

«Сейфуллин окулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.І, Ч.ІІІ. - С. 171-174

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКОГО ШТАММА BACILLUS A5.3

*Актаева С.А. докторант
Евразийский национальный университет им. Л.Н.Гумилева, г. Нур-Султан
Балтин К.К., старший научный сотрудник
Национальный центр биотехнологии, г. Нур-Султан*

Перья составляют 7-10% от массы курицы, таким образом, на птицефабриках по всему миру образуется по несколько миллионов тонн перьевых отходов. Чаще всего перья относят именно к отходам по причине отсутствия эффективных способов переработки. Тем не менее, биомасса пера почти на 90% состоит из белка [1], который является ценным биологическим продуктом, а гидролизаты пера могут быть источником пептонов [2,3]. К сожалению, белки перьев состоят из нерастворимых белков, сильно сшитых дисульфидными связями, например, β -кератин [4], что обеспечивает высокую механическую прочность пера и сложность утилизации.

Наиболее перспективным решением по переработке перьев является использование ферментативного гидролиза кератина. В данном процессе предпочтительнее использовать кератиназы, способные расщеплять дисульфидные связи, из-за присутствия которых кератин плохо поддается воздействию таких протеаз как пепсин. Кератиназы (КФ 3.4.99.11) являются серинили металлопротеазами [5], источниками этих ферментов могут выступать различные микроорганизмы: бактерии, грибы и археи [6]. Бактерии показывают наибольшие перспективы для технологии обработки кератина.

Технология переработки перьев в корм путем механического измельчения и термической обработки, на наш взгляд, не является оптимальным решением, поскольку β -кератин, в силу своей стабильности, практически не разлагается и не переваривается в пищеварительном тракте птиц. Более того, перьевой порошок забивает кишечник птицы и затрудняет переваривание корма [7]. Поэтому целью данной работы было найти бактериальный продуцент кератинолитических ферментов для последующего использования в технологиях органической переработки перьевых отходов.

В рамках данной работы были отобраны образцы почвы из мест скопления перьев на местной птицефабрике. Методом посева из разведений почвенных суспензий получены отдельные колонии, которые тестировали на протеолитическую активность с помощью молочного агара. Одна колония на пластине агара выбиралась случайным образом и подвергалась идентифика-

ции и дальнейшему анализу. Были выделены четыре бактериальных штамма: A5.3, A5.5, A7.1 и A11.2.



Рисунок 1 - Колонии изолятов *Bacillus* A5.3, A5.5, A7.1 и A11.2 на молочном агаре.

При идентификации выделенных штаммов использовали микробиологические методы (анализ колоний микробиологических культур, окрашивание по Граму в сочетании со световой микроскопией) и молекулярные методы (секвенирование 16S рРНК, секвенирование геноспецифических локусов ДНК, анализ профиля рибосомальных белков с помощью системы Biotyper, протеомный анализ секреторных белков методом LC-MS/MS). В результате, основываясь на данных морфологии (грамположительные, овальные, подвижные, образующие споры, (Рисунок 1), результатах BLAST, результатах MALDI Biotyper (Таблица 1), мы пришли к выводу, что изоляты A5.3, A5.5, A7.1, A11.2 относятся к роду *Bacillus*.

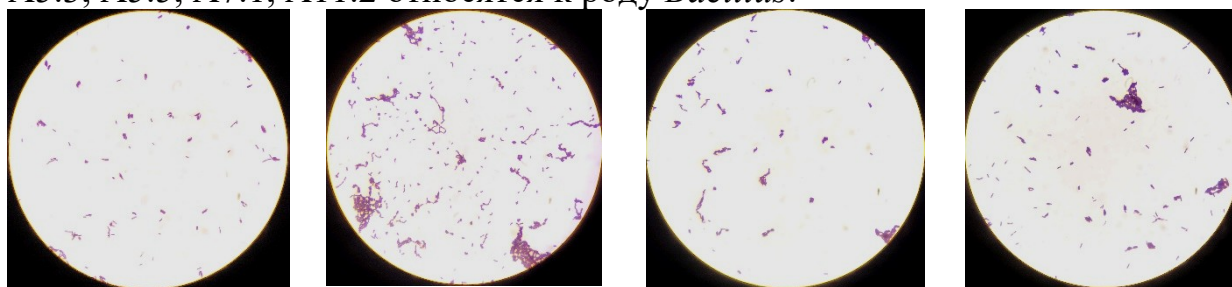


Рисунок 2 -Микроскопия штаммов A5.3 (А), A5.5 (Б), A7.1 (В), A11.2 (Г)

Таблица 1 - Результаты идентификации изолятов в соответствии с данными MALDI Biotyper

Штамм	Организм (Лучшее совпадение/второе по значению совпадение)	Оценка
A5.3	<i>Bacillus vallismortis</i>	1.981
	<i>Bacillus subtilis</i>	1.952
A5.5	<i>Bacillus subtilis</i>	1.819
	<i>Bacillus mojavensis</i>	1.761
A7.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.879
	<i>Bacillus mycoides</i>	1.812
A11.2	<i>Bacillus cereus</i>	2.3
	<i>Bacillus cereus</i>	2.223

Культивирование изолятов на перьевой среде в течение 96 ч показало, что *Bacillus* sp. A5.3 обладает самой высокой активностью (Рисунок 3).

Control A5.3 A5.5 A7.1 A11.2

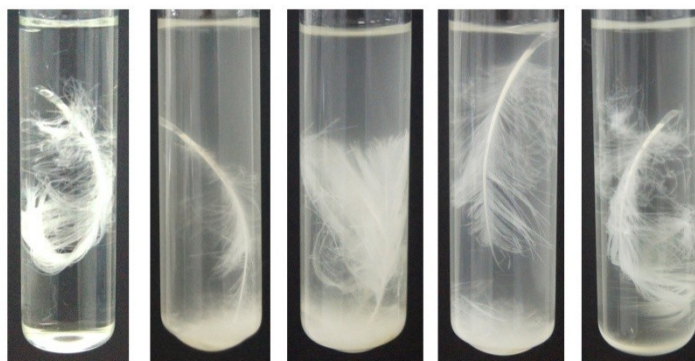


Рисунок 3 - Деградация пера изолятами *Bacillus* sp. A5.3, A5.5, A7.1 и A11.2.

В дальнейших экспериментах изолят *Bacillus* sp. A5.3 был выбран в качестве штамма, продуцирующего кератинолитические и протеолитические ферменты.

Для штамма A5.3 мы провели дополнительные исследования. Анализ данных Mascot для секреторного протеома показал наличие белков, сходных с белками *Bacillus subtilis* 168. Однако клонирование, секвенирование и выверка генов *clpY clpX ytiP* из ДНК штамма A5.3 показало их большее сходство с *Bacillus amyloliquefaciens* (штамм ALB69) и *Bacillus velesensis* (штамм SRCM102755), чем с *Bacillus subtilis* (штамм 168). Поскольку штамм A5.3 также показал амилазную активность в йод-крахмальном тесте, мы провели дополнительные исследования гена амилазы в геномной ДНК штамма. Использовали праймеры для гена амилазы *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus velesensis*. Положительный результат был установлен только при использовании праймеров для *Bacillus velesensis*. Клонирование, секвенирование и выверка гена амилазы показало близость всех *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. velesensis* друг к другу в гене.

В дальнейших экспериментах был использован ферментативный экстракт, полученный путем сбора и фильтрации супернатанта после культивирования *Bacillus* sp. A5.3 на минимальной перьевой среде.

Субстратная специфичность была проверена на натриевой соли казеина, BSA, желатина и β -кератина. Экспериментально было показано, что скорость гидролиза различных субстратов ферментативным экстрактом различна. Было обнаружено, что натриевая соль казеина гидролизует быстрее, чем другие субстраты (Рисунок 4А); она начала разрушаться через 15 с после обработки ферментативным экстрактом и была полностью гидролизована за 1 мин. БСА и овальбумин были полностью гидролизованы ферментами за 60 и 15 мин, соответственно (Рисунок 4В,С). β -Кератин оказался наиболее устойчивым к действию ферментативного экстракта (Рисунок 4D). Даже после 2 ч переваривания он гидролизировался не полностью.

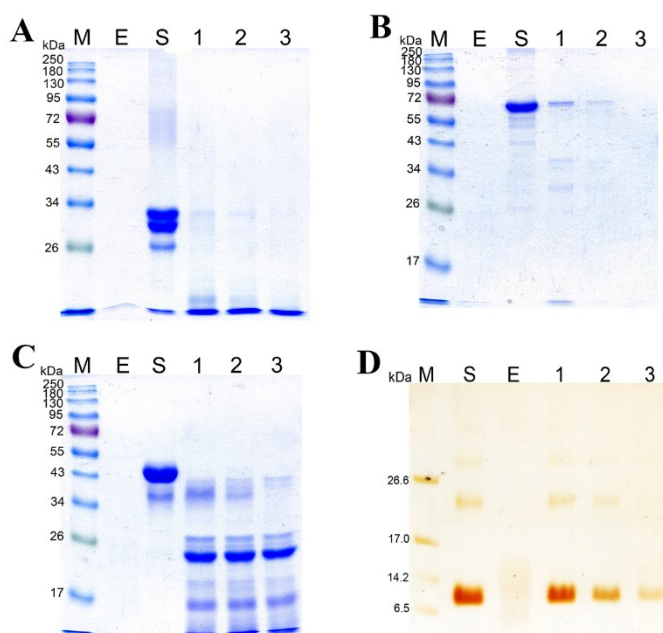


Рисунок 4 - Деградация натриевой соли казеина (А), БСА (В), овальбумина (С) и β -кератина (D) ферментативным экстрактом *Bacillus* sp. A5.3 в зависимости от времени инкубации. М - маркеры молекулярной массы белка. Е - ферментативный экстракт без субстрата; S - субстрат. А: полоса 1 – 15 с; полоса 2 – 30 с; и полоса 3 – 60 с. В: полоса 1 – 5 мин; полоса 2 – 15 мин; и полоса 3 – 60 мин. С: полоса 1 – 1 мин; полоса 2 – 5 мин; и полоса 3 – 15 мин. D: полоса 1 – 30 мин; полоса 2 – 60 мин; и полоса 3 – 120 мин.

В данном исследовании из мест скопления перьев был выделен *Bacillus* sp. A5.3. Культивирование штамма на минимальной перьевой среде показало его эффективность в части деградации пера. Кроме того, ферменты, секретруемые *Bacillus* sp. A5.3, имеют широкую субстратную специфичность. Данная работа может предложить эффективные бактериальные кератиназы для ферментативного гидролиза перьев с точки зрения переработки отходов птицефабрик и производства белковых кормовых добавок.

Проведенные исследования были финансированы Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (BR10764944).

Список использованной литературы

- 1 Adler, S.A. *In vitro* pepsin digestibility and amino acid composition in soluble and residual fractions of hydrolyzed chicken feathers [Text]/ Adler, S.A.; Slizyte, R.; Honkapää, K.; Løes, A.-K. // *Poult. Sci.* – 2018. – №97. – С.3343–3357, <https://doi.org/10.3382/ps/pey175>.
- 2 Akpor, O.B. Chicken feather hydrolysate as alternative peptone source for microbial cultivation [Text]/ Akpor, O.B.; Odesola, D.E.; Thomas, R.E.; Oluba, O.M. // *F1000Research.* – 2018. – №7, статья №1918, <https://doi.org/10.12688/f1000research.17134.1>.
- 3 Taskin, M. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth /Taskin, M.; Kurbanoglu, E. // *J. Appl. Microbiol.* –

2011. – №111. – C.826–834, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05103.x>.
- 4 Ramnani, P. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: Structural and biochemical mechanism of feather degradation /Ramnani, P.; Singh, R.; Gupta, R. // Can. J. Microbiol. – 2005. – №51. – C.191–196, <https://doi.org/10.1139/w04-123>.
 - 5 Gupta, R. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview /Gupta, R.; Ramnani, P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – №70. – C.21–33, <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>.
 - 6 Brandelli, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications /Brandelli, A.; Daroit, D.J.; Riffel, A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009 – № 85. – C.1735–1750, <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2398-5>.
 - 7 Adetunji, C.O. Efficacy of crude and immobilized enzymes from *Bacillus licheniformis* for production of biodegraded feather meal and their assessment on chickens /Adetunji, C.O.; Adejumo, I.O. // Environ. Technol. Innov. – 2018. – № 11. – C.116–124, <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.05.002>.