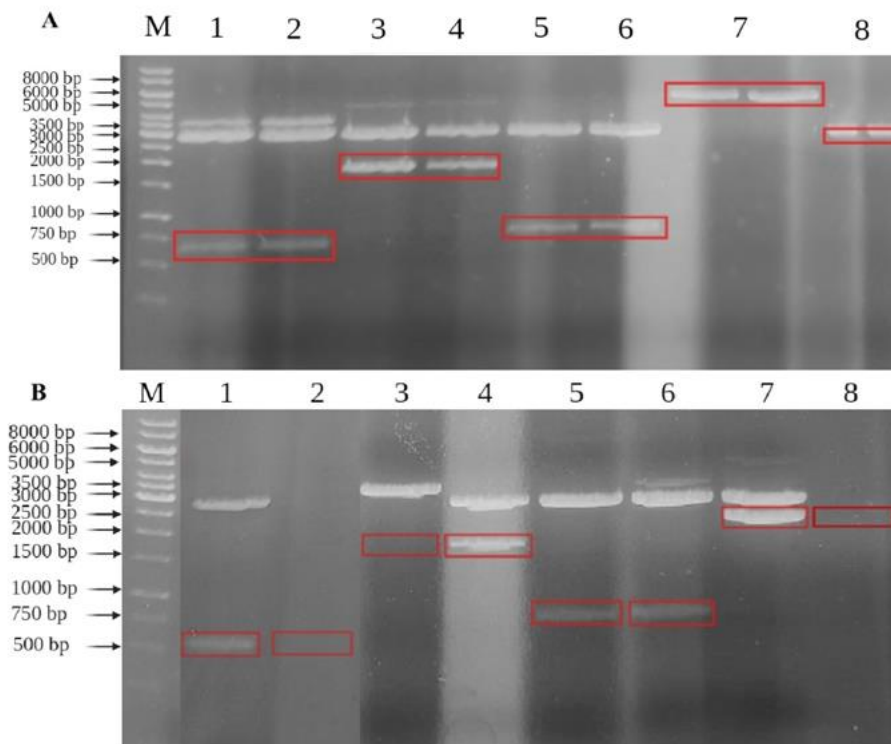


3.11 pav. PGR produktų elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. Pagausinti genai be signalinių sekų. M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo; 1,2 – mažos ekstraląstelinės neutralios proteazės genas *ker34* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 3, 4 – ekstraląstelinės peptidazės genas *ker78* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 5,6 – į tripsiną panašios peptidazės genas *ker910* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 7, 8 – Pre-pro-metalo proteazės PrtV genas *ker1314*, į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. Raudona spalva apibrėžti tikslinių genų dydžiai.

Žvelgiant į agarozės gelio elektroforezės nuotrauką (3.11 pav.), galima daryti išvadą, jog, naudojant pradmenis su restrikcijos atpažinimo vietomis *NdeI* ir *XhoI*, sėkmingai pagausinti visi keturi genai be signalinių sekų, kurie bus klonuojami į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. Genas *ker34* matomas ties ~570 bp žymeniu, genas *ker78* matomas ties ~1710 bp riba, genas *ker910* ties ~726bp žymeniu, o genas *ker1314* matomas prie ~2313 bp ribos.

PGR metu buvo naudota aukšto našumo, mažai klaidų daranti *Phusion* polimerazė (2.5), kuri generuoja bukus padaugintų fragmentų galus, todėl pasirinkta tikslinių genų klonavimą vykdyti naudojant pJET1.2/blunt klonavimo vektorius. Atlikus ligavimą (2.12), buvo vykdyta cheminė konstrukto transformacija (2.8) į kompetentines *Escherichia coli* DH5α ląsteles (2.7).

Transformantams užaugus ant LB terpės su ampicilinu, buvo skiriama plazmidinė DNR (2.10) ir restrikcinės analizės metodu (2.11) patikrinta, ar ligavimo reakcija pavyko. Restrikcijai vykdyti buvo pasirinktos restrikcijos endonukleazės *NdeI* ir *XhoI*. Šie fermentai parinkti, nes sekančio žingsnio metu tiksliniai genai buvo liguojami į raiškos vektorius pET-21c(+) ir pET-28b(+), kurie buvo karpomi *NdeI* ir *XhoI* restriktazėmis.



3.12 pav. Restrikcijos produktų elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. **A)** Iškerpami tiksliniai genai su signalinėmis sekomis. M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo. 1,2 – *ker34* genas, klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 3, 4 – *ker78* genas, klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 5,6 – *ker910* genas, klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 7, 8 – pET21c(+) ir pET28b(+) vektoriai, karpyti *NdeI* ir *XhoI*; 8 – *ker1314* genas, klonuojamas į pET21c(+) B) Iškerpami tiksliniai genai be signalinių sekų. M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo. 1, 2 – *ker34* genas, klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 3, 4 – *ker78* genas, klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 5, 6 – *ker910* genas, klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 7, 8 – *ker1314* genas, klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. Raudona spalva apibrėžti tikslinių genų dydžiai.

Iš elektroforezės rezultatų (3.12 pav.) galime teigti, kad restrikcijos reakcijos pavyko su pJET1.2/blunt vektoriais, turinčiais *ker34*, *ker78* bei *ker910* genus su signaline seka. Taip pat nuotraukoje matomi linearizuoti pET21c(+) ir pET28b(+) vektoriai, su iškirptais daugybinio klonavimo regionais (3.12 pav. A). Iš klonavimo vektorių pJet1.2/blunt taip pat sėkmingai iškirpti *ker34*, *ker78*, *ker910* genai be signalinių peptidų, kurie ateityje bus klonuojami į pET28b(+) vektorių bei *ker1314* genas be signalinės sekos, kuris bus klonuojamas į pET21c(+) vektorių (3.12 pav. B). Su likusiais mėginiais restrikcijos reakcija nepavyko. 3.12 pav. A dalies 8 mėginyje bei B dalies 3 mėginyje matoma, jog restrikcijos reakcija neįvyko. Taip galėjo nutikti, nes galbūt įvyko restrikcijos fermentų atpažinimo vietos mutacija, todėl restrikcijos endonukleazės negalėjo hidrolizuoti reikiamos srities (Pelley, 2012). 3.12 pav. B dalies 2 ir 8 mėginiuose nesimato nei tikslinių fragmentų, nei linearizuoto vektoriaus, todėl daroma išvada, kad restrikcijos reakcija nepavyko, nes reakcijos mišinyje buvo naudota netinkama, galimai mutuoja plazmidė.

Po restrikcinės analizės (2.11) iš gelio išgryninti tiksliniai fragmentai turi tiek 3', tiek 5' lipnius galus ir gali būti liguojami į pET serijos raiškos vektorius (2.12). Ši vektorių sistema pasirinkta, nes yra galingiausia rekombinantinių baltymų klonavimo ir raiškos sistema *E. coli* ląstelėse (L. Li ir kiti, 2022).

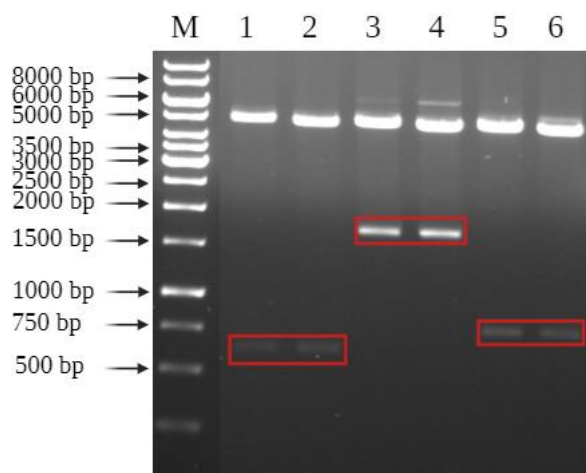
pET-21c(+) vektorius pasirinktas, nes rekombinantinio baltymo C gale galime turėti His inkarinę seką, o pET-28b(+) vektorius pasirinktas, nes His inkarinę seką galime turėti N baltymo gale. Raiškai skirti konstruktai buvo ruošiami su ir be signalinių sekų (3.3 lentelė).

3.3 lentelė. Šio darbo metu sukurti konstruktai.

Konstruktas	Aprašymas
pET-21c/ <i>ker34</i>	Baltymas su signaline seka
pET-21c/ <i>ker78</i>	
pET-21c/ <i>ker910</i>	
pET-21c/ <i>ker1314</i>	
pET-28b/ <i>ker34</i>	
pET-28b/ <i>ker78</i>	
pET-28b/ <i>ker910</i>	
pET-21c/ <i>ker34</i>	Baltymas be signalinės sekos
pET-21c/ <i>ker78</i>	
pET-21c/ <i>ker910</i>	
pET-21c/ <i>ker1314</i>	
pET-28b/ <i>ker34</i>	
pET-28b/ <i>ker78</i>	
pET-28b/ <i>ker910</i>	
pET-28b/ <i>ker1314</i>	

Šių konstrukčių paruošimas yra svarbus tam, kad patikrinti signalinės sekos ir papildomų gryninimo inkarinių sekų įtaką funkcionaliam baltymo susilankstymui ir sekrecijai.

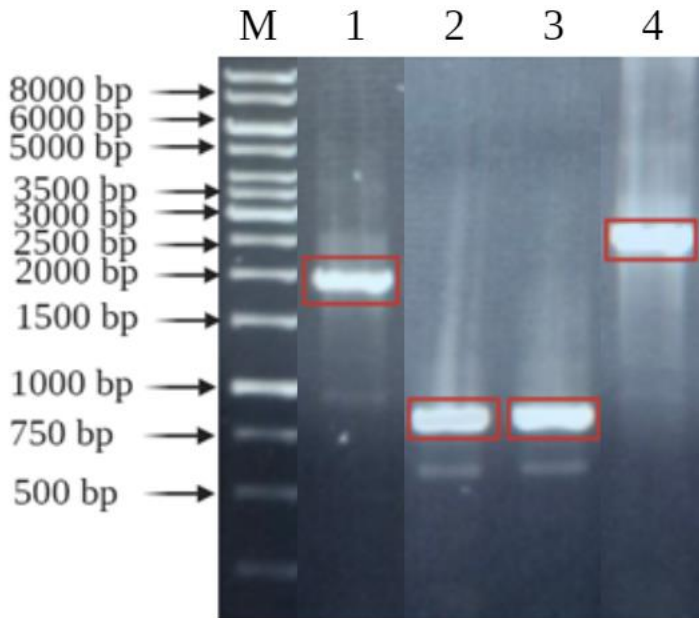
Gautais konstruktais transformuotos *E. coli* DH5 α ląstelės (2.8) bei išsėtos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu. Siekiant atrinkti teigiamus transformantus, ląstelėms galimai turinčioms tikslinius genus su signalinėmis sekomis, skiriama pDNR ir atliekama restrikcijos reakcija (2.11). Transformantams, kurių konstrukčių tiksliniai genai neturi signalinio peptido sekos, atliekamas kolonijų PGR (2.13).



3.13 pav. Restrikcijos produktų elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. Kerpami tiksliniai genai su signalinėmis sekomis naudojant *NdeI* ir *XhoI* restrikcijos endonukleazes. M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo. 1,2 – mažos ekstraląstelinės neutralios proteazės genas *ker34* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 3, 4 – ekstraląstelinės peptidazės genas *ker78* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius. 5,6 – į tripsiną panašios peptidazės genas *ker910* klonuojamas atitinkamai į pET21c(+) ir pET28b(+) vektorius.

vektorius. Raudona spalva apibrėžti tikslinių genų dydžiai.

Žvelgiant į restrikcinės analizės rezultatus (3.13 pav.), galime teigti, jog *E. coli* DH5 α ląsteles pavyko transformuoti su pET21c(+) ir pET28b(+) vektorių konstruktais. Šie konstruktai turi *ker34*, *ker78* ir *ker910* genus su signalinių peptidų sekomis.



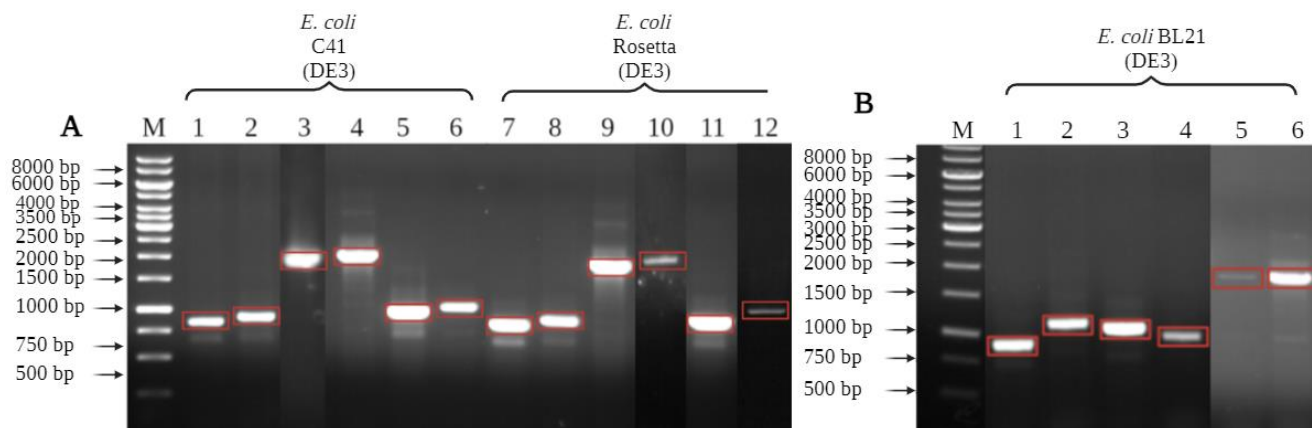
3.14 pav. Kolonijų PGR produktų elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. Genai pagausinti be signalinės sekos. M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo. 1 – *ker78* padaugintas nuo pET28b(+) vektoriaus. 2 – *ker910* padaugintas nuo pET21c(+) vektoriaus. 3 – *ker910* padaugintas nuo pET28b(+) vektoriaus. 4 – *ker1314* padaugintas nuo pET21c(+) vektoriaus. Mėginiai padauginti vykdant kolonijų PGR nuo *E. coli* DH5 α ląstelių. Raudona spalva apibrėžti tikslinių genų dydžiai.

Atlikus kolonijų PGR, siekiant atrinkti teigiamus transformantus, matoma (3.14 pav.), jog transformacija taip pat buvo sėkminga su pET21c(+) vektoriaus konstruktu, turinčiu *ker1314* geną be signalinės sekos bei su pET28b(+) vektoriaus konstruktais, turinčiais *ker78* ir *ker910* genus be signalinių peptidų sekų. Tiksliniai genai *ker34*, *ker78* bei *ker910* elektroforezės nuotraukoje matomi šiek tiek didesnio dydžio negu jų seka, nes produktų pagausinimui buvo naudoti pradmenys, kurie padaugina visą seką, kuri yra tarp vektoriaus promotoriaus ir terminatoriaus.

Transformacija su likusiais konstruktais nepavyko, nes gali būti, jog ligavimo reakcija buvo nesėkminga arba buvo naudota per daug ligato. Ligavimo reakcijos mišinio komponentai (pvz., DNR ligazė) gali trukdyti kompetentinėms bakterijoms pasisavinti DNR (Green ir Sambrook, 2018). Taip pat, gali būti, jog ant lėkštelių buvo užsėtas per didelis ląstelių kiekis. Ląstelės suskaidė antibiotiką, todėl užaugo daug kolonijų, kurios neturėjo tiksulinio konstrukto (Bacterial Transformation Troubleshooting..., 2024). Kolonijų PGR galėjo būti nesėkmingas ir dėl per didelio biomasės kiekio PGR reakcijos mišinyje.

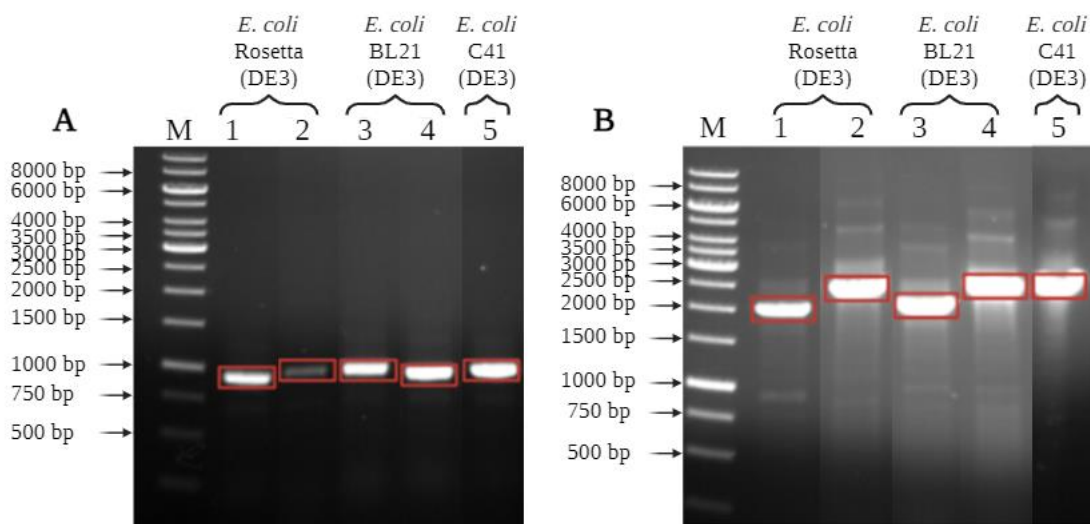
Išskirtos teigiamų transformantų plazmidės (2.10) buvo chemiškai transformuojamos į kompetentines *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3) ir C41 (DE3) raiškos kamieno ląsteles (2.8).

Transformantai auginami standžioje LB terpėje su atitinkamu (-ais) antibiotiku (-ais) 37 °C temperatūroje 12 valandų. Teigiama transformantų atranka vykdoma naudojant kolonijų PGR metodą (2.12).



3.15 pav. Kolonijų PGR produktų elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo; Podauginti fragmentai su signalinėmis sekomis. A) 1, 2 – *ker34* padaugintas nuo pET21c(+) ir pET28b(+) vektorių atitinkamai. 3, 4 – *ker78* padaugintas nuo pET21c(+) ir pET28b(+) vektorių atitinkamai. 5, 6 – *ker910* padaugintas nuo pET21c(+) ir pET28b(+) vektorių atitinkamai. 7, 8 – *ker34* padaugintas nuo pET21c(+) ir pET28b(+) vektorių atitinkamai. 9, 10 – *ker78* padaugintas nuo pET21c(+) ir pET28b(+) vektorių atitinkamai. 11, 12 – *ker910* padaugintas nuo pET21c(+) ir pET28b(+) vektorių atitinkamai. B) 1 – *ker34* padaugintas nuo pET21c(+) vektoriaus. 2 – *ker910* padaugintas nuo pET28b(+) vektoriaus. 3 – *ker910* padaugintas nuo pET21c(+) vektoriaus. 4 – *ker34* padaugintas nuo pET28b(+) vektoriaus. 5 – *ker78* padaugintas nuo pET21c(+) vektoriaus. 6 – *ker78* padaugintas nuo pET28b(+) vektoriaus. Raudona spalva apibrėžti tikslinių genų dydžiai.

Žvelgiant į kolonijų PGR rezultatus (3.15 pav.) matoma, jog *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3) ir C41 (DE3) ląstelių transformacija su pET21c(+) ir pET28b(+) vektorių konstruktais, turinčiais tikslinius genus su signalinėmis sekomis, pavyko. Sėkmingai padauginti tiksliniai *ker34*, *ker78* bei *ker910* genai.



3.16 pav. Kolonijų PGR produktų elektroforezė agaroziniame (0,8 %) gelyje. Genai pagausinti be signalinės sekos. M – GeneRuler™ 1 kb DNR žymuo; A) 1, 4, 5 – *ker910* padaugintas nuo pET21c(+) vektoriaus. 2, 3 – *ker910* padaugintas nuo pET28b(+) vektoriaus. B) 1, 3 – *ker78* padaugintas nuo pET28b(+) vektoriaus. 2, 4, 5 – *ker1314* padaugintas nuo pET21c(+) vektoriaus. Raudona spalva apibrėžti tikslinių genų dydžiai.

Iš 3.16 paveiksle pateiktų kolonijų PGR rezultatų taip pat galima daryti išvadą, jog *E. coli* BL21

(DE3) ir Rosetta (DE3) kamienų transformacija buvo sėkminga su visais konstruktais. *E. coli* C41 (DE3) ląstelių transformacija buvo sėkminga su pET-21c/*ker910* ir pET-21c/*ker1314* konstruktais.

3.3 Hipotetinių keratinolizinių aktyvumą turinčių fermentų sintezė

Siekiant susintetinti galimai keratinolizinius rekombinantinius baltymus, svarbu optimizuoti sintezės sąlygas. Atliekant heterologinę raišką svarbu pasirinkti tinkamą raiškos organizmą. Šio darbo metu, siekiant susintetinti rekombinantinius baltymus, buvo naudojami trys skirtingi *E. coli* raiškos kamieniai. *E. coli* BL21 (DE3) kamienas pasirinktas, nes remiantis literatūros šaltiniais, yra tinkamas rekombinantinių baltymų sintezei bei vienas dažniausiai naudojamų raiškai skirtų kamienų. Be to, pasižymi dideliu transformacijos efektyvumu (Du ir kiti, 2021). Rosetta (DE3) kamienas pasirinktas, nes puikiai tinka baltymų sintezei, kurių genai turi retai *E. coli* naudojamų kodonų, kurie gali trukdyti transliacijai (Novy ir kiti, 2001). C41 (DE3) kamienas pasirinktas, nes gali padėti susintetinti funkcionalius rekombinantinius baltymus, kurie yra toksiški ląstelei (Webb ir Lithgow, 2020).

Kita svarbi rekombinantinių baltymų indukcijos sąlyga – ląstelių auginimo trukmė po indukcijos. Baltymo raiška priklauso nuo inkubacijos laiko. Jei auginimo trukmė trumpa, gali neužtekti laiko baltymo raiškai pasireikšti, o jei per ilga, rekombinantinis baltymas gali degraduoti ar netaisyklingai susilankstyti (Gutiérrez-González ir kiti, 2019). Dėl šios priežasties, siekiant nustatyti optimalų auginimo laiką, po indukcijos, iš augančių ląstelių kas valandą pirmas tris valandas ir 24-tą valandą buvo paimami indukuotų ir neindukuotų ląstelių mėginiai.

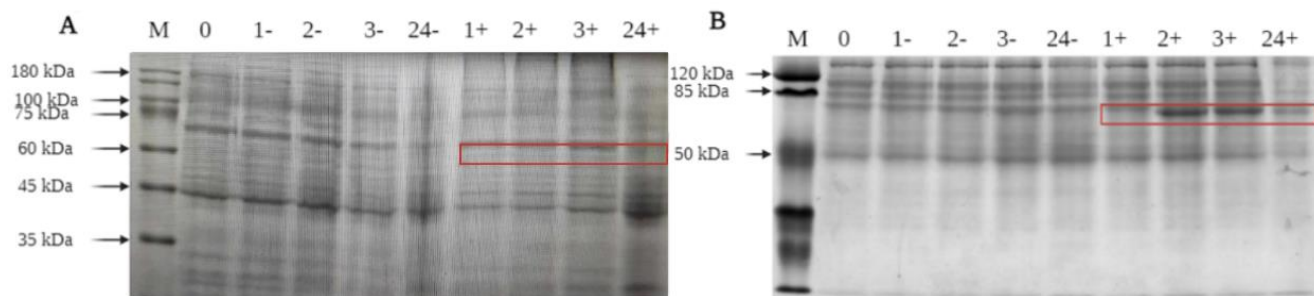
Induktoriaus koncentracija taip pat yra svarbus faktorius lemiantis rekombinantinio baltymo sintezės sėkmę. Jei bus naudojamas per mažas IPTG kiekis, jo gali neužtekti indukuoti rekombinantinio baltymo sintezę, o jei yra naudojama per didelė indukatoriaus koncentracija, ląstelės nukreipia per daug išteklių į baltymų sintezę ir jų augimo greitis sulėtėja (Browning ir kiti, 2017). Nors IPTG paprastai yra mažiau toksiškas nei kai kurie kiti induktoriai, didelėmis koncentracijomis jis vis tiek gali daryti toksinį poveikį *E. coli* ląstelėms. O tai taip pat gali lemti sumažėjusį augimo greitį ar net ląstelių lizę (Dvorak ir kiti, 2015). Optimali IPTG koncentracija gali skirtis priklausomai nuo sintetiamo baltymo ir naudojamo *E. coli* kamieno. Svarbu paminėti, jog reikia optimizuoti IPTG koncentraciją kiekvienai naujai baltymų sintezės sistemai, kad sintezės lygis būtų suderintas su ląstelių gyvybingumu. Šio darbo metu, siekiant nustatyti optimalią indukatoriaus koncentraciją rekombinantinių baltymų sintezei, buvo naudojama 0,5 mM ir 1 mM IPTG koncentracija.

Taigi, šio darbo metu buvo siekiama optimizuoti baltymų biosintezės sąlygas. Šiam tikslui pasiekti svarbu pasirinkti tinkamą heterologinę šeimininką rekombinantinių baltymų sintezei, nustatyti optimalią indukatoriaus koncentraciją bei tinkamą indukcijos trukmę (3.4 lentelė).

3.4 lentelė. Rekombinantinių baltymų sintezės rezultatai. Pilka spalva pažymėtos sąlygos, kuriomis nepavyko susintetinti tikslių baltymų. Žalia spalva pažymėtos sąlygos, kuriomis pavyko susintetinti rekombinantinį baltymą.

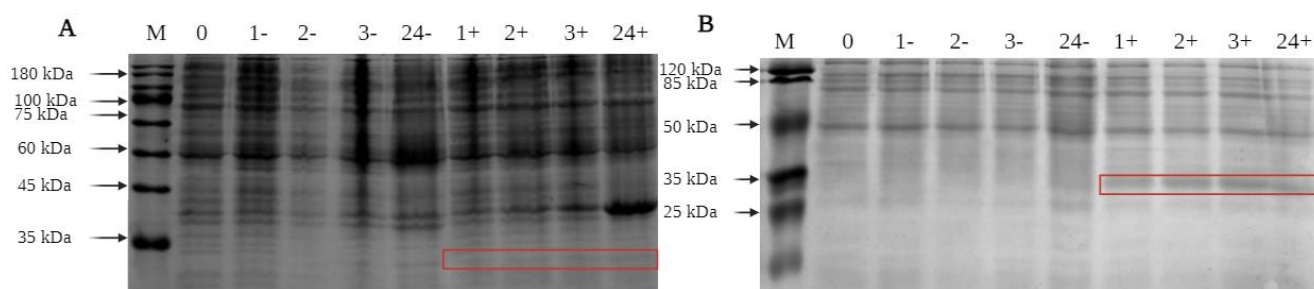
Baltymas su signaliniu peptidu	pET21c/ker34					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	
	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM
	pET21c/ker78					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	
	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM
	pET-21c/ker910					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	
	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM
	pET-28b/ker34					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	
	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM
	pET-28b/ker78					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	
	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM
	pET-28b/ker910					
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)		
0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	
Baltymas be signalinio peptido	pET21c/ker910					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	
	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM
	pET-21c/ker1314					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	
	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM
	pET-28b/ker78					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	
	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM
	pET-28b/ker910					
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)		<i>E. coli</i> C41 (DE3)		
0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	

Iš gautų rezultatų galime teigti, jog pavyko susintetinti KER78, KER910 baltymus, turinčius signalinį peptidą. Taip pat, pavyko susintetinti KER78, KER1314 baltymus, kurių signalinis peptidas buvo pašalintas.



3.17 pav. Poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotraukos. *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker78* genu, indukcija. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, maišant 180 aps./min. greičiu. A) Indukcija vykdoma naudojant 0,5 mM IPTG. M – Proteintech Prestained Protein Marker baltymų molekulinės masės žymuo. B) Indukcija vykdoma naudojant 1 mM IPTG. M – Pierce™ baltymų molekulinės masės žymuo. Skaičius žymi valandą nuo indukcijos pradžios. -- neindukuotų ląstelių mėginys. + – indukuotų ląstelių mėginys. Raudona spalva apibrėžtas tikslinio baltymo dydis.

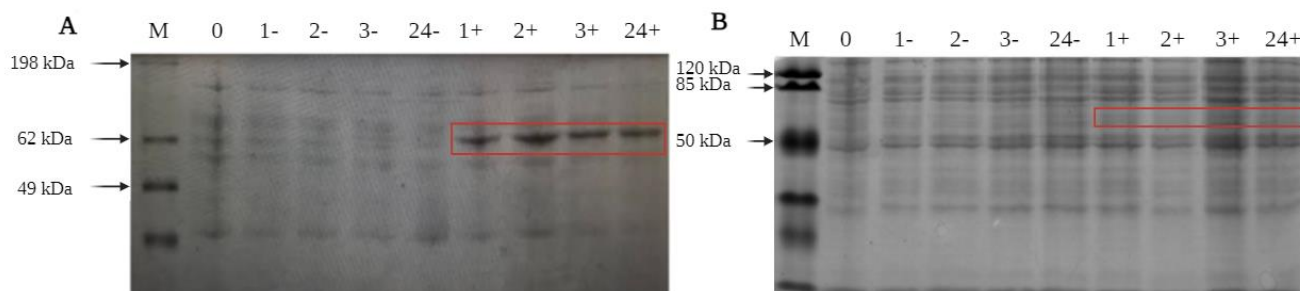
Remiantis poliakrilamidinio gelio elektroforezės rezultatais (3.17 pav. B) galime teigti, kad naudojant heterologinę rekombinantinių baltymų sintezės sistemą, pavyko susintetinti galimai keratinoliziniu aktyvumu pasižymintį KER78 baltymą. Tikslinis baltymas buvo susintetintas naudojant *E. coli* Rosetta (DE3) ląsteles. Vykdam *E. coli* BL21 (DE3) ir C41 (DE3) ląstelių indukciją, rekombinantinio baltymo susintetinti nepavyko. Taip galėjo įvykti dėl tikslinio geno sekoje esančių retai *E. coli* ląstelėse naudojamų kodonų. Rosetta (DE3) kamienas, skirtingai nei BL21(DE3), ar C41 (DE3) turi plazmidės atsparias chloramfenikoliui, kuriose yra papildomi tRNR genai retai *E. coli* ląstelėse sutinkamiems kodonams (De ir kiti, 2010). Rekombinantinį baltymą pavyko susintetinti vykdam indukciją su 1 mM IPTG. Iš elektroforezės nuotraukos matoma, jog antrą bei trečią valandą po indukcijos, yra susintetinamas pakankamas rekombinantinio baltymo kiekis. Baltymo kiekio mažėjimas 24-ąją valandą gali būti susijęs su *E. coli* baltymų raiškos sistema, kuri nepajėgia tinkamai sulankstyti didelio kiekio tikslinio rekombinantinio baltymo, todėl jis yra degraduojamas heterologinio šeimininko proteazių (Quintana-Castro ir kiti, 2009). Žvelgiant į rezultatus (3.17 pav. A), galime teigti, jog 0,5 mM induktoriaus yra nepakankama koncentracija tikslinio baltymo sintezei.



3.18 pav. Poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotraukos. *E. coli* C41 (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker910* genu, indukcija. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, maišant 180 aps./min. greičiu. A) Indukcija vykdoma naudojant 0,5 mM IPTG. M – Proteintech Prestained Protein Marker baltymų molekulinės masės žymuo. B) Indukcija vykdoma naudojant 1 mM IPTG. M – Pierce™ baltymų molekulinės masės žymuo. Skaičius žymi valandą nuo indukcijos pradžios. -- neindukuotų ląstelių mėginys. + – indukuotų ląstelių mėginys. Raudona spalva apibrėžtas tikslinio baltymo dydis.

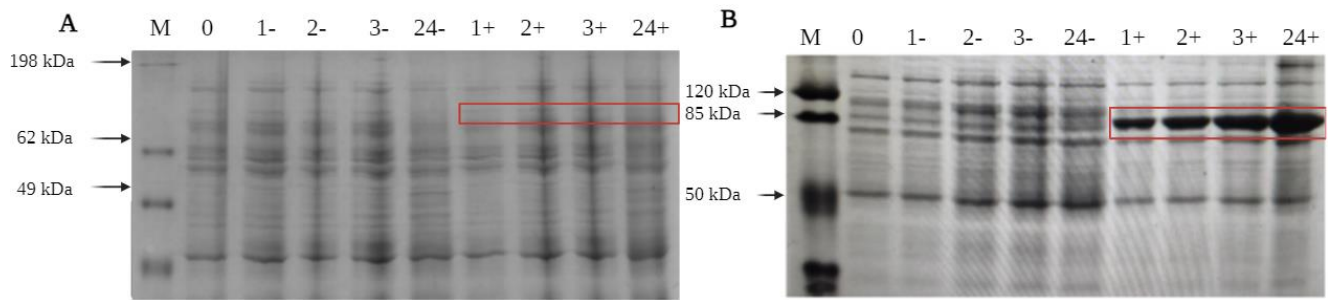
Žvelgiant į poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotrauką (3.18 pav.) galime teigti, kad

naudojant heterologinį šeimininką pavyko susintetinti rekombinantinį baltymą KER910. Fermentas susintetintas vykdant indukciją su 1 mM IPTG (3.18 pav. B). Iš rezultatų matoma, jog jau pirmą valandą po indukcijos prasideda tikslinio baltymo sintezė. Šio baltymo nepavyko susintetinti naudojant *E. coli* BL21 (DE3) ir Rosetta (DE3) kamienus. Taip galėjo įvykti dėl baltymo toksiško poveikio heterologinio šeimininko ląstelėms. Dėl šios priežasties buvo pasirinkta naudoti *E. coli* C41 (DE3) kamieną, kuris yra skirtas toksiškų baltymų sintezei dėl mutacijos, kuri neleidžia ląstelėms lizuotis nuo toksiško rekombinantinių baltymų poveikio (Dumon-seignovert ir kiti, 2004). Iš rezultatų (3.18 pav. A) galima spręsti, jog 0,5 mM IPTG yra nepakankama koncentracija rekombinantinio tikslinio baltymo sintezei.



3.19 pav. Poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotraukos. *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker78* genu be signalinės sekos, indukcija. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, maišant 180 aps./min. greičiu. A) Indukcija vykdoma naudojant 0,5 mM IPTG. M – SeeBlue™ baltymų molekulinės masės žymuo. B) Indukcija vykdoma naudojant 1 mM IPTG. M – Pierce™ baltymų molekulinės masės žymuo. Skaičius žymi valandą nuo indukcijos pradžios. -- neindukuotų ląstelių mėginys. + – indukuotų ląstelių mėginys. Raudona spalva apibrėžtas tikslinio baltymo dydis.

Remiantis poliakrilamidinio gelio elektroforezės rezultatais (3.19 pav. A) galime teigti, kad įvykdžius rekombinantinio baltymo sintezę heterologiniame šeimininke pavyko susintetinti baltymą KER78 be signalinio peptido, kuris galimai pasižymi keratinoliziniu aktyvumu. Baltymą be signalinio peptido pasirinkta sintetinti, nes literatūroje aprašytas galimas šios sekos trukdymas rekombinantinio baltymo sintezei (Rahimnahal ir kiti, 2023). Tikslinis baltymas buvo susintetintas naudojant *E. coli* Rosetta (DE3) ląsteles, vykdant indukciją su 0,5 mM IPTG. Iš elektroforezės nuotraukos matoma, jog jau pirmą sintezės valandą yra susintetinamas pakankamas kiekis rekombinantinio baltymo. Žvelgiant į rezultatus (3.19 pav. B), galime teigti, jog 1 mM induktoriaus yra per didelė koncentracija tikslinio baltymo sintezei. Remiantis literatūros šaltiniais, per didelė IPTG koncentracija turi toksišką poveikį *E. coli* ląstelėms ir dėl šios priežasties gali sumažėti tikslinio baltymo sintezės išeiga (Rizkia ir kiti, 2015). Mokslininkų teigimu, kaip alternatyvą IPTG, būtų galima naudoti natūralų induktorių – laktozę (Dvorak ir kiti, 2015).



3.20 pav. Poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotraukos. *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET21c(+) vektorių su *ker1314* genu be signalinės sekos, indukcija. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, maišant 180 aps./min. greičiu. A) Indukcija vykdoma naudojant 0,5 mM IPTG. M – SeeBlue™ baltymų molekulinės masės žymuo. B) Indukcija vykdoma naudojant 1 mM IPTG. M – Pierce™ baltymų molekulinės masės žymuo. Skaičius žymi valandą nuo indukcijos pradžios. – – neindukuotų ląstelių mėginys. + – indukuotų ląstelių mėginys. Raudona spalva apibrėžtas tikslinio baltymo dydis.

Remiantis poliakrilamidinio gelio elektroforezės rezultatais (3.20 pav. B) galime teigti, kad naudojant heterologinę rekombinantinių baltymų sintezės sistemą pavyko susintetinti galimai keratinoliziniu aktyvumu pasižymintį KER1314 baltymą be signalinio peptido. Rekombinantinį baltymą pavyko susintetinti indukavus *E. coli* Rosetta (DE3) kamieno ląsteles su 1 mM IPTG. Iš elektroforezės nuotraukos matoma, jog tikslinio baltymo sintezė prasideda pirmą valandą po indukcijos. Žvelgiant į rezultatus (3.20 pav. A), galime teigti, jog 0,5 mM induktoriaus yra nepakankama koncentracija tikslinio baltymo sintezei.

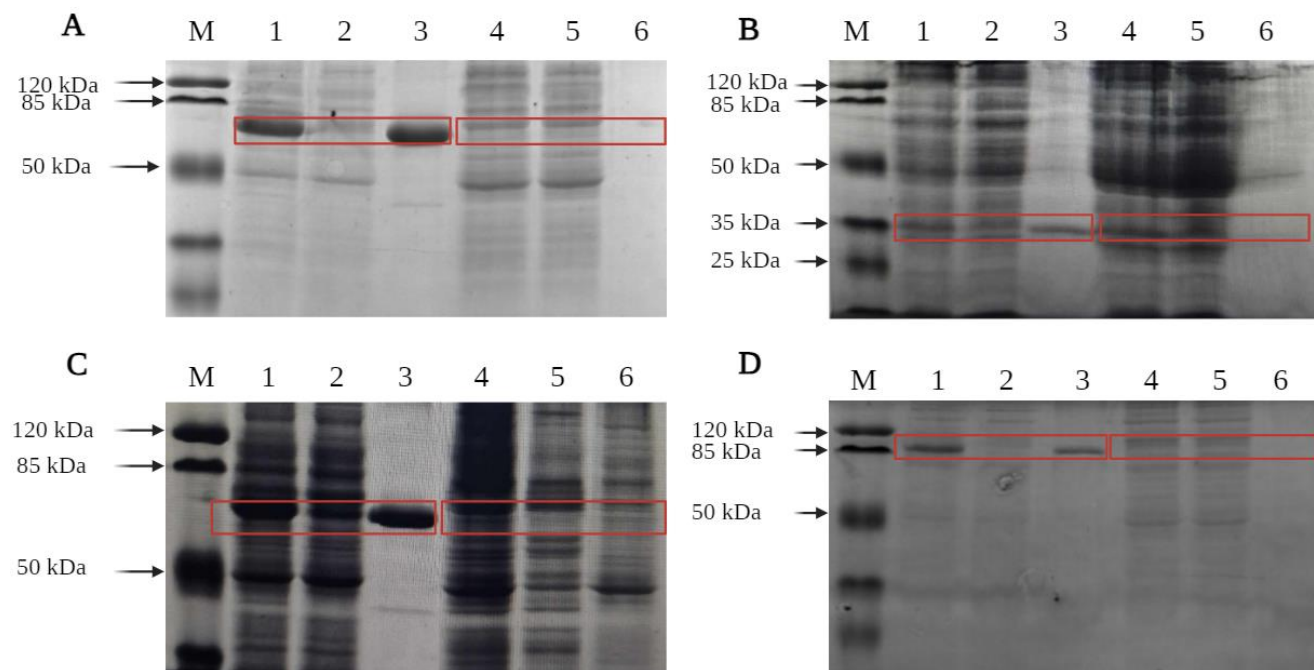
Aprašytų baltymų sintezė buvo atlikta *E. coli* ląsteles auginant 37 °C temperatūroje, maišant 180 aps./min. greičiu. Iš aptartų rezultatų galime teigti, jog tokio sąlygos yra tinkamos šių rekombinantinių baltymų sintezei.

Atlikus aktyvumo gelyje įvertinimą – zimografiją (2.16), hidrolizės zonos agarizuotose pusiau sintetinės keratino bei pieno terpėse, nesusidarė. Tai galėjo įvykti todėl, nes NDS-PAGE metode yra naudojamas organinis junginys NDS, kuris išlanksto baltymą bei suteikia jam neigiamą krūvį. Vykstant baltymo renaturacijai, galėjo būti paveiktas fermento aktyvumas, o susilpnėjus aktyvumui, zimogramoje nesimatė hidrolizės zonų (Nowakowski ir kiti, 2014).

Šio darbo metu, vykdant *E. coli* ląstelių baltymų indukciją, nepavyko vizualizuoti 6 iš 10 sukurtų baltymų konstrukčių (3.4 lentelė). Tai galėjo įvykti dėl per mažos baltymo koncentracijos, dėl baltymo degradacijos, natūralių *E. coli* baltymų poveikio rekombinantiniams baltymams, dėl netinkamo susilankstymo, dėl netinkamos induktoriaus IPTG koncentracijos. Taip pat gali būti, jog parinktas netinkamas raiškos organizmas arba netinkamos ląstelių auginimo sąlygos. Kita priežastis, kodėl galėjo nepavykti susintetinti tikslinių baltymų – ląstelių auginimo laikas buvo per trumpas baltymo raiškai detektuoti (Duong-Ly ir Gabelli, 2014). Siekiant vizualizuoti rekombinantinius baltymus reiktų keisti raiškos parametrus, induktoriaus koncentraciją ar net raiškos organizmą.

3.4 Tirpių ir netirpių *E. coli* baltymų frakcijų atskyrimas

Siekiant išsiaiškinti, kodėl tiksliniai baltymai neturi aktyvumo, buvo atliekamas heterologinio šeimininko tirpių bei netirpių baltymų frakcijų atskyrimas (2.17). Indukcija vykdoma nustatytomis optimaliomis sąlygomis (3.4) su tinkamu *E. coli* kamieniu. Siekiant suardyti ląsteles buvo naudojamas ardymas ultragarsu.

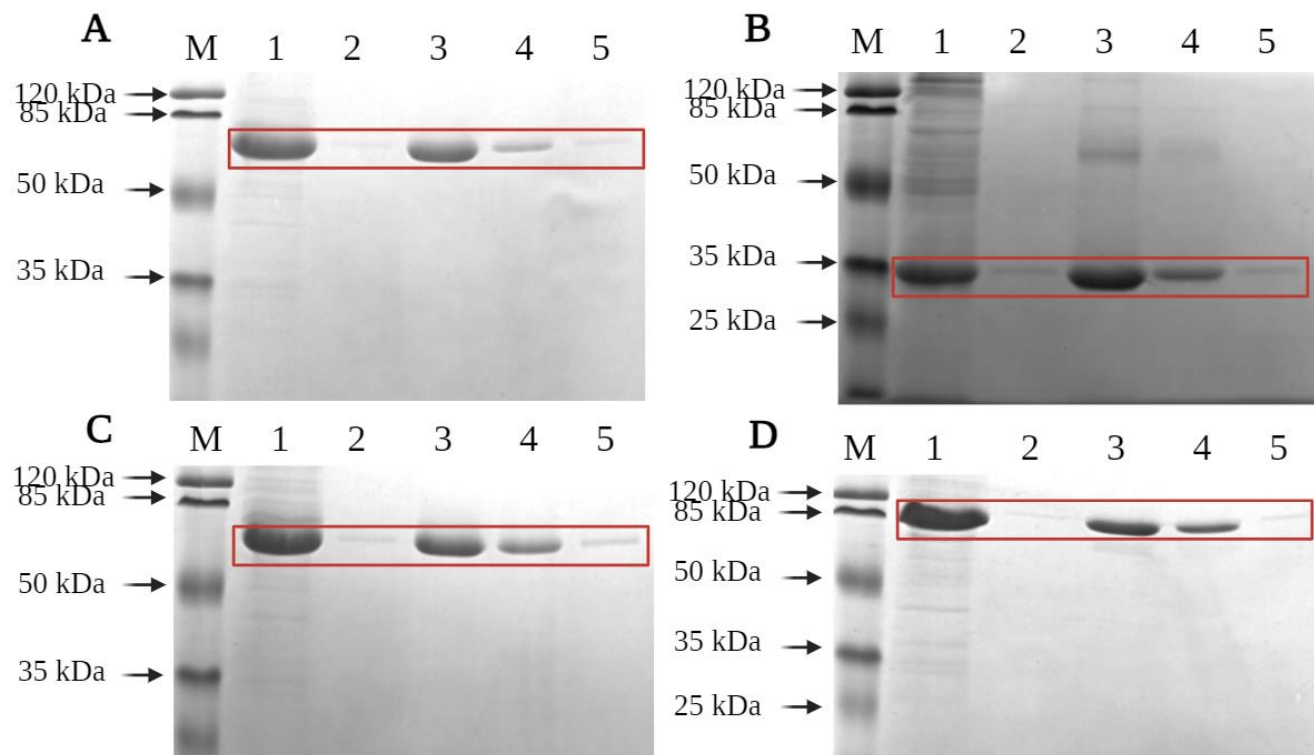


3.21 pav. Poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotraukos. *E. coli* kamienų tirpių ir netirpių baltymų frakcijų atskyrimas po indukcijos. A) *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker78* genu, baltymai. B) *E. coli* C41 (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker910* genu, baltymai. C) *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker78* genu be signalinės sekos, baltymai. D) *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker1314* genu be signalinės sekos, baltymai. M – Pierce™ baltymų molekulinės masės žymuo; 1 – Indukuoti bendri baltymai; 2 – indukuoti tirpūs baltymai; 3 – indukuoti netirpūs baltymai; 4 – neindukuoti bendri baltymai; 5 – neindukuoti tirpūs baltymai; 6 – neindukuoti netirpūs baltymai. Raudona spalva apibrėžtas tikslinio baltymo dydis.

Iš poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotraukos (3.21 pav.) matoma, jog ląstelės buvo suardytos ir atskirtos tirpių bei netirpių baltymų frakcijos. Žvelgiant į rezultatus galima teigti, jog KER78, KER910, KER78 be signalinio peptido ir KER1314 baltymas be signalinio peptido yra netirpioje *E. coli* baltymų frakcijoje. Netirpių kūnelių susidarymas yra dažnas iššūkis siekiant gauti tirpius ir funkcionalius rekombinantinius baltymus. Palyginti su tirpiaisiais baltymais, netirpūs baltymai pasižymi unikaliomis struktūros bei morfologijos charakteristikomis. Netirpių kūnelių kaupimasis yra susijęs su daugeliu veiksnių, įskaitant šeimininko ląstelių metabolizmą, tikslinių baltymų savybes ir aplinkos sąlygas. Norint įveikti šią problemą, galima optimizuoti ląstelių augimo sąlygas, vykdyti indukciją žemesnėje temperatūroje. Taip pat galima naudoti mažesnę IPTG koncentraciją ar indukuoti ląsteles prie skirtingo optinio tankio. Šią problemą taip pat galima bandyti išspręsti panaudojus papildomus pagalbinius baltymus ar šaperonus, kurie padėtų tinkamai sulankstyti baltymą (Bhatwa ir kiti, 2021).

3.5 Tikslinių baltymų gryninimas

Siekiant išgryninti rekombinantinius baltymus, buvo atliekamas gryninimas naudojant Ni²⁺ giminingumo chromatografiją (2.18). Šis metodas paremtas baltymo gale esančių šešių histidino aminorūgščių liekanų inkaro sąveika su Ni²⁺ jonais. KER78 bei KER910 baltymų genai buvo klonuojami į pET28b(+) vektorių, tad histidino inkaras šiame konstrukte turimas N baltymo gale, o KER1314 baltymo genas buvo klonuotas į pET21c(+) vektorių, kuris duoda inkarinę seką C gale. Eliucija vykdoma su 500 mM imidazolu, eliucijos frakcijos surenkamos ir analizuojamos NDS-PAGE metodu (2.15).



3.22 pav. Poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotraukos. A) *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker78* genu, susintetinto tiksulinio baltymo gryninimas. B) *E. coli* C41 (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker910* genu, tiksulinio baltymo gryninimas. C) *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET28b(+) vektorių su *ker78* genu be signalinės sekos, susintetinto tiksulinio baltymo gryninimas. D) *E. coli* Rosetta (DE3) ląstelių, turinčių pET21c(+) vektorių su *ker1314* genu be signalinės sekos, susintetinto tiksulinio baltymo gryninimas M – PierceTM baltymų molekulinės masės žymuo; 1 – Nėgryninta baltymų frakcija; 2–5 – gryninimo frakcijos, eliucijai naudojant 500 mM imidazolą. Raudona spalva apibrėžtas tiksulinio baltymo dydis.

Žvelgiant į elektroforezės agaroziniame gelyje rezultatus (3.22 pav.) matoma, jog pirminis rekombinantinių baltymų gryninimas buvo sėkmingas. Gauti pakankamo švarumo KER78, KER910 bei KER1314 rekombinantiniai baltymai.

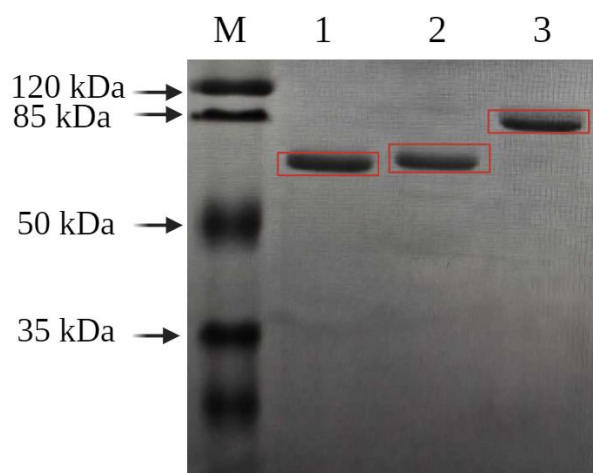
3.6 Rekombinantinių fermentų aktyvumo atstatymas

Netirpi *E. coli* baltymų frakcija buvo tirpinama tirpale su karbamidu. Šis junginys sukelia disulfidinių jungčių skilimą ir fermentų tretinės struktūros suardymą, todėl fermentai praranda aktyvumą

(Akbarian ir Chen, 2022). Norint, jog rekombinantiniai baltymai įgautų savo aktyvią struktūrą, atlikta dializė, siekiant atplauti baltymą nuo karbamido. Šiam tikslui pasiekti, gryninti fermentų mėginiai buvo laikomi skirtingos sudėties buferiniuose tirpaluose (2.19).

KER78 baltymui su ir be signalinės sekos bei KER1314 baltymui be signalinės sekos dializė atlikta naudojant A buferinį tirpalą (2.5 lentelė). Laikant KER910 baltymą šiame buferiniame tirpale, baltymai agregavosi. Keliame hipotezę, kad dėl per staigaus karbamido pašalinimo, baltymas prarado tirpumą. Dėl šios priežasties, nuspręsta atlikti dializę mažinant karbamido koncentraciją tirpale. KER910 baltymui dializė atlikta naudojant B, C ir D buferinius tirpalus, vis mažinant karbamido koncentraciją. Po inkubacijos 4 M karbamido 50 mM Tris-HCl tirpale, baltymas vis tiek agregavosi. Baltymo agregacija priklauso ne tik nuo polipeptido sekos, bet ir nuo išorinių sąlygų, tokių kaip baltymo koncentracija, temperatūra, pH ir buferinio tirpalo joninis stiprumas (Kumar, 2011). Siekiant atplauti KER910 baltymą nuo karbamido, reikia ieškoti kitokių dializės buferinių tirpalų, kuriuose baltymas palaikytų tirpumą ir susilankstytų į savo aktyvią formą.

Sėkmingai dializuotų baltymų mėginiai analizuoti NDS-PAGE metodu (2.15). Taip pat atlikta zimografija (2.16) bei įvertintas aktyvumas pusiau sintetinėje keratino bei pieno terpėse (2.20).



3.23 pav. Poliakrilamidinio gelio elektroforezės nuotrauka. Rekombinantinių baltymų mėginiai po dializės. M – Pierce™ baltymų molekulinės masės žymuo. 1 – KER78 baltymas be signalinio peptido. 2 – KER78 baltymas. 3 – KER1314 baltymas.

Baltymų elektroforezės rezultatuose (3.23 pav.) galime matyti ~58 kDa dydžio KER78 rekombinantinį baltymą be signalinio peptido. KER78 baltymas matomas ties ~60 kDa riba, o KER1314 rekombinantinis baltymas be signalinio peptido matomas ties ~84 kDa žymeniu.

Atlikus zimografiją bei įvertinus rekombinantinių baltymų aktyvumą agarų šulinėliuose, hidrolizės zonos nesusidarė. Taip galėjo nutikti dėl netinkamo dializės buferinio tirpalo parinkimo, todėl baltymai nesusilankstė į savo aktyvią struktūrą. Baltymų perlankstymo proceso efektyvumas priklauso nuo buferinio tirpalo sudėties ir sąlygų. Tirpalo pH yra labai svarbus parametras šiame procese. Literatūroje rašoma, jog buferinio tirpalo pH, esantis toli nuo baltymo izoelektrinio taško, neleidžia susidaryti agregatams. Taip pat, dializės buferiniame tirpale galima naudoti įvairius priedus

(aminorūgštys, Triton X-100, sacharozė, glicerolis) siekiant sumažinti agregaciją ir padidinti perlankstymo efektyvumą (Kumar, 2011). Taigi, siekiant išspręsti šią problemą, reikia ieškoti buferinio tirpalo, kuriame pavyktų atstatyti fermento aktyvumą.

Baltymų biosintezės sistemos sukūrimas yra reikšmingai svarbus, norint turėti objektyviai didelius kiekius funkciškai aktyvių fermentų. Šio darbo metu buvo sukurta heterologinė baltymų biosintezės sistema, siekiant susintetinti rekombinantinius baltymus, galimai turinčius keratinolizinį aktyvumą. Tyrimo metu, atliekant sintezę *E. coli* ląstelėse, pavyko susintetinti ir išgryninti KER78, KER910 bei KER1314 rekombinantinius baltymus, kurie, remiantis literatūra, gali pasižymėti keratinoliziniu aktyvumu. Atstacius šių fermentų funkcinį aktyvumą, dėl gebėjimo skaidyti keratino turinčius substratus, šie biokatalizatoriai turi perspektyvos būti pritaikytais tekstilės, odos, ploviklių, kosmetikos bei medicinos pramonėse. Be to, šie baltymai gali tapti puikiu molekulinio įrankiu, siekiant gauti biologiškai aktyvius peptidus ekologiškai ir ekonomiškai tvariose sistemose.

IŠVADOS

- 1) Atlikta *Streptomyces* sp. SK-91 kamieno genomine analizė ir nustatyti *ker12*, *ker34*, *ker56*, *ker78*, *ker910*, *ker112* bei *ker1314* genai, kurie koduoja galimai keratinolizini aktyvumą turinčius baltymus.
- 2) Sukurti atrinktų genų konstruktai su pET21c(+) ir pET28b(+) vektoriais.
- 3) Nustatyta, jog *E. coli* Rosetta (DE3) yra tinkamas šeimininkas *Streptomyces* sp. SK-91 kamieno galimai keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių rekombinantinių baltymų KER78 bei KER1314 sintezei. *E. coli* C41 (DE3) kamienas yra tinkamas KER910 rekombinantinio baltymo sintezei.
- 4) Nustatyta, jog 1 mM IPTG yra optimali koncentracija susintetinti KER78, KER910 bei KER1314 rekombinantinius baltymus, o siekiant susintetinti KER78 baltymą be signalinės sekos, optimali induktoriaus (IPTG) koncentracija – 1 mM.
- 5) Nustatyta, jog KER78 rekombinantinio baltymo sintezė be signalinio peptido prasideda nuo antros valandos po indukcijos, o siekiant susintetinti KER78, KER910 bei KER1314, užtenka vienos valandos.
- 6) Atlikus Ni²⁺ giminingumo chromatografiją, sėkmingai išgryninti KER78, KER910 ir KER1314 rekombinantiniai baltymai.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Skaistė Jančiauskytė

Magistro baigiamasis darbas

Proteoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų biosintezė

SANTRAUKA

Keratinazės – tai fermentai, gebantys skaidyti netirpius, fibrilinius, keratino turinčius substratus. Šie biokatalizatoriai yra svarbūs dėl plačios pritaikymo srities tekstilės, odos, ploviklių, kosmetikos pramonėje, prionų eliminacijoje bei medicinoje. Šio darbo tikslas buvo sukurti ir optimizuoti keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų heterologinę biosintezės sistemą. Išsikelti darbo uždaviniai: Atlikti *Streptomyces* sp. SK-91 izoliato genominę analizę ir nustatyti hipotetinius keratinazes koduojančius genus, sukurti atrinktų genų konstruktus, tinkamus heterologinei raiškai, parinkti tinkamą *Escherichia coli* kamieną tikslinių baltymų sintezei, nustatyti optimalią induktoriaus koncentraciją, indukcijos trukmę bei išgryninti tikslinius baltymus. Darbo metu buvo atrinkti septyni hipotetiniai keratiną hidrolizuojantys baltymai iš *Streptomyces* sp. SK-91 kamieno. Su atrinktų fermentų genais buvo sukurti pET21c(+) ir pET28b(+) konstruktai. Šių konstrukčių raiška buvo vykdoma *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3) ir C41 (DE3) kamienuose, indukcijai naudojant 0,5 mM bei 1 mM IPTG. Ląstelės po indukcijos auginamos 24 valandas. Indukuotų ir neindukuotų ląstelių mėginiai paimami pirmas tris valandas kas valandą ir 24-tą valandą po indukcijos. Atlikus baltymų sintezę nustatyta, jog *E. coli* Rosetta (DE3) yra tinkamas kamienas rekombinantinių KER78 bei KER1314 baltymų sintezei. Siekiant susintetinti KER910 baltymą, *E. coli* C41 (DE3) yra tinkamas heterologinis šeimininkas. Šio darbo metu nustatyta, jog siekiant susintetinti KER78, optimali induktoriaus koncentracija yra 0,5 mM IPTG, o siekiant susintetinti KER78 be signalinio peptido, KER910 bei KER1314 be signalinės sekos, reiktų naudoti 1 mM induktoriaus (IPTG). Iš rezultatų galime spręsti, jog KER78 rekombinantinio baltymo sintezė be signalinio peptido prasideda nuo 2 valandos po indukcijos, o siekiant susintetinti KER78, KER910 bei KER1314, užtenka vienos valandos. Atlikus Ni²⁺ giminingumo chromatografiją, sėkmingai išgryninti KER78, KER910 ir KER1314 rekombinantiniai baltymai. Siekiant atstatyti rekombinantinių baltymų aktyvumą, atlikta dializė, tačiau zimogramoje aktyvumas nenustatytas. Norint geriau suprasti keratinazių veikimą bei plėsti šių fermentų pritaikymą, šios krypties moksliniai tyrimai yra būtini.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Skaistė Jančiauskytė

Master's thesis

Search and Analysis of Peptidases with Keratinolytic Activity

SUMMARY

Keratinases are enzymes capable of breaking down insoluble, fibrillar, keratin-containing substrates. These biocatalysts are important due to their wide range of applications in the textile, leather, detergent, cosmetic, medicine industry and prion elimination. The aim of this work was to create and optimize a heterologous expression system for enzymes with keratinolytic activity. Tasks that needed to be complete during this study: *Streptomyces* sp. SK-91 genomic analysis and identification of genes encoding hypothetical keratinases, creation of selected gene constructs suitable for heterologous expression, selection of a suitable *Escherichia coli* strain for target protein synthesis, determination of optimal inducer concentration and optimal induction duration. Lastly, purification of target proteins. During the work, seven hypothetical keratin hydrolyzing proteins from *Streptomyces* sp. SK-91 strain were identified. The pET21c(+) and pET28b(+) constructs were created with the genes of the selected enzymes. Expression of these constructs was performed in *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3) and C41 (DE3) strains using 0.5 mM and 1 mM IPTG for induction. Cells were cultured for 24 hours after induction. Induced and uninduced cells were sampled hourly for the first three hours and at hour 24 post-induction. After protein synthesis, it was found that *E. coli* Rosetta (DE3) is a suitable strain for the synthesis of recombinant KER78 and KER1314 proteins. In order to synthesize the KER910 protein, *E. coli* C41 (DE3) is a suitable heterologous host. In the course of this work, it was established that the optimal concentration of the inducer is 0.5 mM IPTG to synthesize KER78, and to synthesize KER78 without a signal peptide. For KER910 and KER1314 without a signal sequence, 1 mM inducer (IPTG) should be used. From the results, we can conclude that the synthesis of KER78 recombinant protein without a signal peptide begins 2 hours after induction, while one hour is enough to synthesize KER78, KER910 and KER1314 without a signal peptide. KER78, KER910 and KER1314 recombinant proteins were successfully purified by Ni²⁺ affinity chromatography. In order to restore the activity of the recombinant proteins, dialysis was performed, but no activity was detected in the zymogram. In order to better understand the action of keratinases and expand the application of these enzymes, scientific research in this direction is necessary.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdel-Fattah, A. M., El-Gamal, M. S., Ismail, S. A., Emran, M. A., ir Hashem, A. M. (2018). Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.005>
2. Abdel-fattah, A. M., Nashy, E.-S. H. A., Sabiel, E.-T. A., Hussien, M. M., ir Attia, A. S. (2015). Novel Keratinolytic Activity of *Cyberlindnera fabianii* Nrc3 Aza as A Plant Growth Promoting Agent (PGPA). *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 3(4), 609–618. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v3i4.13683>
3. Abdelmoteleb, A., Gonzalez-Mendoza, D., Tzintzun-Camacho, O., Grimaldo-Juárez, O., Mendez-Trujillo, V., Moreno-Cruz, C., Ceceña-Duran, C., ir Roumia, A. F. (2023). Keratinases from *Streptomyces netropsis* and *Bacillus subtilis* and Their Potential Use in the Chicken Feather Degrading. *Fermentation*, 9(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020096>
4. Agarwal, V., Varghese, N., Dasgupta, S., Sood, A. K., ir Chatterjee, K. (2019). Engineering a 3D MoS₂ foam using keratin exfoliated nanosheets. *Chemical Engineering Journal*, 374(May), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.185>
5. Akbarian, M., ir Chen, S. H. (2022). Instability Challenges and Stabilization Strategies of Pharmaceutical Proteins. *Pharmaceutics*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112533>
6. Akhter, M., Wal Marzan, L., Akter, Y., ir Shimizu, K. (2020). Microbial Bioremediation of Feather Waste for Keratinase Production: An Outstanding Solution for Leather Dehairing in Tanneries. *Microbiology Insights*, 13, 117863612091328. <https://doi.org/10.1177/1178636120913280>
7. Akram, F., Afifa, H., Hayat, K., Ahmed, Z., Jabbar, Z., ir Moazzam, I. (2021). Keratinolytic Enzyme from a Thermotolerant Isolate *Bacillus* sp . NDS - 10 : An Efficient Green Biocatalyst for Poultry Waste Management , Laundry and Hide - dehairing Applications. *Waste and Biomass Valorization*, 12(9), 5001–5018. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01369-2>
8. Aktayeva, S., Baltin, K., Kiribayeva, A., Akishev, Z., Silayev, D., Ramankulov, Y., ir Khassenov, B. (2022). Isolation of *Bacillus* sp. A5.3 Strain with Keratinolytic Activity. *Biology*, 11(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/biology11020244>
9. Alahyaribeik, S., davood Sharifi, S., Tabandeh, F., Honarbakhsh, S., ir Ghazanfari, S. (2020). Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria. *Process Safety and Environmental Protection*, 135(March), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.01.014>
10. Alamnie, G., Gessesse, A., Bitew, M., Dawud, N., Andualem, B., ir Girma, A. (2023). Production and biochemical characterization of keratinase enzyme from *Bacillus subtilis* ES5 and its potential application in leather dehairing process : a clean leather tanning process. *Biotechnology ir Biotechnological Equipment*, 37(1). <https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2288691>
11. Allure, N., Madhusudhan, D. N., ir Agsar, D. (2015). Detection of keratinolytic actinobacteria and evaluation of bioprocess for production of alkaline keratinase. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(7), 907–918.
12. Almahsheer, A. A., Mahmoud, A., El-Komy, H., Alqosaibi, A. I., Aktar, S., Abdulazeez, S., ir Borgio, J. F. (2022). Novel feather degrading keratinases from *Bacillus cereus* group: Biochemical, genetic and bioinformatics analysis. *Microorganisms*, 10(1), 1–27. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010093>
13. Alwakeel, S. S., Ameen, F., Al Gwaiz, H., Sonbol, H., Alghamdi, S., Moharram, A. M., ir Al-Bedak, O. A. (2021). Keratinases produced by *Aspergillus stelliformis*, *Aspergillus sydowii*, and *Fusarium brachygibbosum* isolated from human hair: Yield and activity. *Journal of Fungi*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/jof7060471>
14. Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Chaulagain, B. P., ir LakshmiPriya, T. (2017). Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. *BioMed Research International*, 2017.

<https://doi.org/10.1155/2017/2195808>

15. Bach, E., Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., ir Brandelli, A. (2011). Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. *Biodegradation*, 22(6), 1191–1201. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9474-0>
16. Bacterial Transformation Troubleshooting Guide [žiūrėta 2024-05]. Prieiga per internetą <https://www.thermofisher.com/lt/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-troubleshooting-guide.html>.
17. Barman, N. C., Zohora, F. T., Das, K. C., Mowla, M. G., Banu, N. A., Salimullah, M., ir Hashem, A. (2017). Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0462-6>
18. Batool, H., Akhthar, M. W., ir Saleem, M. (2021). Characterization of a microbial keratinase with leather dehairing and feather waste management potential. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 31(4), 1132–1144. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2021.4.0311>
19. Ben Elhoul, M., Zaraï Jaouadi, N., Rekik, H., Omrane Benmrad, M., Mechri, S., Moujehed, E., Kourdali, S., El Hattab, M., Badis, A., Bejar, S., ir Jaouadi, B. (2016). Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from *Actinomyces viridilutea* DZ50. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 299–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.009>
20. Beselin, A., ir Lilly, E. (2014). *Optimization of lipase production in Burkholderia glumae*. *August*. <https://www.researchgate.net/publication/40536223>
21. Bhang, K., Chaturvedi, V., ir Bhatt, R. (2016). Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnology Reports*, 10, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.007>
22. Bhari, R., Kaur, M., ir Singh, R. S. (2019). Thermostable and halotolerant keratinase from *Bacillus aerius* NSMk2 with remarkable dehairing and laundry applications. *Journal of Basic Microbiology*, 59(6), 555–568. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900001>
23. Bhatia, S. (2018). Introduction to enzymes and their applications. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 2*. <https://doi.org/10.1088/978-0-7503-1302-5ch1>
24. Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z., ir Zhou, T. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>
25. Białkowska, A. M., Morawski, K., ir Florczak, T. (2017). Extremophilic proteases as novel and efficient tools in short peptide synthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(9), 1325–1342. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1961-9>
26. Bioactive Peptides Market Size And Forecast [žiūrėta 2024-05]. Prieiga per internetą <https://www.verifiedmarketresearch.com/product/bioactive-peptides-market/>.
27. Bo, B., ir Mu, R. (1997). *Reduction of Disulfide Bonds by Streptomyces pactum during Growth on Chicken Feathers*. 63(2), 790–792.
28. Brandelli, A., Daroit, D. J., ir Riffel, A. (2010). Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1735–1750. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2398-5>
29. Briki, S., Hamdi, O., ir Landoulsi, A. (2016). Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from *Bacillus* sp. SB12. *Protein Expression and Purification*, 121, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.12.021>
30. Browning, D. F., Richards, K. L., Peswani, A. R., Roobol, J., Busby, S. J. W., ir Robinson, C. (2017). *Escherichia coli* “TatExpress” strains super-secrete human growth hormone into the bacterial periplasm by the Tat pathway. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(12), 2828–2836. <https://doi.org/10.1002/bit.26434>
31. Cai, C. G., Chen, J. S., Qi, J. J., Yin, Y., ir Zheng, X. D. (2008). Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 9(9),

- 713–720. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820128>
32. Callegaro, K., Brandelli, A., ir Daroit, D. J. (2019). Beyond plucking: Feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. *Waste Management*, 95, 399–415. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.06.040>
 33. Cavello, I., Urbietta, M. S., Cavalitto, S., ir Donati, E. (2020). *Bacillus cytotoxicus* isolated from a pristine natural geothermal area reveals high keratinolytic activity. *Microorganisms*, 8(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060796>
 34. Chou, C. C., ir Buehler, M. J. (2012). Structure and mechanical properties of human trichocyte keratin intermediate filament protein. *Biomacromolecules*, 13(11), 3522–3532. <https://doi.org/10.1021/bm301254u>
 35. Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., ir Brandelli, A. (2009). Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(3), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.11.008>
 36. David Troncoso, F., Alberto Sánchez, D., ir Luján Ferreira, M. (2022). Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. *ChemistryOpen*, 11(3). <https://doi.org/10.1002/open.202200017>
 37. De, R., Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., ir Persson, A. (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 69(2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.08.017>
 38. Dedavid E Silva, L. A., Tirloni, L., Loss-Morais, G., Margis, R., Da Silva Vaz, I., Macedo, A. J., ir Termignoni, C. (2014). A recombinant subtilisin with keratinolytic and fibrin(ogen)olytic activity. *Process Biochemistry*, 49(6), 948–954. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.017>
 39. Demir, A., Karahan, H. A., Özdoğan, E., Öktem, T., ir Seventekin, N. (2008). The synergetic effects of alternative methods in wool finishing. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 16(2), 89–94.
 40. Devi, S., Chauhan, A., Bishist, R., Sankhyan, N., Rana, K., ir Sharma, N. (2022). Production, partial purification and efficacy of keratinase from *Bacillus halotolerans* L2EN1 isolated from the poultry farm of Himachal Pradesh as a potential laundry additive. *Biocatalysis and Biotransformation*, 0(0), 1–21. <https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2029851>
 41. Dong, Y. Z., Chang, W. S., ir Chen, P. T. (2017). Characterization and overexpression of a novel keratinase from *Bacillus polyfermenticus* B4 in recombinant *Bacillus subtilis*. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0177-1>
 42. Du, F., Liu, Y. Q., Xu, Y. S., Li, Z. J., Wang, Y. Z., Zhang, Z. X., ir Sun, X. M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>
 43. Dumon-seignovert, L., Cariot, G., ir Vuillard, L. (2004). *The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli : a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3)*. 37, 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.04.025>
 44. Duong-Ly, K. C., ir Gabelli, S. B. (2014). Explanatory chapter: Troubleshooting recombinant protein expression: General. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 541). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00017-3>
 45. Dvorak, P., Chrast, L., Nickel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., Lorenzo, V., Prokop, Z., ir Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
 46. Dyson, M. R., Shadbolt, S. P., Vincent, K. J., Perera, R. L., ir McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: Identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnology*, 4, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-32>
 47. e Silva, L. A. D., Macedo, A. J., ir Termignoni, C. (2014). Production of keratinase by *Bacillus subtilis* S14. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1725–1733. <https://doi.org/10.1007/s13213-014->

48. Edwin, A., Grundström, C., Wai, S. N., Öhman, A., Stier, G., ir Sauer-Eriksson, A. E. (2014). Domain isolation, expression, purification and proteolytic activity of the metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *Protein Expression and Purification*, 96, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.01.012>
49. Ekici, Ö. D., Paetzel, M., ir Dalbey, R. E. (2008). Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Science*, 17(12), 2023–2037. <https://doi.org/10.1110/ps.035436.108>
50. Ernst, D. R., ir Race, R. E. (1993). Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *Journal of Virological Methods*, 41(2), 193–201. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(93\)90126-C](https://doi.org/10.1016/0166-0934(93)90126-C)
51. Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Haddar, A., Kanoun, S., ir Nasri, M. (2010). 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(2), 329–344. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8774-x>
52. Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L., ir Nasri, M. (2009). Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(4), 427–436. <https://doi.org/10.1139/W08-143>
53. Falco, F. C., Espersen, R., Svensson, B., Gernaey, K. V., ir Eliasson Lantz, A. (2019). An integrated strategy for the effective production of bristle protein hydrolysate by the keratinolytic filamentous bacterium *Amycolatopsis keratiniphila* D2. *Waste Management*, 89, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.067>
54. Fang, Z., Zhang, J., Du, G., ir Chen, J. (2016). Improved catalytic efficiency, thermophilicity, anti-salt and detergent tolerance of keratinase KerSMD by partially truncation of PPC domain. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep27953>
55. Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., Du, G., ir Chen, J. (2013). Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 82, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.008>
56. Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., ir Jiang, L. (2014). Cloning , heterologous expression and characterization of two keratinases from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1. *Process Biochemistry*, 49(4), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.009>
57. Fraser, R. D. B., MacRae, T. P., Sparrow, L. G., ir Parry, D. A. D. (1988). Disulphide bonding in α -keratin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 10(2), 106–112. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(88\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0141-8130(88)90017-7)
58. Friedrich, J., Gradišar, H., Vrecl, M., ir Pogačnik, A. (2005). In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.015>
59. Friedricht, A. B., ir Antranikian, G. (1996). Keratin degradation by feividobacterium pennavomns, a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2875–2882. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2875-2882.1996>
60. Garafutdinov, R. R., Galimova, A. A., ir Sakhabutdinova, A. R. (2020). The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 39(9), 1251–1269. <https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1803354>
61. Ghosh, A., Chakrabarti, K., ir Chattopadhyay, D. (2009). Cloning of feather-degrading minor extracellular protease from *Bacillus cereus* DCUW: Dissection of the structural domains. *Microbiology*, 155(6), 2049–2057. <https://doi.org/10.1099/mic.0.027573-0>
62. Gibbs, C. J., Gajdusek, D. C., ir Latarjet, R. (1978). Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(12), 6268–6270. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.12.6268>

63. Goda, D. A., Bassiouny, A. R., Abdel Monem, N. M., Soliman, N. A., ir Abdel Fattah, Y. R. (2020). Effective multi-functional biotechnological applications of protease/keratinase enzyme produced by new Egyptian isolate (*Laceyella sacchari* YNDH). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00037-7>
64. Gong, J. S., Wang, Y., Zhang, D. D., Zhang, R. X., Su, C., Li, H., Zhang, X. M., Xu, Z. H., ir Shi, J. S. (2015). Biochemical characterization of an extreme alkaline and surfactant-stable keratinase derived from a newly isolated actinomycete *Streptomyces aureofaciens* K13. *RSC Advances*, 5(31), 24691–24699. <https://doi.org/10.1039/c4ra16423g>
65. González, V., Vargas-Straube, M. J., Beys-Da-Silva, W. O., Santi, L., Valencia, P., Beltrametti, F., ir Cámara, B. (2020). Enzyme Bioprospection of Marine-Derived Actinobacteria from the Chilean Coast and New Insight in the Mechanism of Keratin Degradation in *Streptomyces* sp. G11C. *Marine Drugs*, 18(11), 1–26. <https://doi.org/10.3390/MD18110537>
66. Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Lakshmi Priya, T., Tang, T. H., Chen, Y., Hashim, U., Ruslinda, A. R., ir Arshad, M. K. M. (2015). Biotechnological aspects and perspective of microbial Keratinase production. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/140726>
67. Gottesman, S. (1996). *PROTEASES AND THEIR TARGETS IN ESCHERICHIA COLI I*. 465–506.
68. Graumann, K., ir Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal*, 1(2), 164–186. <https://doi.org/10.1002/biot.200500051>
69. Graziotin, A., Pimentel, F. A., De Jong, E. V, ir Brandelli, A. (2006). Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology*, 126(1–2), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.06.002>
70. Green, M. R., ir Sambrook, J. (2018). The hanahan method for preparation and transformation of competent *Escherichia coli*: High-efficiency transformation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(3), 183–190. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101188>
71. Gunes, G. B., Akkoyun, O., Demir, T., Bozaci, E., Demir, A., ir Esin Hames, E. (2018). Microbial Keratinase Production and Application to Improve the Properties of Wool Fabrics. *International Journal of Textile Science*, 7(2), 43–47. <https://doi.org/10.5923/j.textile.20180702.02>
72. Gupta, R., ir Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>
73. Gupta, S., Tewatia, P., Misri, J., ir Singh, R. (2017). Molecular Modeling of Cloned *Bacillus subtilis* Keratinase and Its Insinuation in Psoriasis Treatment Using Docking Studies. *Indian Journal of Microbiology*, 57(4), 485–491. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0677-x>
74. Gurung, S. K., Adhikari, M., Kim, S. W., Bazie, S., Kim, H. S., Lee, H. G., Kosol, S., Lee, H. B., ir Lee, Y. S. (2018). Discovery of two *Chrysosporium* species with keratinolytic activity from field soil in Korea. *Mycobiology*, 46(3), 260–268. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1514732>
75. Gutiérrez-González, M., Fariás, C., Tello, S., Pérez-Etcheverry, D., Romero, A., Zúñiga, R., Ribeiro, C. H., Lorenzo-Ferreiro, C., ir Molina, M. C. (2019). Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53200-7>
76. Hamiche, S., Mechri, S., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., Badis, A., ir Jaouadi, B. (2019). Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 122). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.174>
77. Hassan, M. A., Taha, T. H., Hamad, G. M., Hashem, M., Alamri, S., ir Mostafa, Y. S. (2020). Biochemical characterisation and application of keratinase from *Bacillus thuringiensis* MT1 to enable valorisation of hair wastes through biosynthesis of vitamin B-complex. *International*

78. Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. K., ir Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1–3), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.005>
79. Huang, Y., Łężyk, M., Herbst, F. A., Busk, P. K., ir Lange, L. (2020). Novel keratinolytic enzymes, discovered from a talented and efficient bacterial keratin degrader. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66792-2>
80. Idowu, A. T., Igiehon, O. O., Idowu, S., Olatunde, O. O., ir Benjakul, S. (2021). Bioactivity Potentials and General Applications of Fish Protein Hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10071-1>
81. Jacob, J. T., Coulombe, P. A., Kwan, R., ir Omary, M. B. (2018). Types I and II keratin intermediate filaments. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4), 1–10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018275>
82. Jadhav, P., ir Pathade, G. (2019). *Degradation of feathers by bacterial consortium and its application in seed germination*. 8(1), 20–23.
83. Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Badis, A., Trabelsi, S., Belhoul, M., Yahiaoui, A. B., Aicha, H. Ben, Toumi, A., Bejar, S., ir Jaouadi, B. (2013). Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076722>
84. Kang, D., Herschend, J., Al-Soud, W. A., Mortensen, M. S., Gonzalo, M., Jacquiod, S., ir Sørensen, S. J. (2018). Enrichment and characterization of an environmental microbial consortium displaying efficient keratinolytic activity. *Bioresource Technology*, 270, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.006>
85. Kang, D., Jacquiod, S., Herschend, J., Wei, S., Nesme, J., ir Sørensen, S. J. (2020). Construction of Simplified Microbial Consortia to Degrade Recalcitrant Materials Based on Enrichment and Dilution-to-Extinction Cultures. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03010>
86. Kang, E., Jin, H., La, J. W., Park, S., Kim, W., ir Lee, W. (2019). *Identification of keratinases from *Fervidobacterium islandicum* AW-1 using dynamic gene expression profiling*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13493>
87. Kannahi, M., ir Ancy, R. J. (2012). Keratin degradation and enzyme producing ability of *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani* from soil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(6), 3245–3248.
88. Karthikeyan, R., Balaji, S., ir Sehgal, P. K. (2007). Industrial applications of keratins - A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66(9), 710–715.
89. Kim, J.-D. (2007). Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Fungus, *Aspergillus flavus* Strain K-03. *Mycobiology*, 35(4), 219. <https://doi.org/10.4489/myco.2007.35.4.219>
90. Koutb, M. M., Hassan, E. A., Morsy, F. M., ir Bagy, M. M. K. (2023). Optimization of keratinase production by keratinolytic fungus *Chrysosporium tropicum* and its potentiality in biodegradation of chicken feathers. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, 9(1), 50–56. <https://doi.org/10.1007/s43994-022-00020-7>
91. Kumar, D. (2011). Protein Refolding/Renaturation. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00136-7>
92. Kuo, J. M., Yang, J. I., Chen, W. M., Pan, M. H., Tsai, M. L., Lai, Y. J., Hwang, A., Pan, B. S., ir Lin, C. Y. (2012). Purification and characterization of a thermostable keratinase from *Meiothermus* sp. I40. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 70, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.02.006>
93. Kurisu, G., Sugimoto, A., Harada, S., Takagi, M., Imanaka, T., ir Kai, Y. (1997).

- Characterization of a small metalloprotease from *Streptomyces caespitosus* with high specificity to aromatic residues. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(6), 590–592. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)81142-7](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)81142-7)
94. Li, L., Li, H., Tian, Q., Ge, B., Xu, X., Chi, Y., Zhao, H., Liu, Y., Jia, N., Zhou, T., Zhu, Y., ir Zhou, Y. (2022). Expression and purification of soluble recombinant β -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01972-5>
 95. Li, Q. (2021). Structure, Application, and Biochemistry of Microbial Keratinases. *Frontiers in Microbiology*, 12(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674345>
 96. Li, Z. W., Liang, S., Ke, Y., Deng, J. J., Zhang, M. S., Lu, D. L., Li, J. Z., ir Luo, X. C. (2020). The feather degradation mechanisms of a new *Streptomyces* sp. isolate SCUT-3. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0918-0>
 97. Lionela, C., Menezes, A. De, Santos, C., Viegas, M., ir Maurício, S. (2021). Industrial sustainability of microbial keratinases : production and potential applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03052-z>
 98. Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 1–15. <https://doi.org/10.3791/3998>
 99. Ma, C., Feng, Y., Chen, B., Meng, Z., ir Zhang, Y. (2024). *Isolation and Identification of Feather-Degrading Bacteria and Cloning of Their Keratinase Gene*. <https://doi.org/10.20944/preprints202401.0930.v1>
 100. Mamangkey, J., Suryanto, D., Munir, E., ir Mustopa, A. Z. (2019). Isolation, Molecular Identification and Verification of Gene Encoding Bacterial Keratinase from Crocodile (*Crocodylus porosus*) Feces. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 305(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/305/1/012085>
 101. Manczinger, L., Rozs, M., Vágvölgyi, C., ir Kevei, F. (2003). Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(1), 35–39. <https://doi.org/10.1023/A:1022576826372>
 102. Manivasagan, P., Sivakumar, K., Gnanam, S., Venkatesan, J., ir Kim, S. K. (2014). Production, biochemical characterization and detergents application of keratinase from the marine actinobacterium *Actinoalloteichus* sp. MA-32. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(4), 669–682. <https://doi.org/10.1007/s11743-013-1519-4>
 103. Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., ir Frias, J. (2017). Bioactive Peptides in Fermented Foods: Production and Evidence for Health Effects. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00002-9>
 104. Martinez, J. P. D. O., Cai, G., Nachtschatt, M., Navone, L., Zhang, Z., Robins, K., ir Speight, R. (2020). Challenges and opportunities in identifying and characterising keratinases for value-added peptide production. *Catalysts*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/catal10020184>
 105. Mazotto, A. M., Coelho, R. R. R., Cedrola, S. M. L., De Lima, M. F., Couri, S., Paraguai De Souza, E., ir Vermelho, A. B. (2011). Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/523780>
 106. Mitola, G., Escalona, F., Salas, R., ir Garc, E. (2003). *Morphological characterization of in-vitro human hair keratinolysis , produced by identified wild strains of Chrysosporium species*. 163–169.
 107. Mohorčič, M., Torkar, A., Friedrich, J., Kristl, J., ir Murdan, S. (2007). An investigation into keratinolytic enzymes to enhance unguinal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1–2), 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.042>
 108. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., ir Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7)
 109. Nam, G. W., Lee, D. W., Lee, H. S., Lee, N. J., Kim, B. C., Choe, E. A., Hwang, J. K., Suhartono, M. T., ir Pyun, Y. R. (2002). Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-

- 1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, 178(6), 538–547. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0489-0>
110. Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., ir Amjad, F. (2021). Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. *Catalysis Letters*, 151(2), 307–323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>
 111. Navone, L., ir Speight, R. (2018). Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. *PLoS ONE*, 13(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202608>
 112. Navone, L., ir Speight, R. (2020). *Enzymatic removal of dags from livestock : an agricultural application of enzyme technology*. 5739–5748.
 113. Ningthoujam, D. S., Mukherjee, S., Devi, L. J., Singh, E. S., Tamreihao, K., Khunjamayum, R., Banerjee, S., ir Mukhopadhyay, D. (2019). In vitro degradation of β -amyloid fibrils by microbial keratinase. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 5, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.03.003>
 114. Nnolim, N. E., Mpaka, L., Okoh, A. I., ir Nwodo, U. U. (2020). Biochemical and molecular characterization of a thermostable alkaline metallo-keratinase from bacillus sp. Nnolim-k1. *Microorganisms*, 8(9), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091304>
 115. Nnolim, N. E., ir Nwodo, U. U. (2020). Bacillus sp. CSK2 produced thermostable alkaline keratinase using agro-wastes: keratinolytic enzyme characterization. *BMC Biotechnology*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00659-2>
 116. Nnolim, N. E., ir Nwodo, U. U. (2021). Microbial keratinase and the bio-economy: a three-decade meta-analysis of research exploit. *AMB Express*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01155-8>
 117. Nnolim, N. E., Okoh, A. I., ir Nwodo, U. U. (2020). Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes. *Biotechnology Reports*, 27, e00483. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00483>
 118. Nnolim, N. E., Udenigwe, C. C., Okoh, A. I., ir Nwodo, U. U. (2020). Microbial Keratinase: Next Generation Green Catalyst and Prospective Applications. *Frontiers in Microbiology*, 11(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580164>
 119. Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., ir Mierendorf, R. (2001). Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression. *InNovations*, 12, 4–6.
 120. Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., ir Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, 6(5), 1068–1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
 121. Nwadiaro, P., Chuku, A., Onyimba, I., Ogbonna, A., Nwaukwu, I., ir Adekojo, D. (2015). Keratin Degradation by *Penicillium purpurogenum* Isolated from Tannery Soils in Jos, Nigeria. *British Microbiology Research Journal*, 8(1), 358–366. <https://doi.org/10.9734/bmrj/2015/16339>
 122. Ozhelvaci, F., ir Steczkiewicz, K. (2023). Identification and classification of papain-like cysteine proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 299(6), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104801>
 123. Pan, X., Yang, J., Xie, P., Zhang, J., Ke, F., Guo, X., Liang, M., Liu, L., Wang, Q., ir Gao, X. (2021). Enhancement of Activity and Thermostability of Keratinase From *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB2013184 by Directed Evolution With Noncanonical Amino Acids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.770907>
 124. Parinayawanich, S., Sittipol, D., Ajingi, S., ir Rodpan, S. (2021). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Application of recombinant hyperthermostable keratinase for degradation of chicken feather waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36(August), 102146. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102146>
 125. Park, D., Swayambhu, G., ir Pfeifer, B. A. (2020). ScienceDirect Heterologous biosynthesis as a platform for producing new generation natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 66, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.06.014>
 126. Paul, T., Das, A., Mandal, A., Halder, S. K., DasMohapatra, P. K., Pati, B. R., ir Mondal, K. C.

- (2014). Valorization of Chicken Feather Waste for Concomitant Production of Keratinase, Oligopeptides and Essential Amino Acids Under Submerged Fermentation by *Paenibacillus woosongensis* TKB2. *Waste and Biomass Valorization*, 5(4), 575–584. <https://doi.org/10.1007/s12649-013-9267-2>
127. Paul, T., Das, A., Mandal, A., Jana, A., ir Maity, C. (2014). *Effective Dehairing Properties of Keratinase from Paenibacillus woosongensis TKB2 Obtained Under Solid State Fermentation*. 97–107. <https://doi.org/10.1007/s12649-013-9217-z>
128. Pauling, L., Corey, R. B., ir Branson, H. R. (1951). The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(4), 205–211. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.4.205>
129. Pelley, J. W. (2012). Recombinant DNA and Biotechnology. *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*, 161–169. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-07446-9.00018-0>
130. Peng, H., Liang, M., Zhang, J., Liu, W., Yang, Y., Sun, Y., Ke, F., ir Wen, Y. (2024). Identification and characterization of a versatile keratinase , KerZJ , from *Stenotrophomonas* sp . LMY. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03836-5>
131. Preczeski, K. P., Dalasta, C., Czapela, F. F., Kubeneck, S., Scapini, T., Camargo, A. F., Zanivan, J., Bonatto, C., Stefanski, F. S., Venturin, B., Fongaro, G., ir Treichel, H. (2020). *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as Keratinase Producers Using Swine Hair From Agroindustrial Residues. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00071>
132. Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., ir Meyer, A. S. (2020a). *Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function*. January. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607>
133. Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., ir Meyer, A. S. (2020b). Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances*, 44(July), 107607. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607>
134. Quintana-Castro, R., Diaz, P., Valerio-Alfaro, G., García, H. S., ir Oliart-Ros, R. (2009). Gene cloning, expression, and characterization of the geobacillus thermoleovorans CCR11 thermoalkaliphilic lipase. *Molecular Biotechnology*, 42(1), 75–83. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9136-6>
135. Rahimnahal, S., Meimandipour, A., Fayazi, J., Asghar Karkhane, A., Shamsara, M., Beigi Nassiri, M., Mirzaei, H., Hamblin, M. R., Tarrahimofrad, H., Bakherad, H., Zamani, J., ir Mohammadi, Y. (2023). Biochemical and molecular characterization of novel keratinolytic protease from *Bacillus licheniformis* (KRLr1). *Frontiers in Microbiology*, 14(May), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132760>
136. Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., ir Mobasheri, H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular Biology Research Communications*, 5(4), 257–261. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28261629%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5326489>
137. Rajput, R., ir Gupta, R. (2013). Thermostable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12: Production, chitin crosslinking and degradation of Sup35NM aggregates. *Bioresource Technology*, 133, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.091>
138. Razaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., ir Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
139. Riffel, A., ir Brandelli, A. (2006). Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 395–399. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300036>
140. Riffel, A., Ortolan, S., ir Brandelli, A. (2003). De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(8), 855–859. <https://doi.org/10.1002/jctb.828>
141. Rizkia, P. R., Silaban, S., Hasan, K., Kamara, D. S., Subroto, T., Soemitro, S., ir Maksum, I. P.

- (2015). Effect of Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside Concentration on Prethrombin-2 Recombinant Gene Expression in Escherichia Coli ER2566. *Procedia Chemistry*, 17, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.121>
142. Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
 143. Rozs, M., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., ir Kevei, F. (2001). Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of Bacillus licheniformis. *FEMS Microbiology Letters*, 205(2), 221–224. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00462-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00462-1)
 144. Salleh, H. M. (2020). *Chapter 4 Characterization of Recombinant Enzymes. January 2015.* <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12397-4>
 145. Samuel, P., Maheswari, M., Vijayakumar, J., Selvarathinam, T., Amirtharaj, K., ir Deenathayalan, R. (2018). Bio-prospecting of marine-derived fungi with special reference to production of keratinase enzyme - A need-based optimization study. *Journal of Applied Biology ir Biotechnology*, April. <https://doi.org/10.7324/jabb.2018.60306>
 146. Sangali, S., ir Brandelli, A. (2000). Feather keratin hydrolysis by a Vibrio sp. strain kr2. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01173.x>
 147. Sanghvi, G., Patel, H., Vaishnav, D., Oza, T., Dave, G., Kunjadia, P., ir Sheth, N. (2016). A novel alkaline keratinase from Bacillus subtilis DP1 with potential utility in cosmetic formulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.067>
 148. Santha Kalaikumari, S., Vennila, T., Monika, V., Chandraraj, K., Gunasekaran, P., ir Rajendhran, J. (2019). Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. *Journal of Cleaner Production*, 208, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.076>
 149. Sevastyanovich, Y. R., Alfasi, S. N., ir Cole, J. A. (2010). Sense and nonsense from a systems biology approach to microbial recombinant protein production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(1), 9–28. <https://doi.org/10.1042/ba20090174>
 150. Shakilanishi, S., ir Shanthi, C. (2024). An overview on preparation of enzymes for industrial use. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/10242422.2024.2311098>
 151. Shivakumar, H. N., Repka, M. A., ir Narasimha Murthy, S. (2014). Transungual drug delivery: An update. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(3), 301–310. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50049-4](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50049-4)
 152. Sinkiewicz, I., Śliwińska, A., Staroszczyk, H., ir Kołodziejska, I. (2017). Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1043–1048. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9678-y>
 153. Sivakumar, N., ir Raveendran, S. (2015). Keratin degradation by bacteria and fungi isolated from a poultry farm and plumage. *British Poultry Science*, 56(2), 210–217. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.996119>
 154. Son, H. J., Park, H. C., Kim, H. S., ir Lee, C. Y. (2008). Nutritional regulation of keratinolytic activity in Bacillus pumilis. *Biotechnology Letters*, 30(3), 461–465. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9567-3>
 155. Srivastava, B., Singh, H., Khatri, M., Singh, G., ir Arya, S. K. (2020). Immobilization of keratinase on chitosan grafted- β -cyclodextrin for the improvement of the enzyme properties and application of free keratinase in the textile industry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1099–1110. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.009>
 156. Stiborova, H., Branska, B., Vesela, T., Lovecka, P., Stranska, M., Hajslova, J., Jiru, M., Patakova, P., ir Demnerova, K. (2016). Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(6), 1629–1637. <https://doi.org/10.1002/jctb.4912>
 157. Supuran, C. T., Scozzafava, A., ir Clare, B. W. (2002). Bacterial protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 22(4), 329–372. <https://doi.org/10.1002/med.10007>
 158. Sypka, M., Jodłowska, I., ir Białkowska, A. M. (2021). Keratinases as versatile enzymatic tools

- for sustainable development. *Biomolecules*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biom11121900>
159. Takami, H., Nogi, Y., ir Horikoshi, K. (1999). Reidentification of the keratinase-producing facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. *Extremophiles*, 3(4), 293–296. <https://doi.org/10.1007/s007920050130>
 160. Tang, Y., Guo, L., Zhao, M., Gui, Y., Han, J., Lu, W., Dai, Q., Jiang, S., Lin, M., Zhou, Z., ir Wang, J. (2021). A novel thermostable keratinase from *Deinococcus geothermalis* with potential application in feather degradation. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/app11073136>
 161. Terry, C., ir Wadsworth, J. D. F. (2019). Recent advances in understanding mammalian prion structure: A mini review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(July), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00169>
 162. Tiwary, E. (2012). Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15. *Journal of Bioprocessing ir Biotechniques*, 02(04), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000123>
 163. Tsiroulnikov, K., Rezai, H., Bonch-Osmolovskaya, E., Nedkov, P., Gousterova, A., Cueff, V., Godfroy, A., Barbier, G., Métro, F., Chobert, J. M., Clayette, P., Dormont, D., Grosclaude, J., ir Haertlé, T. (2004). Hydrolysis of the amyloid prion protein and nonpathogenic meat and bone meal by anaerobic thermophilic prokaryotes and *Streptomyces* subspecies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6353–6360. <https://doi.org/10.1021/jf0493324>
 164. Ul-Haq, I., ir Akram, F. (2019). Striking applications of keratinase enzyme isolated from various natural sources: A review. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: Part B*, 55(4), 1–17.
 165. Uttangi, V., ir Aruna, K. (2018). Optimization of Production and Partial Characterization of Keratinase Produced by *Bacillus thuringiensis* strain Bt407 Isolated from Poultry Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(04), 596–626. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.069>
 166. Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K. K., Kaur, S., ir Dhilon, G. S. (2017). Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(4), 476–491. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1185388>
 167. Vidmar, B., ir Vodovnik, M. (2018). Microbial keratinases: Enzymes with promising biotechnological applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 312–328. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5658>
 168. Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., ir Meyers, M. A. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229–318. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>
 169. Wang, J. J., ir Shih, J. C. H. (1999). Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 608–616. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900667>
 170. Wang, L., Cheng, G., Ren, Y., Dai, Z., Zhao, Z. S., Liu, F., Li, S., Wei, Y., Xiong, J., Tang, X. F., ir Tang, B. (2015). Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces* sp. CDF and characterization of its keratinolytic protease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3949–3959. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6207-4>
 171. Wang, Z., Chen, Y., Yan, M., Li, K., Obinwanne, C., Fang, Z., ir Ni, Z. (2023). Research progress on the degradation mechanism and modification of keratinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1003–1017. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12360-3>
 172. Webb, C. T., ir Lithgow, T. (2020). *Deciphering the transcriptional changes in Escherichia coli strains C41 (DE3) and C43 (DE3) that makes them a superior choice for membrane protein production . 41*, 1–29.
 173. Williams, C. M., Richter, C. S., Mackenzie, J. M., ir Shih, J. C. H. (1990). *Isolation , Identification , and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium*. 56(6), 1509–1515.
 174. Wu, B., Shi, P., Li, J., Wang, Y., Meng, K., Bai, Y., Luo, H., Yang, P., Zhou, Z., ir Yao, B. (2010). A new aminopeptidase from the keratin-degrading strain *Streptomyces fradiae* var. k11. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(3), 730–739. <https://doi.org/10.1007/s12010-009->

175. Wu, W. L., Chen, M. Y., Tu, I. F., Lin, Y. C., Eswarkumar, N., Chen, M. Y., Ho, M. C., ir Wu, S. H. (2017). The discovery of novel heat-stable keratinases from *Meiothermus taiwanensis* WR-220 and other extremophiles. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04723-4>
176. Xie, F., Chao, Y., Yang, X., Yang, J., Xue, Z., Luo, Y., ir Qian, S. (2010). Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. *Bioresource Technology*, 101(1), 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.026>
177. Yahaya, R. S. R., Normi, Y. M., Phang, L. Y., Ahmad, S. A., Abdullah, J. O., ir Sabri, S. (2021). Molecular strategies to increase keratinase production in heterologous expression systems for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(10), 3955–3969. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11321-y>
178. Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K., ir Tamiya, E. (2002). Keratin degradation: A cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(5), 1138–1143. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00580-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00580-6)
179. Zaky, A. A., Simal-Gandara, J., Eun, J. B., Shim, J. H., ir Abd El-Aty, A. M. (2022). Bioactivities, Applications, Safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides From Food and By-Products: A Review. *Frontiers in Nutrition*, 8(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>
180. Zhang, M., Jiang, L., Li, F., Xu, Y., Lv, S., ir Wang, B. (2019). Simultaneous dermatophytosis and keratomycosis caused by *Trichophyton interdigitale* infection: A case report and literature review. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4612-0>
181. Zhang, R. X., Gong, J. S., Su, C., Qin, J., Li, H., Li, H., Shi, J. S., ir Xu, Z. H. (2020). Recombinant expression and molecular engineering of the keratinase from *Brevibacillus parabrevis* for dehairing performance. *Journal of Biotechnology*, 320(June), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.06.016>
182. Zoccola, M., Montarsolo, A., Mossotti, R., Patrucco, A., ir Tonin, C. (2015). Green Hydrolysis as an Emerging Technology to Turn Wool Waste into Organic Nitrogen Fertilizer. *Waste and Biomass Valorization*, 6(5), 891–897. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9393-0>

FINANSINĖ PARAMA



Kuriame
Lietuvos ateitį

2014–2020 metų
Europos Sąjungos
fondų investicijų
veiksmų programa

Baigiamasis Darbas dalinai finansuotas Europos socialinio fondo lėšomis pagal priemonę Nr. P-ST-22-25 ir Nr. P-ST-23-339.

Projektai: „Keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų heterologinės raiškos sistemos sukūrimas“, „*Streptomyces* sp. SK-91 koduojamų keratinoliziniu aktyvumu pasižyminčių baltymų sintezės optimizavimas bei tikslinių baltymų gryninimas“.

PADĒKA

Noriu nuoširdžiai padēkoti savo darbo vadovui **dr. Audriui Gegeckui** uē suteiktā galimybē atlikti mokslinē darbā, uē kantrybē bei supratingumā padedant atlikti tyrimus, uē pagalbā ir rūpestē raēant bakalaura darbā bei uē naudingus patarimus ir diskusijas, kurios padējo gilinti savo žinias.

Noriu padēkoti Gyvybēs mokslū centro, Biomokslū instituto direktorei **prof. dr. Eglei Lastauskienei** uē galimybē dirbti eukariotū molekulinēs mikrobiologijos laboratorijoje.

Esu dēkinga **lekt. Justinai Versockienei** uē pagalbā, patarimus bei rūpestē atliekant tyrimus.

Noriu išreikēti padēkā **dr. Arnoldui Kaunieēiui** uē galimybē atlikti norimus eksperimentus.

Aēiū laboratorjos **kolegoms** uē paslaugumā bei gerā atmosferā, kurioje buvo dēiugu dirbti.

Dēkoju savo **ēeimai ir draugams**, kurie nuolatos rūpinasi bei skatina siekti savo tikslū.