

ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* A5.3 И *BACILLUS LICHENIFORMIS* T7 В ГИДРОЛИЗЕ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Актаева С.*, Балтин К.

Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, г. Астана, 010000, Казахстан

* Корреспондент автор: Актаева С., aktayeva@biocenter.kz

АННОТАЦИЯ

Исследование посвящено потенциалу *Bacillus subtilis* A5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 в качестве источников протеолитических ферментов с коллагеназной активностью для биотехнологической переработки коллагенсодержащих отходов сельского хозяйства. Были проведены выделение, идентификация и характеристика этих бактериальных штаммов с использованием морфологических, биохимических и молекулярно-генетических методов. Протеолитическая активность оценивалась на казеине и желатине в качестве субстратов. Оптимальные условия для активности ферментов были определены как 70°C и pH 10,0 для *B. subtilis* A5.3 и 60°C и pH 9,0 для *B. licheniformis* T7. Исследование влияния ионов металлов, детергентов и ингибиторов на активность ферментов выявило значительные различия между двумя штаммами: *B. subtilis* A5.3 продемонстрировал более высокую чувствительность к ионам Mn^{2+} , Cd^{2+} и Mg^{2+} , тогда как *B. licheniformis* T7 показал большую устойчивость к этим металлам. Зимографический анализ подтвердил наличие нескольких активных протеаз в ферментных экстрактах обоих штаммов с молекулярными массами от 20 до 150 кДа. Наблюдаемая активность гидролиза желатина свидетельствует о наличии коллагеназоподобных протеаз, что подчеркивает промышленный потенциал этих штаммов в гидролизе коллагенсодержащих отходов. Полученные результаты подтверждают пригодность *B. subtilis* A5.3 и *B. licheniformis* T7 в качестве перспективных кандидатов для разработки устойчивых методов утилизации коллагенсодержащих отходов.

Ключевые слова: *Bacillus*, протеаза, коллагеназа, гидролиз, белок.

1 ВВЕДЕНИЕ

Мясная индустрия Казахстана играет ключевую роль в экономике, обеспечивая население разнообразными и качественными продуктами, такими как мясо, мясные изделия и молочная продукция. Развитие этой отрасли непосредственно влияет на доступность белка животного происхождения для населения. В контексте особенностей традиционных пищевых привычек жителей Казахстана производство и потребление мяса и мясных продуктов обладают особой значимостью.

Увеличение объемов производств мясной продукции приводят к увеличению количества отходов, в частности богатых белком (голова, кости, туши, кровь, кожа, внутренности и копыта). Согласно данным Бюро национальной статистики РК в 2022 году образовалось более 925 тыс. тонн отходов и вторичных продуктов мясной промышленности. Эти отходы содержат ценные белки и питательные вещества, которые можно переработать в продукты питания для людей и животных. Накопление такого количества трудноразлагаемых отходов без эффективной переработки приводит к экономическим потерям и экологическим проблемам [1]. Понимание структуры целевых белков имеет решающее значение для оптимального использования этих отходов [2, 3].

Коллаген относится структурным белкам и является одним из самых распространенных белков у млекопитающих. Выделяют 28 типов коллагена, из которых коллаген I типа наиболее распространен у животных [4, 5]

Переработка белка заключается в разрушении его пер-

вичной структуры до пептидов и аминокислот. Известны различные способы разрушения белков: физический, химический и биологический [6-8]. Экологичность, низкая энергозатратность и отсутствие токсичных побочных эффектов делают биологические методы модификации белков с использованием протеолитических ферментов перспективными для применения в различных отраслях промышленности [8-10].

Для гидролиза коллагена используют специфические протеазы, способные разрушить тройную спираль коллагена, известные как коллагенолитические ферменты или коллагеназы. Эти ферменты обладают уникальной способностью разрушать структурные связи в молекулах коллагена, что отличает их от других протеаз. Большинство известных коллагеназ принадлежат семейству металлопротеиназ (ЕС 3.4.24), которые требуют наличия металла, чаще всего цинка, для своей активности. Перспективными для промышленного применения представляются коллагеназы рыб [11-14], ракообразных [15, 16] и коллагеназы микроорганизмов. Благодаря короткому циклу роста, экономическим и техническим преимуществам, микроорганизмы являются отличным источником протеиназ и оптимальными кандидатами для производства промышленных коллагеназ [17-19]. Эти ферменты могут быть использованы не только в биотехнологических процессах переработки отходов сельского хозяйства, но и в медицине, например, для лечения ожогов, язв и косметологических процедур, таких как омоложение кожи. Известными коммерческими ферментами являются коллагеназы из *Clostridium histolyticum*, известные под торговыми мар-

ками QWO®, Santyl®, Xiapex®, Xiaflex® [20, 21].

Известно, что *Bacillus* являются перспективными продуцентами протеаз по ряду параметров: высокая продуктивность, активность секреторных протеаз в широком диапазоне pH, устойчивость ферментов к высоким температурам, органическим растворителям, детергентам [22-26]. Имеющиеся сообщения о бактериальных коллагеназах свидетельствуют, что эти ферменты могут быть более эффективными, чем клостридиальные [27, 28], активность даже неочищенного фермента может достигать 600 ед/мл [29, 30]. Протеазы с коллагеназной активностью из *Bacillus* spp. можно охарактеризовать как истинные коллагеназы, так как они способны расщеплять тройные спиральные участки внутри цепей нативного коллагена [27, 31, 32]. Описано, что коллагеназа из *B. cereus* ATCC 14579 ColA гидролизовала коллаген I типа до пептидов [31, 33], а коллагеназа из *B. cereus* MBL13 успешно гидролизует коллаген I, II, III типов и желатин [32]. Штамм *B. cereus* Soc 67 продуцирует коллагеназу, способную гидролизовать растворимый и нерастворимый коллаген, азоколлаген и желатин [34]. Большая часть описанных бактериальных коллагеназ относится к кальций-зависимым металлопротеазам: активность коллагеназ из *B. cereus* MBL13 и *B. pumilus* Col-J в присутствии Ca^{2+} возрастает на 30% [32, 35], а рекомбинантная коллагеназа ColR75E на 48% активнее при наличии Ca^{2+} [36]. Коллагеназы успешно поддаются выделению и концентрированию (до 20-30 раз) хроматографическими методами [32, 37]. Очищенная коллагеназа из *B. cereus* MBL13 обладала активностью 2443 ед/мг [32], из *B. cereus* 7615 ед/мг активности [29], а рекомбинантная коллагеназа, полученная в *B. subtilis* WB600, показала активность в 9405,54 ед/мг [38].

Среди бактериальных коллагеназ преобладают щелочные ферменты, с pH оптимумом для гидролиза 7,5-9,0 [29, 39, 40]. В диапазоне pH 5,0-11,0 бактериальные коллагеназы сохраняют до 50% активности [38, 40]. Однако, встречаются и кислые коллагеназы. Так, Kawahara с коллегами описали коллагеназу из *Bacillus alvei* DC-1 с максимумом активности при pH 4,0 [41]. Коллагеназы, продуцируемые *Bacillus*, преимущественно активны при 37-50°C [27, 40]. Мезофильность коллагеназ можно объяснить тем, что субстрат коллаген начинает разворачиваться (unfolding) при 37°C, и становится доступным для деградации ферментами [27]. Однако, и в этом случае есть исключение в виде термостабильной коллагеназы *Bacillus* sp. MO-1 с оптимумом при 60°C [37]. Молекулярная масса коллагеназ различается у разных видов, наименьшие массы отмечены у *B. subtilis* (21 кДа) и *B. licheniformis* (25 кДа) [28, 42]. Okamoto с соавторами сообщают о двухкомпонентной коллагеназе с общим размером 210 кДа из *Bacillus* sp. MO-1 [37].

Целью данного исследования является поиск штаммов с потенциальной коллагеназной активностью в казахстанских биоценозах, а также оценка их перспектив для промышленного применения в переработке коллагенсодержащих отходов мясной промышленности. Задачи исследования включают определение оптимальных условий для проявления активности этих штаммов, исследование влияния различных факторов на их эффективность.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Выделение бактериальных штаммов

Выделение штаммов, в перспективе обладающих протеолитической активностью, производили из образцов почвы, собранных на территории Республики Казахстан. Сбор образцов почв проводился на участках с высоким содержанием органических веществ (компостные кучи, сельскохозяйственные поля и т.д.), вдалеке от промышленных зон и автодорог. Образец получали путем отбора стерильной лопаткой и смешения почвы из 3-5 точек на одной площади (1 м²) с глубины 5-10 см. Почвенные навески по 1 г суспендировали в 9 мл стерильного 0,9% (w/v) NaCl. 100 мкл полученной суспензии высевали на питательный агар. Посевы инкубировали при 37 °C в течение 18 часов до получения единичных колоний.

2.2 Идентификация штаммов

Выросшие на питательном агаре изолированные колонии были проверены на однородность визуальным и микроскопическим способами. Полученные чистые культуры клеток были исследованы с помощью окрашивания по Граму. Морфологические характеристики каждого изолята были сопоставлены с данными из Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Идентификация проводилась также с помощью масс-спектрометрического протеомного анализа с MALDI Biotyper и секвенирования фрагмента гена 16S рРНК.

2.3 Скрининг штаммов с протеолитической активностью

Скрининг изолятов на протеолитическую активность проводили с использованием молочного (1% сухого обезжиренного молока, 0,1% NaCl, 1% триптона и 1% агара) и желатинового (3% желатина, 1% пептона, 1% NaCl и 1,5% агар) агаров. Эти среды были выбраны, поскольку молоко и желатин могут быть гидролизованы бактериальными ферментами, что позволяет выявить протеолитическую активность и способность к гидролизу коллагена. Инкубацию проводили при 37°C в аэробных условиях в течение 24 часов, а активность оценивали по зонам просветления вокруг колоний, свидетельствующим о гидролизе субстратов. Для желатинового агара зоны гидролиза фиксировали после добавления трихлоруксусной кислоты по изменению прозрачности в течение первых 4 минут.

2.4 Приготовление энзиматических экстрактов

Одиночную колонию инокулировали в 10 мл минимальной среды и выращивали при 37°C, 170 об/мин в течение 72 часов. Стерилизовали супернатант путем фильтрования через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Экстракт концентрировали в 50 раз в концентрате белков Pierce TM, 10K MWCO (отсечение молекулярной массы 10 кДа; Thermo Fisher, США), центрифугируя при +4°C и 6000×g, до достижения желаемого концентрирования.

2.5 Определение протеолитической активности ферментов

Протеолитическую активность определяли, используя в качестве субстрата казеин, по методу Kunitz [43]. В качестве субстрата использовался 1% раствор казеина в 100 мМ глицинового буфера (pH 10,0). Реакционная смесь со-

стояла из 0,5 мл казеинового субстрата и 0,5 мл ферментативного экстракта. Инкубация проводилась на водяной бане при 70°C в течение 15 минут. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 20% ТХУ. В качестве бланка выступал образец с добавлением ТХУ до начала инкубации. Стандартная кривая была построена с помощью 0-100 мг/л раствора тирозина. Одна единица протеолитической активности определялась как количество ферментативного экстракта, необходимое для высвобождения 1 мкг тирозина в минуту в условиях эксперимента.

2.6 Зимографический анализ

Зимографический анализ проводили электрофорезом экстракта секреторного белка в 4-20% ПААГ, сополимеризованном с 0,1% желатином, в денатурирующих условиях. Ферментативный экстракт смешивали с загрузочным буфером (125 мМ Tris-HCl pH 6,8, 4% ДСН, 0,002% бромфенола и 20% глицерина) в соотношении образец:буфер 4:6. К образцу добавляли фенилметилсульфонил фторид (ФМСФ) (5 мМ), ЭДТА (5 мМ) или пепстатин А (0,035 мМ). ДСН удаляли из геля путем промывки в 10% Тритон X-100 в течение 15 мин дважды. Для деградации кератина протеазами гель инкубировали в 500 мМ Tris-HCl (pH 7,4) в течение 20 часов при 50°C. Гель окрашивали в коллоидном растворе 0,08% Coomassie Brilliant Blue G-250 (20% этанола, 1,6% фосфорной кислоты, 8% сульфата аммония), в течение 4 часов. Гель открашивали в дистиллированной воде. Белковые маркеры (New England Biolabs #P7719S) использовались для определения молекулярной массы.

2.7 Определение pH- и температурного оптимумов действия ферментов

Определение влияния температуры на ферментативную активность проводилось путем проведения реакции в диапазоне температур 30-80°C (с интервалом 10°C) в стандартных условиях. Максимальная ферментативная активность была принята за 100%. Для исследования термостабильности раствор фермента предварительно инкубировали в течение 3 часов при 60 °C и 70 °C в оптимальном буфере, затем измеряли остаточную активность. Ферментативную активность измеряли в диапазоне pH от 3,0 до 11,0 в стандартных условиях. Были использованы следующие буферные системы: цитратный буфер (pH 3,0-6,0), фосфатный буфер натрия (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 7,5-9,0) и глицин-NaOH (pH 9,0-11,0). Полученные значения пересчитывали в относительные единицы, принимая за 100% максимальное значение.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Выделение и идентификация штаммов с протеолитической активностью

Из образцов почв на питательном агаре были выделены бактериальные изоляты, из которых 2 штамма, получившие обозначение А5.3 и Т7, показали максимальную протеолитическую активность на молочном и желатиновом агарах (рисунок 1).

На питательном агаре после 16 часов инкубирования изоляты образовали бежевые непрозрачные колонии диаметром 2-4 мм с фестончатыми краями. Колонии выпуклые или изогнутые, поверхность гладкая или

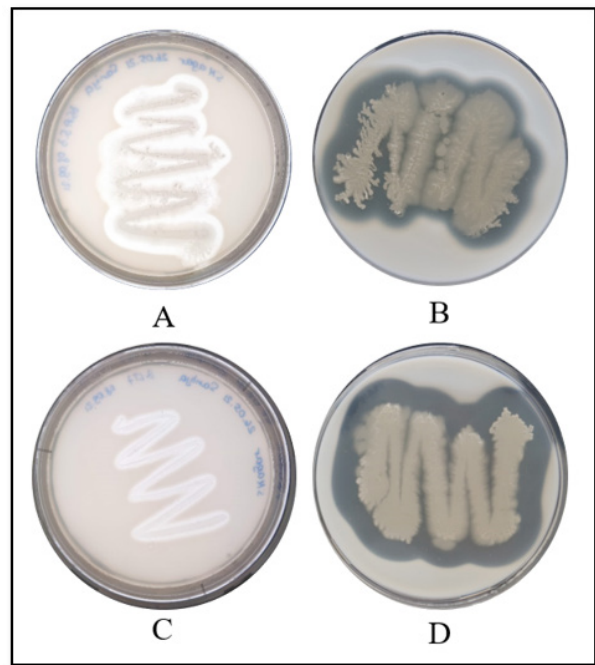


Рисунок 1 –Изоляты на молочном агаре: А5.3 (А), Т7 (С); на желатиновом агаре: А5.3 (А), Т7 (С).

складчатая, матовая, консистенция вязкая, волокнистая. Микроскопия колоний показала, что клетки изолятов грамположительные, овальные и подвижные (Рисунок 2).

При посевах в ЛБ бульоне все изоляты показывали умеренный равномерный рост, среда мутнеет и приобретает характерный запах. Цвет среды изменился на молочно-бежевый. На основании культурально-морфологических признаков оба изолята были предварительно идентифицированы как штаммы, принадлежащие роду *Bacillus*. С целью дополнительного изучения была проведена работа по идентификации выделенных протеолитических штаммов на основании анализа протеомного профиля рибосомальных белков на приборе Biotyper Microflex LT.

Изоляты были идентифицированы молекулярно-генетическими методами. Для секвенирования фрагмента 16S рРНК. По сличению нуклеотидной последовательности фрагмента 16S рРНКс данными GenBank идентифицировали штаммы как *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*.

3.2 Изучение протеолитической активности

Для исследований протеолитической активности путем сбора и фильтрации надосадочной жидкости после культивирования *Bacillus subtilis* А.5.3 и *Bacil-*

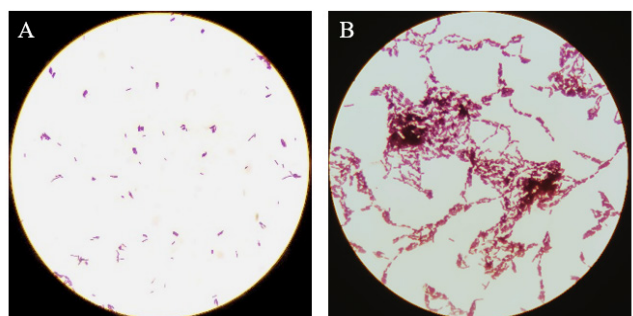


Рисунок 2 – Микроскопия изолятов А5.3 (А), Т7 (В).

lus licheniformis T7 на минимальной перьевой среде был приготовлен энзиматический экстракт.

Проведено изучение зависимости протеолитической активности энзиматических экстрактов штаммов *Bacillus subtilis* A.5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 от температуры в диапазоне 40-80°C. В ходе изучения установлено, что энзиматический экстракт *Bacillus subtilis* A5.3 имеет максимальную активность при 70°C, а штамм *Bacillus licheniformis* T7 при 60°C (Рисунок 3).

Вероятно, различия в температурных оптимумах свя-

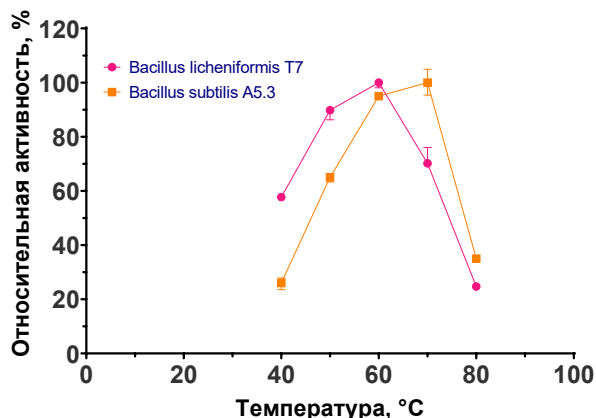


Рисунок 3 – Зависимость протеолитической активности энзиматических экстрактов штаммов *Bacillus subtilis* A.5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 от температуры.

заны с различиями в структурной стабильности ферментов: ферменты *Bacillus subtilis* могут обладать более термостабильными доменами или дополнительными стабилизирующими факторами, такими как ионные связи или гидрофобные взаимодействия, способствующими их функционированию при более высоких температурах.

Изучение зависимости протеолитической активности энзиматических экстрактов штаммов *Bacillus subtilis* A.5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 от значения pH в диапазоне 4,0-11,0 показало, что энзиматический экстракт штамма имеет оптимум pH 10,5 и 8,5 для казеинолитической и кератинолитической активности, соответственно (Рисунок 4).

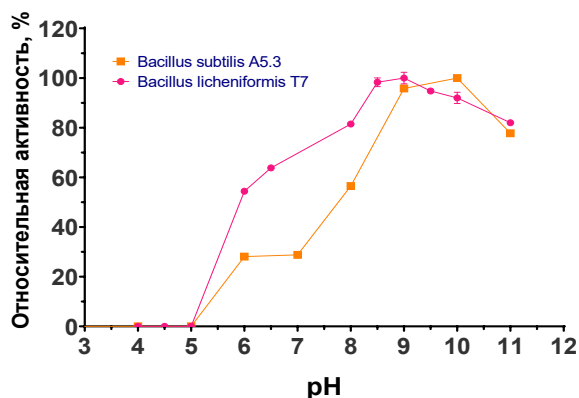


Рисунок 4 – Зависимость протеолитической активности энзиматических экстрактов штаммов *Bacillus subtilis* A.5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 от значения pH.

Различия в pH-оптимумах могут быть объяснены различной аминокислотной последовательностью

ферментов, влияющей на заряд активного центра, а также возможным наличием стабилизирующих молекул, таких как ионы металлов или кофакторы.

Оба энзиматических экстракта показали более 60% активности в диапазоне pH 8,5-11,0. Максимальное значение активности экстракта *Bacillus subtilis* A.5.3 достигнуто при pH 9,0, а для *Bacillus licheniformis* T7 – 10,0.

Измерение активности энзиматических экстрактов из *Bacillus subtilis* A5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 в оптимальных условиях составила $242,16 \pm 2,5$ ЕД/мл и $207,2 \pm 4,8$ ЕД/мл, соответственно.

3.3 Влияние химических агентов на активность экстрактов

В таблице 1 представлены данные об остаточной активности двух ферментов (BS A5.3 и BLT7) под воздействием различных химических веществ, включая ионы металлов, детергенты, восстановители и ингибиторы протеаз. Контрольная активность для обоих ферментов принята за 100%, что позволяет оценить степень активации или ингибирования в процентах.

Для BS A5.3 наибольшее ингибиторное воздействие оказывают ионы Mn^{2+} (35,3%), Cd^{2+} (49,0%) и Mg^{2+} (49,6%), что указывает на высокую чувствительность фермента к этим катионам. Также значительное снижение активности наблюдается под действием ФМСФ (30,9%), что свидетельствует о сериновой природе данного фермента. При этом пепстатин А (100,0%) и ЭДТА (79,1%) практически не влияют на активность, что исключает возможность его классификации как аспартиловой или металлозависимой протеазы. Интересно, что Тритон Х-100 и ДСН практически не снижают активность фермента, сохраняя её на уровне 90-98%, что говорит о его устойчивости к поверхностно-активным веществам.

BLT7 демонстрирует иную реакцию на химические вещества. Наибольшее ингибирование активности наблюдается под действием ФМСФ (11,76%) и ДСН (24,54%), что также подтверждает возможную сериновую природу фермента. Однако чувствительность BLT7 к ионам металлов варьирует: ионы Fe^{3+} (23,21%) и Cd^{2+} (50,62%) значительно снижают активность, в то время как K^+ (100,64%), Na^+ (102,23%) и β -меркаптоэтанол (102,69%) способствуют её увеличению, что может указывать на возможное структурное изменение активного центра фермента или участие тиоловых групп. Пепстатин А (90,58%) слабо ингибирует активность BLT7, что также исключает его принадлежность к классу аспартиловых протеаз.

В целом, полученные данные подчеркивают различия в устойчивости ферментов BS A5.3 и BLT7 к действию ионов металлов, детергентов и ингибиторов. Эти различия могут быть обусловлены особенностями их активных центров и аминокислотного состава.

3.4 Зимографический анализ

Зимографический анализ на желатине был проведен для энзиматических экстрактов штаммов *Bacillus subtilis* A5.3 и *Bacillus licheniformis* T7. Оба экстракта продемонстрировали способность гидролизовать желатин (Рисунок 5).

Таблица 1 – Влияние ионов металлов, ионных и неионных детергентов, ингибиторов протеаз на активность протеолитических ферментов штаммов *Bacillus subtilis* A.5.3 и *Bacillus licheniformis* T7.

Химические вещества	Концентрация	Остаточная активность, %	
		BS A5.3	BLT7
Контроль	-	100 ± 3,3	100 ± 3,3
K+	5 мМ	57,2 ± 6,0	100,64 ± 0,07
Na+	5 мМ	82,3 ± 3,6	102,23 ± 0,69
Ni2+	5 мМ	60,8 ± 2,1	81,77 ± 1,12
Mg2+	5 мМ	49,6 ± 2,7	100,23 ± 1,32
Ca2+	5 мМ	71,1 ± 6,4	92,82 ± 0,035
Cd2+	5 мМ	49,0 ± 2,9	50,62 ± 1,87
Mn2+	5 мМ	35,3 ± 3,3	98,13 ± 2,88
Cu2+	5 мМ	81,1 ± 3,8	76,96 ± 1,55
Fe3+	5 мМ	68,1 ± 1,0	23,21 ± 0,5
Твин 20	1%, об/об	57,7 ± 6,7	87,67 ± 5,04
Тритон X-100	1%, об/об	98,1 ± 7,7	79,38 ± 4,26
ДСН	1%, м/об	90,2 ± 5,6	24,54 ± 3,67
β-меркаптоэтанол	5 мМ	57,7 ± 6,7	102,69 ± 3,92
Дитиотреитол	5 мМ	52,5 ± 2,1	81,3 ± 2,56
ЭДТА	5 мМ	79,1 ± 5,3	39,79 ± 0,61
ФМФС	5 мМ	30,9 ± 3,2	11,76 ± 3,28
Пепстатин А	35 мкМ	100,0 ± 2,9	90,58 ± 3,69

В экстракте *B. subtilis* A5.3 были обнаружено 5 активных ферментов с молекулярной массой 22, 28, 34, 95 и 150 кДа. Ингибирование их активности под действием ФМФС указывает на принадлежность этих ферментов к классу сериновых протеаз. Наличие как сериновых, так и металлопротеаз указывает на сложный состав ферментативного экстракта и возможность участия нескольких классов ферментов в гидролизе желатина.

Экстракт *B. licheniformis* T7 также продемонстрировал активность по отношению к желатину. Зимограмма выявила 6 ферментов с молекулярной массой 20, 26, 32,

40, 45 и 68 кДа, которые активно гидролизуют желатин. Подобно экстракту *B. subtilis* A5.3, активность этих ферментов была подавлена ФМФС, что подтверждает их принадлежность к классу сериновых протеаз. Ингибирование активности части ферментов ЭДТА указывает на металлозависимую природу некоторых из них, что также свидетельствует о присутствии металлопротеаз в экстракте.

Следует подчеркнуть, что желатин представляет собой денатурированную форму коллагена, которая сохраняет основные пептидные связи коллагена, но теряет его тройную спиральную структуру. Способность протеаз гидролизовать желатин часто используется как косвенный индикатор коллагеназной активности. Поскольку ферменты *B. subtilis* A5.3 и *B. licheniformis* T7 активно гидролизуют желатин, это может свидетельствовать о наличии у них ферментов с коллагеназной активностью.

4 ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение протеолитических ферментов *Bacillus subtilis* A5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 показало, что оба штамма обладают протеолитической активностью. У *B. subtilis* A5.3 оптимальная активность для протеолитических ферментов наблюдается при pH 10,0 и температуре 70°C. В то же время, для *B. licheniformis* T7 оптимальный pH составляет 9,0 при температуре 60°C. Эти результаты согласуются с ранее описанными данными для других бактерий, таких как *Bacillus* sp strain SMIA-2 и *B. subtilis* DR8806, у которых оптимальные температурные условия для протеолитической активности также находятся в пределах 40-60°C [44, 45].

Особенностью *B. licheniformis* T7 является высокая

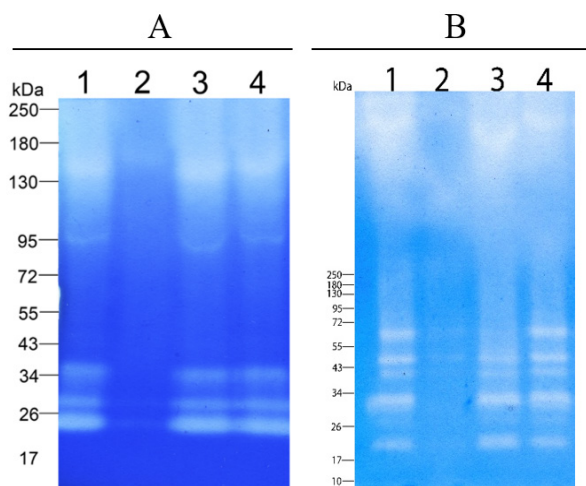


Рисунок 5 – Зимограммы с сополимеризованным желатином для ферментных экстрактов *B. subtilis* A5.3 (А) и *B. licheniformis* T7 (В). Ферментный экстракт (полоса 1), ферментный экстракт с ФМФС (полоса 2), ферментный экстракт с ЭДТА (полоса 3) и ферментный экстракт с пепстатином А (полоса 4).

устойчивость к ионам металлов. В то же время ферменты *B. subtilis* A5.3 гораздо менее толерантны к присутствию ионов металлов. В данном случае все исследованные ионы металлов (включая Cu^{2+}) оказывают ингибирующее действие на активность ферментов. Это напоминает поведение металлопротеаз, таких как те, что были описаны для *Bacillus subtilis* PE-11 и *Beauveria* sp, МТСС 5184, где ионы, как Cd^{2+} , также ингибируют активность ферментов [46, 47].

Протеазы из *B. licheniformis* T7 также показали чувствительность к ФМСФ и менее выраженное влияние ЭДТА, что подтверждает их принадлежность к классу сериновых протеаз и металлопротеаз. Подобные результаты были получены для ферментов из других штаммов *Bacillus*, таких как *B. subtilis* KD-N2 и *B. halodurans* PPKS-2, где ФМСФ и ЭДТА также оказались сильными ингибиторами [48-50].

Зимографический анализ показал, что энзиматические экстракты штаммов *Bacillus subtilis* A5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 обладают активностью в гидролизе желатина, что подтверждает их потенциал для коллагеназной активности. Оба экстракта продемонстрировали наличие ферментов с молекулярной массой, варьирующейся от 20 до 150 кДа, активность которых была подавлена под действием PMSF, что указывает на присутствие сериновых протеаз. Ранее, было отмечено, что протеолитическая активность энзиматического экстракта *B. subtilis* A5.3 и других представителей *Bacillus* сильно ингибировалась ФМСФ [48-53], а отрицательное влияние ЭДТА на активность протеолитических ферментов также было зарегистрировано для протеаз из *B. halodurans* PPKS-2 [49] *Bacillus spp.* MKR5 Younes [54] и *Chryseobacterium spp. kr6* [55].

Таким образом, оба штамма, *B. subtilis* A5.3 и *B. licheniformis* T7, являются перспективными кандидатами для использования в биотехнологических процессах, связанных с гидролизом коллагенсодержащих материалов, таких как желатин. Понимание механизмов регуляции их активности, включая влияние ионов металлов и химических агентов, может способствовать улучшению их применения в промышленности и медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о высокой активности протеолитических ферментов из штаммов *Bacillus subtilis* A5.3 и *Bacillus licheniformis* T7 в гидролизе желатина, что подтверждает их потенциал для применения в биотехнологических процессах, направленных на переработку коллагенсодержащих отходов сельского хозяйства. Исследования показали оптимальные условия для их активности и выявили чувствительность ферментов к различным ионам металлов и химическим агентам, что указывает на присутствие как сериновых, так и металлопротеаз. Эти результаты подчеркивают перспективность данных штаммов для дальнейших исследований и промышленного использования, в том числе для разработки эффективных методов переработки отходов сельского хозяйства и получения ценных продуктов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Эти исследования были профинансированы Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант No AP19678954).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Szucs, M., Angulo, M., Costa, C., Márquez, M.C. Meat waste valorization through protein hydrolysis using different types of proteases // *Recent Progress in Materials*. – 2021. – Vol. 03(04). – P. 045. <https://doi.org/10.21926/rpm.2104045>.
2. Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T., Kida, K. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste // *Process Biochemistry*. – 2002. – Vol. 37(12). – P. 1403-12. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00024-9).
3. Aspevik, T., Oterhals, Å., Rønning, S.B., Altintzoglou, T., Wubshet, S.G., Gildberg, A., et al. Valorization of Proteins from Co- and By-Products from the Fish and Meat Industry. In: Lin CSK, editor. *Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization*. Cham: Springer International Publishing. – 2018. – P. 123-50.
4. Ricard-Blum, S. The collagen family // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2011. – Vol. 3(1). – P. a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
5. Pardo, A., Selman, M. MMP-1: the elder of the family // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2005. – Vol. 37(2). – P. 283-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijb.2004.06.017>.
6. Cavello, I.A., Cavalitto, S.F., Hours, R.A. Biodegradation of a Keratin Waste and the Concomitant Production of Detergent Stable Serine Proteases from *Paecilomyces lilacinus* // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2012. – Vol. 167(5). – P. 945-58. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9650-7>.
7. Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., Wu, G. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection // *Journal of Chromatography B*. – 2014. – Vol. 964. – P. 116-27. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025>.
8. Tavano, O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B // Enzymatic*. – 2013. – Vol. 90. – P. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>.
9. Brandelli, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond // *Food and Bioprocess Technology*. – 2008. – Vol. 1(2). – P. 105-16. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0025-y>.
10. Paul, T., Jana, A., Das, A., Mandal, A., Halder, S.K., Das Mohapatra, P.K., et al. Smart cleaning-in-place process through crude keratinase: an eco-friendly cleaning techniques towards dairy industries // *Journal of Cleaner Production*. –

2014. – Vol. 76. – P. 140-53. <https://doi.org/10.1016/j.jcicle-pro.2014.04.028>.

11. Bracho, G.E., Haard, N.F. Identification of two matrix metalloproteinase in the skeletal muscle of pacific rockfish (*Sebastes* sp.) // *Journal of Food Biochemistry*. – 1995. – Vol. 19(4). – P. 299-319. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1995.tb00536.x>.

12. Kristjánsson, M.M., Gudmundsdóttir, S., Fox, J.W., Bjarnason, J.B. Characterization of a collagenolytic serine proteinase from the Atlantic cod (*gadus morhua*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B // *Biochemistry and Molecular Biology*. – 1995. – Vol. 110(4). – P. 707-17. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)00207-B](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)00207-B).

13. Kolodziejska I., Sikorski Z.E. Neutral and alkaline muscle proteinases of marine fish and invertebrates a review // *Journal of Food Biochemistry*. – 1996. – Vol. 20(3). – P. 349-64. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1996.tb00561.x>.

14. Oliveira, Vd.M., da Cunha, M., Assis, C., Nascimento, T., Herculano, P., Cavalcanti, M., et al. Fish collagenases and its industrial applications // *Pubvet*. – 2017. – Vol. 11(3). – P. 243-55. <https://doi.org/10.22256/PUBVET.V11N3.243-255>.

15. Eizen, A.Z., Jeffrey, J.J. An extractable collagenase from crustacean hepatopancreas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) // Enzymology*. – 1969. – Vol. 191(3). – P. 517-26. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90345-3](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90345-3).

16. Homaei, A., Lavajoo, F., Sariri, R. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Vol. 88. – P. 542-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.023>.

17. Feng, L., Qiao, Y., Zou, Y., Huang, M., Kang, Z., Zhou, G. Effect of Flavourzyme on proteolysis, antioxidant capacity and sensory attributes of Chinese sausage // *Meat Science*. – 2014. – Vol. 98(1). – P. 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.04.001>.

18. Yang, H., Qu, J., Zou, W., Shen, W., Chen, X. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis* // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2021. – Vol. 105(18). – P. 6607-26. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11533-2>.

19. Lajis, A.F.B. Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from *Bacillaceae* family // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2020. – Vol. 7(1). – P. 1-26. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-0295-z>.

20. Arora, G., Patil, A., Hooshanginezhad, Z., Fritz, K., Salavastru, C., Kassir, M., et al. Cellulite: Presentation and management // *Journal of Cosmetic Dermatology*. – 2022. – Vol. 21(4). – P. 1393-401. <https://doi.org/10.1111/jocd.14815>.

21. Costas, B., Coleman, S., Kaufman, G., James, R., Cohen, B., Gaston, R.G. Efficacy and safety of collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren disease nodules: a randomized controlled trial // *BMC Musculoskeletal Disorders*. – 2017. – Vol. 18(1). – P. 374. <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1713-z>.

22. Gemechu, G., Masi, C., Tafesse, M., Kebede, G. A review on the bacterial alkaline proteases // *J. Xidian Univ.* – 2020. – Vol. 14(11). – P. 264-274. <https://doi.org/10.37896/jxu14.11/022>.

23. Gimenes, N.C., Silveira, E., Tambourgi, E.B. An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications // *Separation & Purification Reviews*. – 2021. – Vol. 50(3). – P. 223-243. <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1677249>.

24. Contesini, F.J., Melo, R.R., Sato, H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // *Critical reviews in biotechnology*. – 2018. – Vol. 38(3). – P. 321-334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>.

25. Danilova, I., Sharipova, M. The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production // *Frontiers in microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1782. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>.

26. Cai, D., Rao, Y., Zhan, Y., Wang, Q., Chen, S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect // *Journal of Applied Microbiology*. – 2019. – Vol. 126(6). – P. 1632-42. <https://doi.org/10.1111/jam.14192>.

27. Hoppe, I.J., Brandstetter, H., Schönauer, E. Biochemical characterisation of a collagenase from *Bacillus cereus* strain Q1 // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11(1). – P. 4187. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83744-6>.

28. Samritphol, W., Sumpavapol, P., Tangwatharin, P., Sorapukdee, S. Hydrolytic properties of crude protease from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* M13 // *J. Agric. Sci. Technol*. – 2019. – Vol. 5(6). – P. 1011-20.

29. Wang, Y., Li, X., Zhang, Z., Ding, S., Jiang, H., Li, J., et al. Simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles, and chloramphenicol components in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 192. – P. 280-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.033>.

30. Savita, K., Arachana, P. Production of collagenase by *Bacillus* KM369985 isolated from leather sample // *Int. J. Res. Biosciences*. – 2015. – Vol. 4(4). – P. 81-87.

31. Abfalter, C.M., Schönauer, E., Ponnuraj, K., Huemer, M., Gadermaier, G., Regl, C., et al. Cloning, purification and characterization of the collagenase *cola* expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579 // *Plos One*. – 2016. – Vol. 11(9). – P. e0162433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162433>.

32. Liu, L., Ma, M., Cai, Z., Yang, X., Wang, W. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by *Bacillus cereus* MBL13 strain // *Food Technol Biotechnol*. – 2010. – Vol. 48(2). – P. 151.

33. Song, Y., Fu, Y., Huang, S., Liao, L., Wu, Q., Wang, Y., et al. Identification and antioxidant activity of bovine bone collagen-derived novel peptides prepared by recombinant collagenase from *Bacillus cereus* // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 349. – P. 129143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129143>.

34. Makinen, K.K., Makinen, P.L. Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus* (strain Soc 67) // *J. Biol. Chem*. – 1987. – Vol. 262(26). – P. 12488-95. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45232-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45232-5).

35. Wu, Q., Li, C., Li, C., Chen, H., Shuliang, L. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J // *Appl. Biochem. Biotechnol*. – 2009.

- Vol. 160(1). – P. 129. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8673-1>.
36. Zhang, X.-X., Li, Y., Wang, S.-Y., Wang, Y.-Y., Du, K.-L., Xu, J.-Y., Lei, L.-S., Feng, X., Liang, X.-Y., Ruan, H.-H. Expression, purification and enzymatic characterization of ColR75E collagenase of *Bacillus cereus* R75E // Chin. Biotechnol. – 2015. – Vol. 35(10). – P. 44-52. <https://doi.org/10.13523/j.cb.20151007>.
37. Okamoto, M., Yonejima, Y., Tsujimoto, Y., Suzuki, Y., Watanabe, K. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – Vol. 57(1). – P. 103-8. <https://doi.org/10.1007/s002530100731>.
38. Zhu, Y., Wang, L., Zheng, K., Liu, P., Li, W., Lin, J., et al. Optimized recombinant expression and characterization of collagenase in *Bacillus subtilis* WB600 // Fermentation. – 2022. – Vol. 8(9). – P. 449. <https://doi.org/10.3390/fermentation8090449>.
39. Pequeno, A.C.L., Arruda, A.A., Silva, D.F., Duarte Neto, J.M.W., Silveira Filho, V.M., Converti, A., et al. Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain // Preparative Biochemistry & Biotechnology. – 2019. – Vol. 49(5). – P. 501-9. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1587627>.
40. Nagano, H., To, K.A. Purification of Collagenase and Specificity of Its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – Vol. 64(1). – P. 181-3. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.181>.
41. Kawahara, H., Kusumoto, M., Obata, H. Isolation and characterization of a new-type of collagenase producing bacterium, *Bacillus-alvei* DC-1 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1993. – Vol. 57(8). – P. 1372-3. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1372>.
42. Asdornnithee, S., Akiyama, K., Sasaki, T., Takata, R. Isolation and characterization of a collagenolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* N22 // J. Ferment. Bioeng. – 1994. – Vol. 78(4). – P. 283-7. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90358-1).
43. Kembhavi, A.A., Kulkarni, A., Pant, A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM no. 64 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1993. – Vol. 38(1-2). – P. 83-92. <https://doi.org/10.1007/bf02916414>.
44. Silva, C.Rd., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp and some properties of the enzymatic activity // Brazilian Journal of Microbiology. – 2007. – Vol. 38. – P. 253-8. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012>.
45. Farhadian, S., Asoodeh, A., Lagzian, M. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806 // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2015. – Vol. 115. – P. 51-8. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.02.001>.
46. Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11 // AAPS PharmSciTech. – 2003. – Vol. 4(4). – P. E56. <https://doi.org/10.1208/pt040456>.
47. Sundarrajan, S., Parambath, S., Suresh, S., Rao, S., Padmanabhan, S. Novel properties of recombinant Sso7d-Taq DNA polymerase purified using aqueous two-phase extraction: Utilities of the enzyme in viral diagnosis // Biotechnol. Rep. (Amst). – 2018. – Vol. 19. – P. e00270. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00270>.
48. Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K.K., Kaur, S., et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential // Crit. Rev. Biotechnol. – 2017. – Vol. 37(4). – P. 476-91. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1185388>.
49. Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 87(2). – P. 625-33. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2499-1>.
50. Tiwary, E., Gupta, R. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101(15). – P. 6103-10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.090>.
51. Mazotto, A.M., de Melo, A.C., Macrae, A., Rosado, A.S., Peixoto, R., Cedrola, S.M., et al. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 27(6). – P. 1355-65. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0586-1>.
52. Kumar, A.G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N., Sekaran, G. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus* // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 104(2). – P. 411-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03564.x>.
53. Suh, H.J., Lee, H.K. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1 // J. Protein Chem. – 2001. – Vol. 20(2). – P. 165-9. <https://doi.org/10.1023/a:1011075707553>.
54. Younes, G., Shahbazi, M., Rasoul-Amini, S., Kargar, M., Safari, A., Kazemi, A., et al. Identification and characterization of feather-degrading bacteria from keratin-rich wastes // Ann. Microbiol. – 2012. – Vol. 62. – P. 737-744. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0313-7>.
55. Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., Brandelli, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin // Arch. Microbiol. – 2003. – Vol. 179(4). – P. 258-65. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0525-8>.

REFERENCES

1. Szucs, M., Angulo, M., Costa, C., Márquez, M.C. Meat waste valorization through protein hydrolysis using different types of proteases // Recent Progress in Materials. – 2021. – Vol. 03(04). – P. 045. <https://doi.org/10.21926/rpm.2104045>.
2. Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T., Kida, K. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste // Process Biochemistry. – 2002. – Vol. 37(12). – P. 1403-12. [https://doi.org/10.1016/S0959-6526\(02\)00000-0](https://doi.org/10.1016/S0959-6526(02)00000-0).

[org/10.1016/S0032-9592\(02\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00024-9).

3. Aspevik, T., Oterhals, Å., Rønning, S.B., Altintzoglou, T., Wubshet, S.G., Gildberg, A., et al. Valorization of Proteins from Co- and By-Products from the Fish and Meat Industry. In: Lin CSK, editor. Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization. Cham: Springer International Publishing. – 2018. – P. 123-50.

4. Ricard-Blum, S. The collagen family // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2011. – Vol. 3(1). – P. a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.

5. Pardo, A., Selman, M. MMP-1: the elder of the family // The international journal of biochemistry & cell biology. – 2005. – Vol. 37(2). – P. 283-8. <https://doi.org/10.1016/j.bio-2004.06.017>.

6. Cavello, I.A., Cavalitto, S.F., Hours, R.A. Biodegradation of a Keratin Waste and the Concomitant Production of Detergent Stable Serine Proteases from *Paecilomyces lilacinus* // Applied biochemistry and biotechnology. – 2012. – Vol. 167(5). – P. 945-58. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9650-7>.

7. Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., Wu, G. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection // Journal of Chromatography B. – 2014. – Vol. 964. – P. 116-27. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025>.

8. Tavano, O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B // Enzymatic. – 2013. – Vol. 90. – P. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>.

9. Brandelli, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond // Food and Bioprocess Technology. – 2008. – Vol. 1(2). – P. 105-16. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0025-y>.

10. Paul, T., Jana, A., Das, A., Mandal, A., Halder, S.K., Das Mohapatra, P.K., et al. Smart cleaning-in-place process through crude keratinase: an eco-friendly cleaning techniques towards dairy industries // Journal of Cleaner Production. – 2014. – Vol. 76. – P. 140-53. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.04.028>.

11. Bracho, G.E., Haard, N.F. Identification of two matrix metalloproteinase in the skeletal muscle of pacific rockfish (*Sebastes* sp.) // Journal of Food Biochemistry. – 1995. – Vol. 19(4). – P. 299-319. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1995.tb00536.x>.

12. Kristjánsson, M.M., Gudmundsdóttir, S., Fox, J.W., Bjarnason, J.B. Characterization of a collagenolytic serine proteinase from the Atlantic cod (*gadus morhua*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B // Biochemistry and Molecular Biology. – 1995. – Vol. 110(4). – P. 707-17. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)00207-B](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)00207-B).

13. Kolodziejaska I., Sikorski Z.E. Neutral and alkaline muscle proteinases of marine fish and invertebrates a review // Journal of Food Biochemistry. – 1996. – Vol. 20(3). – P. 349-64. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1996.tb00561.x>.

14. Oliveira, Vd.M., da Cunha, M., Assis, C., Nascimento, T., Herculano, P., Cavalcanti, M., et al. Fish collagenases and its industrial applications // Pubvet. – 2017. – Vol. 11(3). – P.

243-55. <https://doi.org/10.22256/PUBVET.V11N3.243-255>.

15. Eizen, A.Z., Jeffrey, J.J. An extractable collagenase from crustacean hepatopancreas. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) // Enzymology. – 1969. – Vol. 191(3). – P. 517-26. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90345-3](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90345-3).

16. Homaei, A., Lavajoo, F., Sariri, R. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – Vol. 88. – P. 542-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.023>.

17. Feng, L., Qiao, Y., Zou, Y., Huang, M., Kang, Z., Zhou, G. Effect of Flavourzyme on proteolysis, antioxidant capacity and sensory attributes of Chinese sausage // Meat Science. – 2014. – Vol. 98(1). – P. 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.04.001>.

18. Yang, H., Qu, J., Zou, W., Shen, W., Chen, X. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis* // Appl Microbiol Biotechnol. – 2021. – Vol. 105(18). – P. 6607-26. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11533-2>.

19. Lajis, A.F.B. Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from *Bacillaceae* family // Bioresources and Bioprocessing. – 2020. – Vol. 7(1). – P. 1-26. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-0295-z>.

20. Arora, G., Patil, A., Hooshanginezhad, Z., Fritz, K., Salavastru, C., Kassir, M., et al. Cellulite: Presentation and management // Journal of Cosmetic Dermatology. – 2022. – Vol. 21(4). – P. 1393-401. <https://doi.org/10.1111/jocd.14815>.

21. Costas, B., Coleman, S., Kaufman, G., James, R., Cohen, B., Gaston, R.G. Efficacy and safety of collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren disease nodules: a randomized controlled trial // BMC Musculoskeletal Disorders. – 2017. – Vol. 18(1). – P. 374. <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1713-z>.

22. Gemechu, G., Masi, C., Tafesse, M., Kebede, G. A review on the bacterial alkaline proteases // J. Xidian Univ. – 2020. – Vol. 14(11). – P. 264-274. <https://doi.org/10.37896/jxu14.11/022>.

23. Gimenes, N.C., Silveira, E., Tambourgi, E.B. An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications // Separation & Purification Reviews. – 2021. – Vol. 50(3). – P. 223-243. <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1677249>.

24. Contesini, F.J., Melo, R.R., Sato, H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // Critical reviews in biotechnology. – 2018. – Vol. 38(3). – P. 321-334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>.

25. Danilova, I., Sharipova, M. The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production // Frontiers in microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 1782. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>.

26. Cai, D., Rao, Y., Zhan, Y., Wang, Q., Chen, S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – Vol. 126(6). – P. 1632-42. <https://doi.org/10.1111/jam.14192>.

27. Hoppe, I.J., Brandstetter, H., Schönauer, E. Biochemical characterisation of a collagenase from *Bacillus cereus*

- strain Q1 // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11(1). – P. 4187. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83744-6>.
28. Samritphol, W., Sumpavapol, P., Tangwatharin, P., Sorapukdee, S. Hydrolytic properties of crude protease from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* M13 // J. Agric. Sci. Technol. – 2019. – Vol. 5(6). – P. 1011-20.
29. Wang, Y., Li, X., Zhang, Z., Ding, S., Jiang, H., Li, J., et al. Simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles, and chloramphenicol components in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // Food Chemistry. – 2016. – Vol. 192. – P. 280-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.033>.
30. Savita, K., Arachana, P. Production of collagenase by *Bacillus* KM369985 isolated from leather sample // Int. J. Res. Biosciences. – 2015. – Vol. 4(4). – P. 81-87.
31. Abfalder, C.M., Schönauer, E., Ponnuraj, K., Huemer, M., Gadermaier, G., Regl, C., et al. Cloning, purification and characterization of the collagenase gene expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579 // Plos One. – 2016. – Vol. 11(9). – P. e0162433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162433>.
32. Liu, L., Ma, M., Cai, Z., Yang, X., Wang, W. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by *Bacillus cereus* MBL13 strain // Food Technol Biotechnol. – 2010. – Vol. 48(2). – P. 151.
33. Song, Y., Fu, Y., Huang, S., Liao, L., Wu, Q., Wang, Y., et al. Identification and antioxidant activity of bovine bone collagen-derived novel peptides prepared by recombinant collagenase from *Bacillus cereus* // Food Chemistry. – 2021. – Vol. 349. – P. 129143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129143>.
34. Makinen, K.K., Makinen, P.L. Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus* (strain Soc 67) // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262(26). – P. 12488-95. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45232-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45232-5).
35. Wu, Q., Li, C., Li, C., Chen, H., Shuliang, L. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 160(1). – P. 129. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8673-1>.
36. Zhang, X.-X., Li, Y., Wang, S.-Y., Wang, Y.-Y., Du, K.-L., Xu, J.-Y., Lei, L.-S., Feng, X., Liang, X.-Y., Ruan, H.-H. Expression, purification and enzymatic characterization of ColR75E collagenase of *Bacillus cereus* R75E // Chin. Biotechnol. – 2015. – Vol. 35(10). – P. 44-52. <https://doi.org/10.13523/j.cb.20151007>.
37. Okamoto, M., Yonejima, Y., Tsujimoto, Y., Suzuki, Y., Watanabe, K. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – Vol. 57(1). – P. 103-8. <https://doi.org/10.1007/s002530100731>.
38. Zhu, Y., Wang, L., Zheng, K., Liu, P., Li, W., Lin, J., et al. Optimized recombinant expression and characterization of collagenase in *Bacillus subtilis* WB600 // Fermentation. – 2022. – Vol. 8(9). – P. 449. <https://doi.org/10.3390/fermentation8090449>.
39. Pequeno, A.C.L., Arruda, A.A., Silva, D.F., Duarte Neto, J.M.W., Silveira Filho, V.M., Converti, A., et al. Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain // Preparative Biochemistry & Biotechnology. – 2019. – Vol. 49(5). – P. 501-9. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1587627>.
40. Nagano, H., To, K.A. Purification of Collagenase and Specificity of Its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – Vol. 64(1). – P. 181-3. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.181>.
41. Kawahara, H., Kusumoto, M., Obata, H. Isolation and characterization of a new-type of collagenase producing bacterium, *Bacillus-alvei* DC-1 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1993. – Vol. 57(8). – P. 1372-3. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1372>.
42. Asdornnithee, S., Akiyama, K., Sasaki, T., Takata, R. Isolation and characterization of a collagenolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* N22 // J. Ferment. Bioeng. – 1994. – Vol. 78(4). – P. 283-7. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90358-1).
43. Kembhavi, A.A., Kulkarni, A., Pant, A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM no. 64 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1993. – Vol. 38(1-2). – P. 83-92. <https://doi.org/10.1007/bf02916414>.
44. Silva, C.Rd., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp and some properties of the enzymatic activity // Brazilian Journal of Microbiology. – 2007. – Vol. 38. – P. 253-8. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012>.
45. Farhadian, S., Asoodeh, A., Lagzian, M. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806 // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2015. – Vol. 115. – P. 51-8. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.02.001>.
46. Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11 // AAPS PharmSciTech. – 2003. – Vol. 4(4). – P. E56. <https://doi.org/10.1208/pt040456>.
47. Sundarajan, S., Parambath, S., Suresh, S., Rao, S., Padmanabhan, S. Novel properties of recombinant Sso7d-Taq DNA polymerase purified using aqueous two-phase extraction: Utilities of the enzyme in viral diagnosis // Biotechnol. Rep. (Amst). – 2018. – Vol. 19. – P. e00270. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00270>.
48. Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K.K., Kaur, S., et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential // Crit. Rev. Biotechnol. – 2017. – Vol. 37(4). – P. 476-91. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1185388>.
49. Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 87(2). – P. 625-33. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2499-1>.
50. Tiwary, E., Gupta, R. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-

15: biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101(15). – P. 6103-10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.090>.

51. Mazotto, A.M., de Melo, A.C., Macrae, A., Rosado, A.S., Peixoto, R., Cedrola, S.M., et al. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 27(6). – P. 1355-65. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0586-1>.

52. Kumar, A.G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N., Sekaran, G. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus* // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 104(2). – P. 411-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03564.x>.

53. Suh, H.J., Lee, H.K. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1 // J. Protein Chem. – 2001. – Vol. 20(2). – P. 165-9. <https://doi.org/10.1023/a:1011075707553>.

54. Younes, G., Shahbazi, M., Rasoul-Amini, S., Kargar, M., Safari, A., Kazemi, A., et al. Identification and characterization of feather-degrading bacteria from keratin-rich wastes // Ann. Microbiol. – 2012. – Vol. 62. – P. 737-744. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0313-7>.

55. Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., Brandelli, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin // Arch. Microbiol. – 2003. – Vol. 179(4). – P. 258-65. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0525-8>.

UDC 579.6

POTENTIAL OF *BACILLUS SUBTILIS* A5.3 AND *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* T7 STRAINS IN THE HYDROLYSIS OF COLLAGEN-CONTAINING AGRICULTURAL WASTE

Aktayeva S., Baltin K.

National Center of Biotechnology, Kurgalzhinskoye Highway, 13/5, Astana, 010000, Kazakhstan

*Corresponding Author: Aktayeva S., aktayeva@biocenter.kz

ABSTRACT

This study explores the potential of *Bacillus subtilis* A5.3 and *Bacillus licheniformis* T7 as sources of proteolytic enzymes with collagenase activity for the biotechnological processing of collagen-containing agricultural waste. Isolation, identification, and characterization of these bacterial strains were performed using morphological, biochemical, and molecular genetic methods. Proteolytic activity was assessed on casein and gelatin substrates. Optimal conditions for enzyme activity were determined to be 70°C and pH 10.0 for *B. subtilis* A5.3, and 60°C and pH 9.0 for *B. licheniformis* T7. The impact of metal ions, detergents, and inhibitors on enzyme activity revealed significant differences between the two strains, with *B. subtilis* A5.3 demonstrating higher sensitivity to Mn²⁺, Cd²⁺, and Mg²⁺ ions, while *B. licheniformis* T7 exhibited greater resistance to these metals. Zymographic analysis confirmed the presence of multiple active proteases in the enzyme extracts of both strains, with molecular weights ranging from 20 to 150 kDa. The observed gelatin hydrolysis activity suggests the presence of collagenolytic proteases, highlighting the potential industrial application of these strains in the hydrolysis of collagen-containing waste. The findings emphasize the suitability of *B. subtilis* A5.3 and *B. licheniformis* T7 as promising candidates for the development of sustainable methods for the utilization of collagen-rich waste materials.

Keywords: *Bacillus*, protease, collagenase, hydrolysis, protein.

ӘОЖ 579.6

BACILLUS SUBTILIS A5.3 ЖӘНЕ *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* T7 ШТАММДАРЫНЫҢ АУЫЛ ШАРУАШЫЛЫҒЫ ҚАЛДЫҚТАРЫНДАҒЫ КОЛЛАГЕНДІ ГИДРОЛИЗДЕУ ӘЛЕУЕТІ

Актаева С.*, Балтин К.

Ұлттық биотехнология орталығы, Кургалжинскоетасжолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

* Корреспондент автор: Актаева С., aktayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Зерттеу *Bacillus subtilis* A5.3 және *Bacillus licheniformis* T7 штамдарының ауыл шаруашылығындағы коллаген құрамды қалдықтарды биотехнологиялық қайта өңдеу үшін коллагеназды белсенділігі бар протеолитикалық ферменттердің көздері ретінде әлеуетін зерттеуге арналған. Бұл бактериялық штамдардың морфологиялық, биохимиялық және молекулалық-генетикалық әдістерді қолдану арқылы оқшаулау, идентификация және сипаттамасы жүргізілді. Проте-

олирикалық белсенділік казеин және желатин субстраттарында бағаланды. Ферменттердің белсенділігі үшін оңтайлы жағдайлар *B. subtilis* A5.3 үшін 70°C және pH 10,0, ал *B. licheniformis* T7 үшін 60°C және pH 9,0 деп анықталды. Металл иондарының, детергенттердің және ингибиторлардың ферменттердің белсенділігіне әсерін зерттеу екі штамм арасындағы елеулі айырмашылықтарды көрсетті: *B. subtilis* A5.3 Mn^{2+} , Cd^{2+} және Mg^{2+} иондарына жоғары сезімталдық көрсетті, ал *B. licheniformis* T7 бұл металдарға үлкен төзімділік көрсетті. Зимографиялық талдау екі штаммның ферменттік экстракттарында 20-дан 150 кДа-ға дейінгі молекулалық массалары бар бірнеше белсенді протеазалардың бар екенін растады. Желатинді гидролиздеу белсенділігі коллагеназға ұқсас протеазалардың бар екенін көрсетеді, бұл осы штаммдардың коллаген құрамды қалдықтарды гидролиздеу бойынша өнеркәсіптік қолдану әлеуетін көрсетеді. Алынған нәтижелер *B. subtilis* A5.3 және *B. licheniformis* T7-ді коллаген құрамды қалдықтарды кәдеге жаратудың тұрақты әдістерін әзірлеу үшін перспективті кандидаттар ретінде пайдалануға болатындығын дәлелдейді.

Түйін сөздер: *Bacillus*, протеаза, коллагеназа, гидролиз, ақуыз.