



УДК 579.6

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ И КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ШТАММА *BACILLUS* SP. A5.3

Актаева С.¹, Сапарбаев М.²

¹ Евразийский Национальный Университет им. Л.Н.Гумилева,
ул. Сатпаева, 2, г.Нур-Султан, 010000, Казахстан

² Институт Густава Русси,
114 Rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, Франция
aktayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Перья, в качестве основной доли отходов промышленного птицеводства, требуют особого подхода при утилизации, и, в тоже время представляют интерес в качестве источника кормового белка. Биомасса пера на 90% состоит из β -кератина, гидролизаты которого могут быть ценным источником пептонов, однако кератин пера обладает высокой устойчивостью к действию большинства протеолитических ферментов. Поэтому для его гидролиза, кератин необходимо подвергнуть специальной обработке, цель которой – разрушить компактную структуру кератиновой молекулы до получения полипептидов, пептидов и отдельных аминокислот. Для ферментативного гидролиза кератина используются протеазы с кератиназной активностью, способные расщеплять дисульфидные связи кератина.

Из мест скопления перьевых отходов был выделен штамм *Bacillus* sp. A5.3, который показал высокую протеолитическую и кератинолитическую активность. Штамм способен расти на минимальной перьевой среде и обладает казеинолитической, коллагеназной и β -кератинолитической активностью. Секреторный протеом штамма был изучен с помощью наноВЭЖХ/Q-TOF-MS. В результате было идентифицировано 154 белка, 13 из которых являются протеазами и пептидазами. Гены 3 протеаз и пептидаз *clpY*, *clpX* и *utjP* были амплифицированы из геномной ДНК *Bacillus* sp. A5.3, секвенированы, а нуклеотидная последовательность генов депонирована в базе данных GenBank. Изучение штамма *Bacillus* sp. A5.3 показало, что штамм способен к эффективной деградации пера и перспективен в качестве продуцента протеолитических и кератинолитических ферментов.

Ключевые слова: кератиназа, *Bacillus*, перо, СЭМ

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование химических препаратов в различных промышленных процессах неуклонно растет, непосредственно влияя на здоровье человека. Вследствие чего, актуальным является замена вредных химических веществ аналогами, не оказывающими негативного воздействия на окружающую среду. Ферменты, секретируемые клетками живых организмов, могут выступать в этом качестве на различных производствах: в легкой и пищевой промышленности, производстве моющих средств, обработке кожи, кормопроизводстве, переработке отходов.

Протеазы (КФ 3.4.11) распространены повсеместно, они продуцируются растениями, животными и микроорганизмами. Микробные протеазы являются наиболее востребованными по причине их низкой стоимости, высокой ферментативной активности, широким спектром действия и высокой продуктивности штаммов. Среди микробных

штаммов-продуцентов протеолитических ферментов чаще остальных в коммерческих целях используются бактерии рода *Bacillus* [1]. Микробные протеазы востребованы в технологиях переработки отходов мясомолочной продукции: мясокомбинатов и молокозаводов. Наряду с протеазами, гидролизующими белковые вещества, особый интерес представляют кератиназы (КФ 3.4.99). Эта группа протеолитических ферментов катализирует расщепление и гидролиз высокостабильных и волокнистых белков – кератинов. Кератины состоят из длинных полипептидных цепей, стабилизированных дисульфидными связями, гидрофобными взаимодействиями и водородными связями [2]. В отличие от большинства белков, кератины содержат большой процент гидрофобных аминокислотных остатков, нерастворимы в воде и обладают высокой устойчивостью к действию протеаз.

Биомасса пера на 90% состоит из белка [3], гидролизаты которого могут быть ценным источником пептонов [4, 5]. Перо богато незаменимыми аминокислотами лейцином, валином, аргинином, изолейцином, фенилаланином и треонином. Кроме того оно содержит также лизин, метионин, гистидин и триптофан [6], ценность которых трудно переоценить. Такие серосодержащие аминокислоты как цистеин и метионин наряду с треонином, тирозином и фенилаланином важны для биосинтеза кератина волос и пера [7]. Однако, белки пера в основном являются нерастворимыми, широко сшитыми дисульфидными связями, например β -кератин [8].

В связи с резким сокращением биологических ресурсов использование гидролизатов пера в качестве источника аминокислот и пептонов актуально для биотехнологических производств [9]. Для ферментативного гидролиза кератина используются кератиназы, способные расщеплять дисульфидные связи и относящиеся к семейству сериновых протеаз и металопротеаз [10]. Известно большое количество микроорганизмов, продуцирующих кератиназы [10, 11], включая грибы [12-15] и актиномицеты [16, 17]. В тоже время, бактерии являются наиболее перспективными в технологии обработки кератина микроорганизмами [18, 19]. Многие кератиназы секвенированы, клонированы и охарактеризованы [20-22]. Потребность в высокоэффективных протеолитических ферментах способствует поиску и изучению новых ферментов с кератиназной активностью. Поэтому наряду с получением кератин-разрушающих микроорганизмов перспективными являются исследования генов белков с кератиназной активностью. Полученные знания позволят получить рекомбинантные ферментные препараты для использования в технологиях переработки малоценного перьевого материала в ценный белковый продукт [23].

В данной работе из мест скопления перьевых отходов на птицефабрике была выделена бактерия, способная к росту на перьевой среде. Идентификация бактерии была основана на морфологических, молекулярно-генетических и протеомных признаках. Были идентифицированы многообещающие гены-кандидаты, проведено их клонирование, секвенирование и депонирование в международной базе данных GenBank.

Материалы и методы

Питательные среды. Для выделения и ферментативного культивирования микроорганизмов, разрушающих перо, использовалась минимальная среда (перьевой бульон), которая содержала следующие компоненты (г/л): NaH_2PO_4 (0,3), Na_2HPO_4 (0,35) и перо (7,5), pH 7,0. Для скрининга микроорганизмов использовали перьевой и молочный агар. Питательный бульон (0,5% (м/об) пептона, 0,5% (м/об) NaCl , 0,15% (м/об) дрожжевого экстракта, 0,15% (м/об) мясного экстракта, pH 7,4) и питательный агар использовали для культивирования изолятов. Среду Луриа-Бертани (LB) (1% (м/об) пептона, 0,3% (м/об) дрожжевого экстракта, 0,5% (м/об) NaCl , pH 7,2) использовали для приготовления инокулята и поддержания изолята.

Выделение и идентификация штамма. Образцы почвы были собраны из мест скопления перьев на птицефабрике недалеко от города Нур-Султан и с частного подворья. Один грамм

образца встряхивали с 9 мл 0,9% (м/об) NaCl в течение 30 мин, 100 мкл полученной суспензии высевали в чашки с перьевым агаром с последующим культивированием при 37 °С в течение 48 часов. Отдельные колонии проверяли на протеолитическую активность на чашке с молочным агаром. Колонии с подтвержденной активностью высевали на чашки с перьевым агаром. Выбранные случайным образом отдельные колонии с перьевого агара были идентифицированы и использовались для дальнейших исследований.

Изучение морфологических признаков колоний проводили с помощью световой микроскопии (Zeiss Primo Star, Германия), а характеристики каждого изолята сравнивали с данными из Справочника Берджи [24] по бактериологической систематике.

Молекулярно-генетическую идентификацию штаммов проводили путем амплификации и секвенирования фрагмента консервативного локуса 16S rRNA.

Определение прямой нуклеотидной последовательности целевого гена проводили по методу Сэнгера с применением набора «BigDye Terminator v 3.1 Cycle sequencing Kit». Разделение фрагментов гена проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Последовательность сравнивали с данными из GenBank, используя Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Идентификацию по протеомному профилю рибосомальных белков штаммов проводили на масс-спектрометре (MALDI-TOF Biotyper Microflex LT; Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Штаммы выращивали на чашках с питательным агаром при 37°С в течение 48 ч. Отдельные бактериальные колонии (3 колонии на штамм) отбирали в чашках с агаром и переносили на полированную стальную пластину-мишень с помощью стерильной зубочистки; в каждую лунку добавляли 1 мкл насыщенного раствора α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50% ацетонитриле, содержащем 2,5% трифторуксусной кислоты (ТФУ). Бактерии идентифицировали с помощью MS-анализа, где каждую колонию анализировали в трех экземплярах с помощью программного обеспечения FlexControl (3.0, Bruker), а затем полученные спектры сравнивали с эталонной базой данных. Результаты выражались в баллах схожести [25, 26].

Деградация пера. Инокулят штамма *Bacillus* sp. A5.3 получали на жидкой среде LB в течение 16 часов в динамических условиях на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин и 37°С. Полученной суспензией инокулировали минимальную перьевую среду. Культивирование проводилось в шейкере при 250 об/мин, 37°С на протяжении 216 часов. Деградация пера фиксировалась взвешиванием сухого остатка перьевой среды во время инкубации. Для этого культура фильтровалась через предварительно взвешенную фильтровальную бумагу, дважды промывалась дистиллированной водой и высушивалась при 60°С до постоянного веса. Результаты выражались в процентах к начальному весу (100%).

Электронная сканирующая микроскопия. Перо было обработано культурой штамма *Bacillus* sp. A5.3 в течение 2 суток при 37°С в условиях встряхивания (300 об/мин). В качестве контрольного образца было использовано перо с инкубацией при тех же условиях, но без добавления культуры штамма *Bacillus* sp. A5.3. Степень дегградации пера исследовали с помощью электронной сканирующей микроскопии. Для этого на образец пера напыляли золото (10 нм). Изображения получали на растровом электронном микроскопе Auriga Crossbeam 540 (Carl Zeiss, Германия) при 3 кВ.

Зимографический анализ. Культуральные супернатанты *Bacillus* sp. A5.3 были получены из бакмассы, выращенной на минимальной перьевой среде в течение 48 часов при 37°С. Осветленный супернатант получали центрифугированием (10,000 \times g, 4°С, 10 минут). Путем фильтрации через мембрану с размером пор 0.22 мкм из супернатанта удаляли микрочастицы и бактерии. Кератинолитическая активность ферментативного экстракта оценивалась с помощью 12,5% ПААГ, сополимеризованного с 0,07% кератином. Порошок растворимого кератина получали из обезжиренных куриных перьев по модифицированному методу [27]. Ферментативный экстракт смешивали с загрузочным буфером (85 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.67% бромфеноловый синий, 20% глицерол) в соотношении 6:4 без нагревания. Электрофорез осуществляли в режиме постоянного напряжения 170 В на

протяжении 70 минут. После электрофореза гель промывали в 2,5% растворе Triton X-100 дважды по 10 минут, затем инкубировали в течение 24 часов в 0,5 М Tris (pH 8.5). Гель окрашивали коллоидным кумасси G-250 (8% сульфат аммония, 1,6% фосфорная кислота, 20% этанол, 0,08% Кумасси G-250). В качестве стандарта молекулярных весов использовали Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs #P7712).

Анализ секреторной протеомы методом масс-спектрометрии и протеомики. Ферментативный экстракт, профильтрованный через мембрану с размером пор 0,22 мкм, был сконцентрирован в 50 раз с помощью Pierce™ Protein Concentrator, 10K MWCO (отсечение по молекулярной массе 10 кДа; Thermo Fisher, USA). Разделение белков проводилось в денатурирующем 12% ДСН-ПААГ по Лэммли в камере вертикального электрофореза miniProtean-IV (Bio-Rad Laboratories Inc). Электрофорез осуществляли в режиме постоянного напряжения 120 В на протяжении 90 минут. Гель окрашивали 2% Кумасси ярко-голубым R-250. Каждая дорожка геля была разрезана на 4 части. Белки были восстановлены из геля и обработаны, как описано ранее [28, 29]. Затем, к 100 мкл 13,33 нг/мкл трипсина (Promega, V5280) добавляли 15 мкл 190 мМ аммония бикарбоната для активации фермента. Образцы инкубировали со смесью трипсина 16 часов при 37°C. Пептидную смесь очищали на микроколонках ZipTip C18 (Millipore, ZTC18S096) согласно протоколу производителя. Пептидсодержащий супернатант осаждали и высушивали при 35 °С в течение 30 мин на вакуумном концентраторе. К высушенным образцам добавляли 10 мкл 0,1%-ногораствора ТФУ. Использовали установку улавливающей колонки (предварительная колонка Acclaim PepMap100 C18, 5 мм × 300 мкм; частицы 5 мкм; Thermo Scientific) и насос для ВЭЖХ Dionex (Ultimate 3000 RSLCnano System, Thermo Scientific). Для этого эксперимента пептиды разделяли на колонке Acclaim Pep-Map RSLC (15 см × 75 мкм, частицы 2 мкм; Thermo Scientific) с 75-минутным многоступенчатым градиентом ацетонитрила (буфер А: 0,1% муравьиной кислоты; буфер В: 90% ацетонитрил / 10% H₂O в 0,1% муравьиной кислоте) при скорости потока 0,3 мкл/мин в соответствии со следующей таблицей времени: 0 минут – 2% буфер В; 10 минут – 2% буфер В; 58 минут – 50% буфер В; 59 минут – 99% буфер В; 69 минут – 99% буфер В; 70 минут – 2,0% буфер В; и 75 минут – 2,0% буфер В. Немодифицированный ионный источник CaptiveSpray (капилляр 1300 В, сухой газ 3,0 л/мин, температура в сухом состоянии 150 °С) использовали для сопряжения системы жидкостной хроматографии с прибором Impact II (Bruker). Для количественной оценки были получены полноскановые масс-спектры со спектральной частотой 2,0 Гц с последующей записью 1 тандемного масс-спектра. Для сбора данных из образца были выбраны два наиболее распространенных иона-предшественника для фрагментации, в результате чего общее время цикла составило 3 с. Массовый диапазон сканирования MS был установлен от м/з 150 до 2200 в режиме положительной ионной полярности.

Программное обеспечение Mascot использовалось для выполнения поиска в базе данных SwissProt 2016_08 (552 884 последовательности; 197 760 918 остатков). Параметры поиска: переменные модификации, окисление (М), толерантность по массе ионов фрагментов, 20 ppm; толерантность к исходным ионам, 20 ppm.

Амплификация и клонирование генов. Для получения нуклеотидных последовательностей кандидатных генов были подобраны и синтезированы праймеры. Олигонуклеотиды были сконструированы так, чтобы они содержали рестрикционные цитаты NdeI и XhoI для прямого и обратного олигомера, соответственно (таблица 1).

Таблица 1. Олигонуклеотиды

отид	ая последовательность
	TGATCCTGGCTCAG-3'
	CCAGGGTATСТААТ-3'
	GACTCACTATAGGG-3'
	GATTGCTCAGCGG-3'
	TCCGCGCTCCGGCTTCTTCAAAAACGT-3'



	GAGTTCAACAGTGAAAGGTTCTTCG-3'
	TCCGCATGGAAAAAACCCTTAACCTCCT-3'
	GAGCAATATAAATTGACTTAAATCTTTGTT-3'
	TCCGCATGACTGCCGTAATGATAAAATAT-3'
	GAGCTTCCCCTTCTCATCATGTTGCT-3'
	TCCGCATGTTTAAATTTAACGAGGAAAAAG-3'
	GAGTGCAGATGTTTTATCTTGGCTTAC-3'
	TCCGCATGAATGGTGAAATCCGCTTGAT-3'
	GAGTAGGGTCAACAAATGTGATTGCT-3'
	TCCGCAAAAACCGCCCAAAAGCTACGAT-3'
	GAGTTTACGTTTTAAATTAATGCCGATCG-3'
	TCCGCATGTTTTATGCGGTTCAACAATCA-3'
	GAGCTCGTTTTTATCTTCTTCCAATGT-3'
	TCCGCATGAACTGGGAAGTTGAAGTGAT-3'
	GAGTTTTGCAAGCTCGTAAATGGCCT-3'
	TCCGCATGAAAGAAGAAATCATTGAACGGT-3'
	GAGTGCTTGCCTTCAAACCTGCTTT-3'
	TCCGCATGAAGCTAGAGAAATTAAGAAACCT-3'
	GAGCAAAATAATAAGTTCTTTTGGGGAA-3'
	TCCGCATGAATCAAGAAACGAAAGCGCTTTTCCA-3'
	GAGCATATTTCTTTAATCGCATCCACT-3'
	TCCGCATGACGTCCGTACGTAACGAT-3'
	GAGTACCATTGGTGACTGTACATAGTA-3'
	TCCGCATGAAATTGTACATGTCAGTAGATAT-3'
	GAGGCAGAATGATGTCCGCATCGCA-3'

Для выделения геномной ДНК из штамма *Bacillus* sp. A5.3 применяли набор GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific). Амплификация генов *clpY*, *clpX* и *ytjP* проводилась с использованием соответствующих олигонуклеотидов. ПЦР смесь содержала 5 мкл 10x реакционного Pfu polymerase буфера с содержанием 20 mM MgSO₄, 5 мкл 2 mM dNTP, 1 мкл соответствующих олигонуклеотидов с концентрацией 10 пкмоль/мкл, 1 мкл геномной ДНК (73 нг/мкл), 1 мкл Pfu polymerase. Условия амплификации были следующими: начальная денатурация 98°C-3 мин, 30 циклов из 98°C — 30 сек, 55°C – 45 сек, 72°C – 2 мин 15 сек, последняя элонгация 72°C – 10 мин. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводили в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Амплифицированные гены клонировали в плазмидный вектор pET28C(+), предварительно обработанный ферментами XhoI и BamHI (Thermo Scientific). Лигирование проводили с использованием T4 DNA лигазы с использованием соответствующего реакционного буфера (Thermo Scientific) при +4°C в течение 16 часов. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* DH5alpha методом температурного шока. Отбор клонов-трансформантов проводили на ЛБ агаре с добавлением антибиотика канамицина в конечной концентрации 50 мкг/мл. Наличие вставки целевых генов определяли ПЦР с использованием олигонуклеотидов T7fw/T7rv. Положительные колонии, содержащие вставку генов, помещали в 5 мл ЛБ бульона, культивировали при 37°C, 16 часов для выделения плазмидной ДНК. Плазмидную ДНК выделяли набором GeneJet Plasmid miniprep kit (Thermo Scientific) по протоколу изготовителя. Секвенирование генов проводили по Сэнгеру с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Анализ нуклеотидных последовательностей и сличение с референтными последовательностями проводили с использованием пакета программ Vector NTI и базы данных NCBI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из мест скопления перьев на территории птицефабрики ТОО «CAPITAL PROJECTS LTD» были выделены микроорганизмы, из которых бактериальный штамм А5.3 способен расти на минимальной солевой среде с кератином пера в качестве единственного источника органических веществ. Через 24 часа культивирования штамма на питательном агаре были выявлены колонии бежевого цвета диаметром 1-2 мм с волнистыми краями. Микроскопический анализ показал, что клетки являются грамположительными, овальными, подвижными и способными к спорообразованию.

Секвенирование и сравнения нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК с данными GenBank показало, что выделенный штамм относится к роду *Bacillus*. Степень гомологии с видами *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168 и *Bacillus velesensis* FZB42 составила 99%. Анализ протеомного профиля рибосомных белков также показал, что исследуемый штамм принадлежит роду *Bacillus*. Видовую принадлежность штамма *Bacillus* sp. А5.3 установить не удалось.

Тест на молочном агаре показал, что штамм *Bacillus* sp. А5.3 обладает протеолитической активностью в отношении молочного белка (рисунок 1). Светлые зоны вокруг колоний образовались в результате гидролиза казеина молока.



Рис. 1. Колонии штамма *Bacillus* sp. А5.3 на молочном агаре после 48 часов культивирования

Культивирование штамма *Bacillus* sp. А5.3 на солевой среде с куриным пером в течение 7 суток показало, что штамм эффективно разрушает перо (Рисунок 2). Через 2 суток наблюдалось разрушение крючков и бородок второго порядка, а на 6-е сутки инкубации были деградированы бородки первого порядка. На седьмые сутки наблюдалось полное обнажение перьевого стержня, среда при этом приобрела молочный цвет.



Рис. 2. Деградация культуры *Bacillus* sp. А5.3 пера на седьмые сутки

Деградация пера после его обработки культурой штамма *Bacillus* sp. А5.3 была установлена и с помощью сканирующей электронной микроскопии (рисунок 3). Так на фотографии видны заметные повреждения в структуре пера (рисунок 3б), которые вызваны протеолитическими ферментами. В контрольном образце (перо, инкубированное в среде без добавления штамма *Bacillus* sp. А5.3) таких повреждений не наблюдается (рисунок 3а).

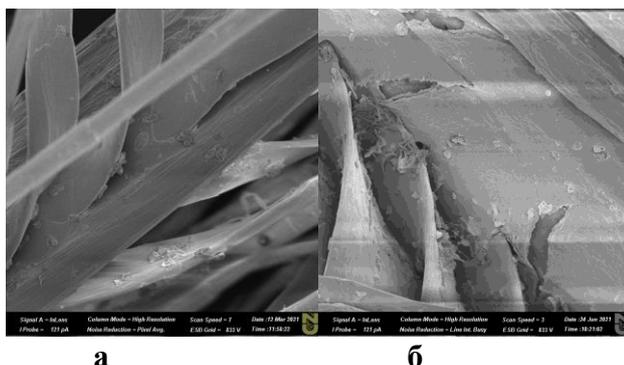


Рис. 3. Электронно-сканирующая микроскопия пера без обработки (а) и после его инкубации с культурой штамма *Bacillus* sp. A5.3 (б)

Дополнительный тест с использованием желатинового агара показал, что штамм *Bacillus* sp. A5.3 наряду с казеинолитической активностью, обладает и коллагеназной активностью (Рисунок 4).



Рис. 4. Колонии штамма *Bacillus* sp. A5.3 желатиновом агаре после 48 часов культивирования

Зимографический анализ надосадочной жидкости штамма *Bacillus* sp. A5.3 после культивирования штамма на перьевой среде показал, что штамм секретирует ферменты и с кератиназной активностью (Рисунок 5). Из зимограммы видно, что *Bacillus* sp. A5.3 секретирует ряд ферментов с различной молекулярной массой, которые разрушают β -кератин и образуют светлые полосы в полиакриламидном геле.

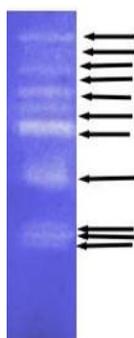
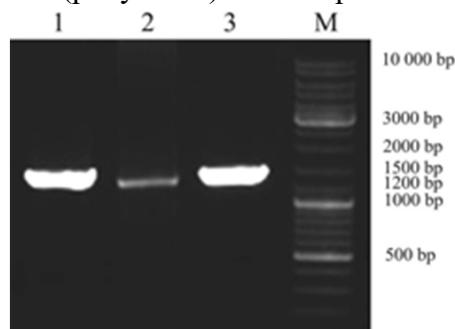


Рис. 5. Зимография ферментативного экстракта штамма *Bacillus* sp. A5.3 на кератиновом субстрате

Для идентификации секретируемых штаммом ферментов был проведен анализ секреторной протеомы с помощью высокочувствительной масс-спектрометрии. Разделенные в ДСН-ПААГ белки гидролизовали трипсином до получения пептидного раствора. Пептиды после их разделения в ВЭЖХ ионизировали электроспреем и анализировали на масс-спектрометре. Биоинформатический анализ спектров на платформе Mascot в сравнении с данными из базы данных SwissProt показал, что в экстракте штамма *Bacillus* sp. A5.3 154 белка схожих с белками штамма *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168 и 13 из которых представляют интерес, так как относятся к протеазам и пептидазам: внеклеточная протеаза Vpr, АТФ-зависимая

протеаза ClpY, протеаза YtrO, АТФ-зависимая протеаза ClpX, внутриклеточная сериновая протеаза Ser, γ -глутамилтранспептидаза gGTP, цитозольная аминопептидаза perA, дипептидаза YtjP, пептидаза perT и YqhT, аминопептидазы YtoP, YhfE и DppA.

Были подобраны олигонуклеотиды, комплиментарные 13 генам и проведена амплификация данных генов на геномной ДНК штамма *Bacillus* sp. A5.3. Из 13 три гена: clpY, clpX и ytjP были успешно амплифицированы (рисунок 6) и клонированы в составе вектора pET-28c(+).



1 – clpY, 2 – clpX, 3 – ytjP; М – ДНК маркер
Рис 6. Результаты ПЦР амплификации генов

Секвенирование генов и анализ нуклеотидной последовательности выявило их большее сходство с генами из группы *Bacillus*, куда кроме *B. subtilis* входят виды *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens*. В таблице 2 приведены результаты данного анализа.

Таблица 2. Степень гомологии генов clpY, clpX и ytjP для видов *B. subtilis*, *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens*

	п.о.	гологии		
				efaciens

Нуклеотидная последовательность генов clpY, clpX и ytjP штамма *Bacillus* sp. A5.3 депонирована в базе данных GenBank: MW276067, MW276068 и MW276069. Штамм *Bacillus* sp. A5.3 депонирован в коллекции микроорганизмов Национального центра биотехнологии за номером IMD-B-464.

Таким образом, полученные данные свидетельствует о том, что выделенный штамм *Bacillus* sp. A5.3 секретирует множество протеолитических ферментов, обладающих гидролизующей активностью в отношении различных белковых субстратов: казеин, коллаген, β -кератин. В то же время, протеазы штамма не обладают α -кератиназной активностью. Перспективность штамма *Bacillus* sp. A5.3 в качестве продуцента протеолитических и кератинолитических ферментов заключается в его применении в технологиях переработки малоценного перьевого сырья в ценный белковый гидролизат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из мест скопления перьевых отходов были выделены микроорганизмы, из которых штамм *Bacillus* sp. A5.3 показал высокую протеолитическую и кератинолитическую активность. Штамм способен расти на перьевой среде и обладает казеинолитической, коллагеназной и β -кератинолитической активностью. Секреторный протеом штамма был изучен с помощью наноВЭЖХ/Q-TOF-MS. В результате было идентифицировано 154 белка, 13 из которых являются протеазами и пептидазами. Гены 3 протеаз и пептидаз clpY, clpX и ytjP были амплифицированы из геномной ДНК *Bacillus* sp. A5.3, секвенированы, а нуклеотидная последовательность генов депонирована в базе данных GenBank. Изучение штамма *Bacillus* sp. A5.3 показало, что штамм способен к эффективной деградации пера и перспективен в качестве продуцента протеолитических и кератинолитических ферментов.

Финансирование

Данное исследование выполнено в рамках грантового проекта AP05135454, финансируемого Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial proteases applications // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2019. – Т. 7. – С. 1-20.
2. Papadopoulos M. C. The effect of enzymatic treatment on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal // *Animal feed science and technology*. – 1986. – Т. 16, № 1/2. – С. 151-156.
3. Adler S. A., Slizyte R., Honkapää K., Løes A. K. *In vitro* pepsin digestibility and amino acid composition in soluble and residual fractions of hydrolyzed chicken feathers // *Poult Sci*. – 2018. – Т. 97, № 9. – С. 3343-3357.
4. Akpor O. B., Odesola D. E., Thomas R. E., Oluba O. M. Chicken feather hydrolysate as alternative peptone source for microbial cultivation // *F1000Research*. – 2018. – Т. 7. – С. 1918.
5. Taskin M., Kurbanoglu E. B. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth // *J Appl Microbiol*. – 2011. – Т. 111, № 4. – С. 826-34.
6. Bandegan A., Kiarie E., Payne R. L., Crow G. H., Guenter W., Nyachoti C. M. Standardized ileal amino acid digestibility in dry-extruded expelled soybean meal, extruded canola seed-pea, feather meal, and poultry by-product meal for broiler chickens // *Poult Sci*. – 2010. – Т. 89, № 12. – С. 2626-33.
7. Glem-Hansen N. The requirements for sulphur containing amino acids of mink during the growth period // *Acta Agriculturae Scandinavica*. – 1980. – Т. 30, № 3. – С. 349-356.
8. Ramnani P., Singh R., Gupta R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation // *Can J Microbiol*. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 191-6.
9. Lasekan A., Abu Bakar F., Hashim D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources // *Waste Manag*. – 2013. – Т. 33, № 3. – С. 552-65.
10. Gupta R., Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2006. – Т. 70, № 1. – С. 21-33.
11. Brandelli A., Daroit D. J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2010. – Т. 85, № 6. – С. 1735-50.
12. Gradisar H., Friedrich J., Krizaj I., Jerala R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases // *Appl Environ Microbiol*. – 2005. – Т. 71, № 7. – С. 3420-6.
13. Muhsin T. M., Hadi R. B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge // *Mycopathologia*. – 2002. – Т. 154, № 4. – С. 185-9.
14. Lopes F. C., Silva L. A., Tichota D. M., Daroit D. J., Velho R. V., Pereira J. Q., Corrêa A. P., Brandelli A. Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger* // *Enzyme Res*. – 2011. – Т. 2011. – С. 487093.
15. Bohacz J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss // *World J Microbiol Biotechnol*. – 2017. – Т. 33, № 1. – С. 13.
16. Ignatova Z., Gousterova A., Spassov G., Nedkov P. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus* // *Can J Microbiol*. – 1999. – Т. 45, № 3. – С. 217-22.
17. Matikevičienė V., Grigiškis S., Levisauskas D., Sirvydytė K., Dižavičienė O., Masiliūnienė D., Ančenko O. Optimization of keratinase production by actinomyces fradiae 119 and its application in degradation of keratin containing wastes // 8th International Scientific and practical conference

- “Environment. Technology. Resources.” – T. 1: III Environmental technologies – Rēzekne: Rēzeknes Augstskola, 2015. – C. 294.
18. Williams C. M., Richter C. S., Mackenzie J. M., Shih J. C. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium // *Appl Environ Microbiol.* – 1990. – T. 56, № 6. – C. 1509-15.
19. Tamreihao K., Mukherjee S., Khunjamayum R., Devi L. J., Asem R. S., Ningthoujam D. S. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production // *J Basic Microbiol.* – 2019. – T. 59, № 1. – C. 4-13.
20. Lin H. H., Yin L. J., Jiang S. T. Cloning, expression, and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system // *J Agric Food Chem.* – 2009. – T. 57, № 9. – C. 3506-11.
21. Hu H., He J., Yu B., Zheng P., Huang Z., Mao X., Yu J., Han G., Chen D. Expression of a keratinase (kerA) gene from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzymes // *Biotechnol Lett.* – 2013. – T. 35, № 2. – C. 239-44.
22. Wang L., Zhou Y., Huang Y., Wei Q., Huang H., Guo C. Cloning and expression of a thermostable keratinase gene from *Thermoactinomyces* sp. YT06 in *Escherichia coli* and characterization of purified recombinant enzymes // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2019. – T. 35, № 9. – C. 135.
23. Deivasigamani B., Alagappan K. M. Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins // *J Environ Biol.* – 2008. – T. 29, № 6. – C. 933-6.
24. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology / John G. Holt, Peter H. Sneath, Noel R. Krieg. – Ninth edition – LWW, 1994. – 787 c.
25. Anderson A. C., Sanunu M., Schneider C., Clad A., Karygianni L., Hellwig E., Al-Ahmad A. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing // *BMC microbiology* – 2014. – T. 14, № 312.
26. Avanzi I. R., Gracioso L. H., Baltazar M. P. G., Karolski B., Perpetuo E. A., Nascimento C. A. O. Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis // *Environ Sci Pollut Res.* – 2017. № 24. – C. 3717–3726.
27. Vermelho A. B., Mazotto A. M., S.M.L.Cedrola. Keratinases: Detection Methods // *Methods to determine enzymatic activity* / Vermelho A. B., Couri S. – U.A.E.: Bentham Science Publishers, 2013. – C. 226-261.
28. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-MS: a mass spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity *in vivo* // *J Proteome Res.* – 2011. – T. 10, № 10. – C. 4416-27.
29. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // *Anal Chem.* – 1996. – T. 68, № 5. – C. 850-8.

REFERENCES

1. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology.*, 2019., vol. 7, pp. 1-20.
2. Papadopoulos M. C. The effect of enzymatic treatment on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal. *Animal feed science and technology.*, 1986., vol. 16, no. 1/2., pp.151-156.
3. Adler S. A., Slizyte R., Honkapää K., Løes A. K. *In vitro* pepsin digestibility and amino acid composition in soluble and residual fractions of hydrolyzed chicken feathers. *Poult. Sci.*, 2018., vol. 97, no. 9., pp.3343-3357.
4. Akpor O. B., Odesola D. E., Thomas R. E., Oluba O. M. Chicken feather hydrolysate as alternative peptone source for microbial cultivation. *F1000Research.*, 2018., vol. 7., pp.1918.

5. Taskin M., Kurbanoglu E. B. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *J Appl Microbiol.*, 2011., vol. 111, no. 4., pp.826-34.
6. Bandegan A., Kiarie E., Payne R. L., Crow G. H., Guenter W., Nyachoti C. M. Standardized ileal amino acid digestibility in dry-extruded expelled soybean meal, extruded canola seed-pea, feather meal, and poultry by-product meal for broiler chickens. *Poult. Sci.*, 2010., vol. 89, no. 12., pp.2626-33.
7. Glem-Hansen N. The requirements for sulphur containing amino acids of mink during the growth period. *Acta Agriculturae Scandinavica.*, 1980., vol. 30, no. 3., pp.349-356.
8. Ramnani P., Singh R., Gupta R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. *Can. J. Microbiol.*, 2005., vol. 51, no. 3., pp.191-6.
9. Lasekan A., Abu Bakar F., Hashim D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Manag.*, 2013., vol. 33, no. 3., pp.552-65.
10. Gupta R., Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006., vol. 70, no. 1., pp.21-33.
11. Brandelli A., Daroit D. J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010., vol. 85, no. 6., pp.1735-50.
12. Gradisar H., Friedrich J., Krizaj I., Jerala R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005., vol. 71, no. 7., pp.3420-6.
13. Muhsin T. M., Hadi R. B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia.*, 2002., vol. 154, no. 4., pp.185-9.
14. Lopes F. C., Silva L. A., Tichota D. M., Daroit D. J., Velho R. V., Pereira J. Q., Corrêa A. P., Brandelli A. Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger*. *Enzyme Res.*, 2011., vol. 2011., pp.487093.
15. Bohacz J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2017., vol. 33, no. 1., pp.13.
16. Ignatova Z., Gousterova A., Spassov G., Nedkov P. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can. J. Microbiol.*, 1999., vol. 45, no. 3., pp.217-22.
17. Matikevičienė V., Grigiškis S., Levisauskas D., Sirvydytė K., Dižavičienė O., Masiliūnienė D., Ančenko O. Optimization of keratinase production by actinomyces fradiae 119 and its application in degradation of keratin containing wastes. 8th International Scientific and practical conference "Environment. Technology. Resources.", vol. 1: III Environmental technologies., Rēzekne: Rēzeknes Augstskola, 2015., pp.294.
18. Williams C. M., Richter C. S., Mackenzie J. M., Shih J. C. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990., vol. 56, no. 6., pp.1509-15.
19. Tamreihao K., Mukherjee S., Khunjamayum R., Devi L. J., Asem R. S., Ningthoujam D. S. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production. *J. Basic. Microbiol.*, 2019., vol. 59, no. 1., pp.4-13.
20. Lin H. H., Yin L. J., Jiang S. T. Cloning, expression, and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system. *J. Agric. Food. Chem.*, 2009., vol. 57, no. 9., pp.3506-11.
21. Hu H., He J., Yu B., Zheng P., Huang Z., Mao X., Yu J., Han G., Chen D. Expression of a keratinase (kerA) gene from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzymes. *Biotechnol. Lett.*, 2013., vol. 35, no. 2., pp.239-44.
22. Wang L., Zhou Y., Huang Y., Wei Q., Huang H., Guo C. Cloning and expression of a thermostable keratinase gene from *Thermoactinomyces* sp. YT06 in *Escherichia coli* and characterization of purified recombinant enzymes, *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2019., vol. 35, no. 9., pp.135.



23. Deivasigamani B., Alagappan K. M. Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. *J. Environ. Biol.*, 2008., vol. 29, no. 6., pp.933-6.
24. John G. Holt, Peter H. Sneath, Noel R. Krieg. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. LWW; Ninth edition. 1994, 787 p.
25. Anderson A. C., Sanunu M., Schneider C., Clad A., Karygianni L., Hellwig E., Al-Ahmad A. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC microbiology*. 2014., vol. 14, no. 312.
26. Avanzi I. R., Gracioso L. H., Baltazar M. P. G., Karolski B., Perpetuo E. A., Nascimento C. A. O. Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. *Environ Sci Pollut Res.*, 2017., no. 24., pp. 3717–3726.
27. Vermelho A. B., Mazotto A. M., Cedrola S.M.L.. Keratinases: Detection Methods. Methods to determine enzymatic activity, U.A.E.: Bentham Science Publishers, 2013., pp.226-261.
28. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-MS: a mass spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity *in vivo*. *J Proteome Res.*, 2011., vol. 10, no. 10., pp.4416-27.
29. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.*, 1996., vol. 68, no. 5., pp.850-8.



BACILLUS SP A5.3 ШТАММЫНЫҢ ПРОТЕОЛИТИКАЛЫҚ ЖӘНЕ КЕРАТИНОЛИТИКАЛЫҚ ФЕРМЕНТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Актаева С.¹, Сапарбаев М.²

¹ Л. Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті,
Сәтпаев к-сі, 2, Нұр-Сұлтан қ., 010000, Қазақстан

² Густав Русси Институты, 114 Rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, Франция
aktayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Қауырсындар өнеркәсіптік құс шаруашылығының қалдықтарының негізгі бөлігі ретінде кәдеге жаратудың ерекше тәсілін қажет етеді және сонымен бірге жемшөп ақуызының көзі ретінде қызығушылық тудырады. Қауырсындың биомассасы 90% β-кератиннен тұрады, оның гидролизаттары пептондардың құнды көзі бола алады, бірақ қауырсын кератині протеолитикалық ферменттердің көпшілігіне өте төзімді. Сондықтан оның гидролизі үшін кератинді арнайы өңдеуден өткізу керек, оның мақсаты полипептидтер, пептидтер және жеке аминқышқылдары алынғанға дейін кератин молекуласының ықшам құрылымын бұзу болып табылады. Кератиннің ферментативті гидролизі үшін кератиннің дисульфидтік байланыстарын ыдыратуға қабілетті кератиназа белсенділігі бар протеаздар қолданылады. *Bacillus* sp A5.3 штаммы қауырсын қалдықтары жиналатын жерлерден бөлінді, ол жоғары протеолитикалық және кератинолитикалық белсенділікті көрсетті. Штамм минималды қауырсын ортасында өсуге қабілетті және казеинолитикалық, коллагеназа және β-кератинолитикалық белсенділікке ие. Штаммның секреторлық протеомасы наноЖТСХ / Q-TOF-MS көмегімен зерттелді. Нәтижесінде 154 ақуыз анықталды, олардың 13-і протеазалар мен пептидазалар. Clp_u, clpX және utjP протеазалары мен пептидазалары *Bacillus* SP A5.3 геномдық ДНҚ-дан күшейтілді, гениң нуклеотидтер тізбегі GenBANK деректер базасында сақталады. *Bacillus* sp A5.3 штаммын зерттеу, штамм қауырсындың тиімді деградациясына қабілетті және протеолитикалық және кератинолитикалық ферменттердің өндірушісі ретінде перспективалы екенін көрсетті.

Негізгі сөздер: кератиназа, *Bacillus*, қауырсын, СЭМ



STUDY OF PROTEOLYTIC AND KERATINOLYTIC ENZYMES OF *BACILLUS* SP. A5.3

Aktaeva S.¹, Saparbayev M.²

¹ L.N. Gumilyov Eurasian National University,

2, Satpayeva str., Nur-Sultan city, 010000, Kazakhstan

² Gustav Russi Institute, 114 Rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France

aktayeva@biocenter.kz

ABSTRACT

Feathers, as a major part of the waste from the industrial poultry industry, require a special approach for disposal and, at the same time, are of interest as a source of feed protein. Feather biomass consists of 90% β -keratin, hydrolysates of which can be a valuable source of pepton, but feather keratin is highly resistant to most proteolytic enzymes. For hydrolysis, therefore, keratin must be subjected to special treatment, the purpose of which is to break down the compact structure of the keratin molecule to produce polypeptides, peptides and single amino acids. For enzymatic hydrolysis of keratin, proteases with keratinase activity are used, capable of cleaving keratin disulfide bonds. A strain of *Bacillus* sp. A5.3 was isolated from feather waste sites and showed high proteolytic and keratinolytic activity. The strain is able to grow on minimal feather medium and has caseinolytic, collagenase and β -keratinolytic activity. The secretory proteome of the strain was studied using nano HPLC/Q-TOF-MS. As a result, 154 proteins were identified, 13 of which are proteases and peptidases. The genes for 3 proteases and peptidases *clpY*, *clpX* and *ytjP* were amplified from the genomic DNA of *Bacillus* sp. A5.3, sequenced, and the nucleotide sequence of the genes was deposited in the GenBank database. A study of a strain of *Bacillus* sp. A5.3 showed that the strain is capable of effective feather degradation and promising as a producer of proteolytic and keratinolytic enzymes.

Keywords: keratinase, *Bacillus*, feathers, SEM