2020 Т. 50 № 4 / Техника и технология пищевых производств / Food Processing: Techniques and Technology
ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)
https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-602-615
УДК 636.087:547.962.9
Оригинальная статья
http://fptt.ru

Кератиназы *Streptomyces* и *Bacillus*: свойства и направления использования

А. И. Дмитриева[1,*], А. В. Алексеенко[2], Д. Д. Белова[3], Н. И. Пискаева[1] Л. В. Терещук[1]

[1] *Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия*

[2] *Каролинский институт, Стокгольм, Швеция*

[3] *Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия*

**e-mail: a_piskaeva@mail.ru*

Дата поступления в редакцию: 29.05.2020
Дата принятия в печать: 25.12.2020

© А. И. Дмитриева, А. В. Алексеенко, Д. Д. Белова, Н. И. Пискаева, Л. В. Терещук, 2020

Аннотация.
Введение. Перопуховые отходы являются перспективным источником кормового белка. По химическому составу перопуховое сырье является ценным источником питательных веществ и актуально как компонент кормовых добавок. Цель работы заключалась в скрининге бактерий с высокой кератинолитической активностью для снижения антропогенной нагрузки на экосистему путем применения биопрепарата на основе консорциума штаммов для утилизации сложных органических отходов птицефабрик.
Объекты и методы исследования. Лиофилизированные штаммы микроорганизмов и перопуховые отходы. В работе были использованы современные биоинформатические методы обработки данных: филогенетическая идентификации ферментов, алгоритм поиска ортологичных генов InParanoid 8, а также стандартные биотехнологические методы: электрофоретический анализ в полиакриламидном геле, анализ аминокислотного состава, микроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография.
Результаты и их обсуждение. Произведен скрининг кератинолитических штаммов с использованием баз данных белковых последовательностей. Доказано, что гомологичные (гомология более 98 %) по кератиназам штаммы относятся к родам *Streptomyces* и *Bacillus*. Обозначены группы ферментов, потенциально участвующих в деградации кератина. Для выделенных ферментов была проведена филогенетическая идентификации, которая основывалась на анализе с использованием специализированного алгоритма поиска ортологичных генов InParanoid 8.
Выводы. На основании совокупной оценки отобраны четыре штамма микроорганизмов, обладающих максимальной ферментативной активностью по отношению к кератину. К данным штаммам были отнесены бактерии рода *Bacillus*, а именно *Bacillus licheniformis* B-740, *Bacillus pumilus* B-508 и *Bacillus subtilis* ATCC 6051, а также бактерия *Streptomyces albidoflavus* ATCC 25422. Перечисленные штаммы использовались для создания биосовместимого консорциума по переработке отходов птицефабрик (перопуховые сырье) в кормовую добавку. Было подтверждено наличие биологически ценных веществ, содержащихся в полученных гидролизатах, а также возможность их использования в качестве высокобелкового компонента кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова. Кератинолитическая активность, кератиназа, перопуховые отходы, переработка отходов, скрининг микроорганизмов, кормовой белок

Финансирование. Исследования финансировалось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России) в рамках Стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (СП 2018-2020).

Для цитирования: Кератиназы *Streptomyces* и *Bacillus*: свойства и направления использования / А. И. Дмитриева, А. В. Алексеенко, Д. Д. Белова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 4. – С. 602–615. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-602-615.

Original article
Available online at http://fptt.ru/eng

Streptomyces and *Bacillus* Keratinases: Properties and Uses

Anastasia I. Dmitrieva[1,*], Andrey V. Alexeyenko[2], Daria D. Belova[3], Nina I. Piskaeva[1], Lubov V. Tereshchuk[1]

[1] Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

[2] Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

[3] Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

*e-mail: a_piskaeva@mail.ru

Received: May 29, 2020
Accepted: December 25, 2020

© A.I. Dmitrieva, A.V. Alexeyenko, D.D. Belova, N.I. Piskaeva, L.V. Tereshchuk, 2020

Abstract.
Introduction. Feather waste is a promising source of feed protein. Its chemical composition is a valuable source of nutrients and can become an important component of feed additives. The research objective was to screen bacteria with a high keratinolytic activity and develop a bio-product based on a bacterial consortium in order to recycle complex organic poultry waste, thus reducing the anthropogenic load on the ecosystem.
Study objects and methods. The research featured lyophilized strains of microorganisms provided by State Research Institute "Gosniigenetika" and feather waste provided by Kuzbass Broiler LLC (Russia, Novokuznetsk district). The study involved such advanced bioinformatic methods of data processing as phylogenetic identification of enzymes and InParanoid 8 algorithm for searching orthologous genes. The standard biotechnological methods included an electrophoretic analysis in polyacrylamide gel, an analysis of amino acid composition, a microscopy, and a high-performance liquid chromatography.
Results and discussion. Keratinolytic strains were screened using protein sequence databases. The homologous keratinase strains with homology of more than 98% appeared to belong to the genera *Streptomyces* and *Bacillus*. The research helped to identify groups of enzymes that are potentially involved in keratin degradation. The selected enzymes were subjected to a phylogenetic identification based on InParanoid 8, a specialized algorithm of orthologous genes search.
Conclusion. The experiment made it possible to select four strains of microorganisms with maximum enzymatic activity in relation to keratin. These strains included bacteria of the genus *Bacillus*, namely *Bacillus licheniformis* B-740, *Bacillus pumilus* B-508 and *Bacillus subtilis* ATCC 6051, and the bacterium *Streptomyces albidoflavus* ATCC 25422. These strains were used to create a biocompatible consortium for processing feather waste into a feed additive. The research confirmed the presence of biologically valuable substances in the obtained hydrolysates, as well as the possibility of their use as a high-protein component of feed additives for farm animals.

Keywords. Keratinolytic activity, keratinase, feather-down waste, waste processing, screening of microorganisms, feed protein

Funding. The research was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauka) as part of the Grant of the President of the Russian Federation for young scientists and graduate students working in priority areas of modernization of the Russian economy (SP 2018-2020).

For citation: Dmitrieva AI, Alexeyenko AV, Belova DD, Piskaeva NI., Tereshchuk LV. *Streptomyces* and *Bacillus* Keratinases: Properties and Uses. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(4):602–615. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-602-615.

Введение

Недостаточное использование ценного сырья приводит к потере в нем богатого источника питательных веществ. Применение отходов птицефабрик в не переработанном виде (перопухового сырья) (70 % данных ресурсов в неизменном виде скармливается животным) приводит к потере до 40 % ценных нутриентов. Это свидетельствует о нерациональном использовании вторичных ресурсов предприятия [1, 2].

Одним из перспективных способов переработки перопухового сырья является биотехнологический способ, который основан на способности микроорганизмов преобразовывать исходные вещества субстрата (в качестве которого можно использовать перо и пух) в новые полезные метаболиты [3]. Данный способ является инновационным и представляет собой альтернативный метод по утилизации кератинсодержащих отходов.

К известным микроорганизмам, способным деградировать кератин, относят:
– актиномицеты, выделенные из почвы, водоемов, тел животных, рода *Streptomyces rimosus*, а именно *S. roseochromogenes*, *S. griseus*, *S. parvus*, *S. praecox*, *S. scabies*, *S. griseoluteus*, *S. microvlavus*, *S. globisporusvulgaris*, и рода *Nocardia*, а именно *Nocardia rubra* [4, 5];
– почвенные грибы рода *Penicillium*, а именно *P. rubrum*, *P. lilacium*, и гриб *Fusarium nivale* [4, 6];
– дрожжеподобные грибы *Candida albicans* и грибы рода *Trichophyton*, а именно *T. mentagrophytes*, *T. schoenleini*, *T. rubrum*, *T. terrestre* и *T. mentagrophytes* [7, 8];
– бактерии *Fusiformis nodosus* (или *Bacterioides nodosus*) и рода *Bacillus* [9].

Но не все из перечисленных штаммов можно использовать в безопасном процессе биоконверсии керотинсодержащих отходов (как субстрата) в полезные метаболиты. Важен подбор

микроорганизмов-продуцентов. Помимо подбора штамма, актуален и выбор состава питательной среды, а именно ее азотный, углеродный состав, их соотношение, присутствие сахаров (глюкозы, лактозы или мальтозы) [10–12]. Также важна оптимальная фаза роста микроорганизмов, наиболее подходящая для продуцирования ферментов, обладающих кератинолитической активностью. Так для бактерий рода *Bacillus* оптимальным фазами являются постэкспоненциальный и стационарный период.

Ферменты, обладающие кератинолитической активностью, называются протеазами. Они способны полностью преобразовывать белки пера [3–4, 7]. Для расщепления кератина необходимы две группы ферментов: сначала дисульфидные редуктазы уменьшают количество бисульфидных связей в молекуле белка, делая его доступным для сериновых протеаз или кератиназ (кеатиназы не могут воздействовать на кератин в нативной форме). Данные ферменты продуцируются микроорганизмами только при условии наличия в субстрате кератина в нативной форме.

Так как большинство кератинолитических штаммов способно продуцировать только один вид фермента или два вида ферментов, но не с одинаковой активностью, то процесс биоконверсии протекает поэтапно, потому что один из этапов гидролиза замедлен [4, 7].

Консорциумы микроорганизмов, обладающих кератинолитической активностью, являются малоизученными, но наиболее перспективными источниками ферментов, способных ступенчато провести полный гидролиз кератина. В связи с этим поиск и исследование кератинолитических микроорганизмов и их ферментов является актуальным направлением научных изысканий как для развития фундаментального аспекта, так и для повышения биотехнологического потенциала.

Цель данной работы заключалась в скрининге бактерий с высокой кератинолитической активностью для снижения антропогенной нагрузки на экосистему путем применения биопрепарата на основе консорциума подобранны штаммов для утилизации сложных органических отходов птицефабрик.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являются микроорганизмы-продуценты ферментов, разлагающих кератин, которые были предоставлены НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика» (www.genetika.ru) и организацией «ATCC – American Type Culture Collection» (www.atcc.org). К объектам исследования относятся:

– лиофилизированные культуры, относящиеся к грамположительные микроорганизмам, бактерии рода *Bacillus*, а именно *B. brevis* (ATCC 8246), *B. licheniformis* (B-740), *B. pumilus* (B-508), *B. stearothermophilus* (ATCC 12980), *B. subtilis* (ATCC 6051), *B. velezensis* (B-64), бифидобактерии *Bifidobacterium longum* (ATCC 15707), стрептомицеты *Streptomyces albidoflavus* (ATCC 25422) и *Streptomyces sp.* (OWU 1633);

– лиофилизированные патогенные культуры грамположительные кокки *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), грамотрицательные палочки *Salmonella typhimurium* (ATCC 1353), *Salmonella pullorum* (ATCC 19945) и условно-патогенные культуры грамположительные палочки *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), грамотрицательные палочковидные *Escherichia coli* (Б-5), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (тест-культуры);

– специализированные консорциумы, способные разлагать кератин. Это грамположительные палочковидные бактерии *Bacillus licheniformis* (B-740), *Bacillus pumilus* (B-508), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) и актиномицет *Streptomyces albidoflavus* (ATCC 25422).

Поиск штаммов, обладающих способностью разлагать кератин, осуществлялся с помощью базы данных «Center for Biotechnological Information» (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), а поиск аминокислотных последовательностей ферментов осуществлялся с помощью «Открытой базы данных последовательностей белков – UniProtKB» (https://www.uniprot.org/), «Базы данных семейств белков, доменов и функциональных сайтов – InterPro» (www.ebi.ac.uk/interpro), «Базы данных семейств белковых доменов – Pfam» (http://xfam.org/) и раздела «белок» NCBI.

В качестве субстрата для культивирования микроорганизмов использовали перопуховые отходы, полученные от кур породы «Ломанн Браун», «Ломанн-ЛСЛ-Классик» и «РОСС 708», соответствующие ГОСТ Р 53397-2009, и предоставленные ООО «Кузбасский бройлер» (Россия)[1]. Перо было чистым, без посторонних примесей. Оно подвергалось предварительному промыванию в формальдегиде с последующим высушиванием на воздухе.

Культивирование выбранных штаммов проводилось согласно оптимальным для них условиям, указанным в паспортах. Продолжительность культивирования составляла 12 ч и 24 ч. Измерения концентрации биомассы осуществляли при помощи многорежимного детектора «Glomax Multi+» (США).

Для определения активности ферментов, выделяемых микроорганизмами, необходимо было осуществить следующие этапы [13]:

– к навеске измельчённого пера добавить 10 см^3 0,05 М боратного буферного раствора, содержащего фермент;

[1] ГОСТ Р 53397-2009. Сырье перопуховое. Технические условия. – М. : Стандартинформ, 2009. – 15 с.

Таблица 1. Химический состав отходов, полученных от различных пород кур, предоставленных компанией ООО «Кузбасский бройлер»

Table 1. Chemical composition of waste obtained from various breeds of chickens provided by Kuzbass Broiler LLC

Породы кур	Массовая доля веществ, %					
	Протеин	Клетчатка	Золы	Макроэлементы		
				Кальций	Фосфор	Натрий
«Ломанн Браун»	86,32 ± 1,29	0,72 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,79 ± 0,04	0,65 ± 0,04	0,16 ± 0,01
«Ломанн-ЛСЛ-Классик»	89,57 ± 1,25	0,49 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,85 ± 0,04	0,74 ± 0,04	0,24 ± 0,01
«РОСС 708»	83,94 ± 1,16	0,63 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,81 ± 0,03	0,59 ± 0,04	0,20 ± 0,01

– после навеску перемешивали (интенсивно и тщательно встряхивая) и помещали в термостат на культивирование в течение 3 ч при температуре 37 °С. В процессе культивирования и осуществлялся гидролиз;

– по истечению 3 ч нераспавшийся белок необходимо было осадить с помощью раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). После осаждения раствор отфильтровывали с помощью фильтра «Красная лента»;

– в фильтрате определяли оптическую плотность при длине волны в 340 нм.

По методу Барнштейна определяли содержание белка по ГОСТ 28178-89[2].

Степень гидролиза определяли как отношение аминного азота к общему [14].

Перевариваемость кератиновых гидролизатов определяли по ГОСТ 55987-2014[3]. Их фракционный состав устанавливали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Визуальная оценка гелей осуществлялась при помощи УФ-трансиллюминатора «TCP-20M» («Vilber Lourmat», США), длина волны излучения составляла 312 нм. Анализ и обработка полученной информации при проведении электрофореза в ПААГ проводилась при помощи гель-документирующей системы «Vitran-Photo» (ООО «Компания Биоком», Россия).

Аминокислотный состав гидролизатов белка кератина, согласно протоколам прибора, осуществлялся с помощью автоматического аминокислотного анализатора «Aracus» (PMA GmbH). Гидролизаты подготавливали методом щелочного гидролиза, т. е. добавлением водного раствора оксида кальция (5 % от массы сырья).

Для объектов исследования с помощью бумажных дисков, пропитанных растворами антибиотика 0,4 % концентрации, определяли антибиотикорезистентность. Результаты устойчивости к антибиотикам выражались в виде зон ингибирования (или стерильности) роста бактерий, которые замерялись с учетом диаметра самого диска на 1 и 2 день культивирование при 37 ± 2 °С.

Определяли антагонистические свойства выбранных штаммов по методике «диффузия в агаре» при их культивировании на твердой питательной среде с учетом сравнения размеров зон угнетения роста тест-микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella pullorum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Методом взаимного присутствия или совместного культивирования, осуществляемого на плотной питательной среде (мясопептонном агаре), проводили определение биосовместимости кератинолитических штаммов. Наличие зон угнетения роста одной культуры по периферии пятна роста другой культуры свидетельствует о наличии сильного антагонизма штаммов друг к другу.

Осуществляли культивирование следующих кератинолитических штаммов: *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Streptomyces albidoflavus* в соотношениях 25:25:25:25, 15:45:15:25, 15:35:15:35, 35:15:35:15 для подбора оптимального соотношения микроорганизмов [5, 6, 11, 12]. Оптимальное соотношение определялось по параметрам: титр жизнеспособных клеток, наличие кератинолитической активности, концентрация биомассы микроорганизмов, степень гидролиза кератина и массовая доля полученного при гидролизе белка. Культивирование проводили на мясопептонном бульоне (МПБ) при температуре 37,0 ± 0,5 °С в течение 24 ч.

Результаты и их обсуждение

С помощью баз данных NCBI и UniProtKB по результатам скрининга были подобраны штаммы, имеющие в своем геноме гены, ответственные за трансляцию ферментов, а именно дисульфидных редуктаз и сериновых протеаз (или кератиназ), гидролизующих кератин. К данным микроорганизмам было отнесено десять непатогенных штаммов: рода *Bacillus*, а именно: *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, слегка изогнутых палочковидных бактерии *Bifidobacterium longum*, *Stenotrophomonas*

[2] ГОСТ Р ИСО 16634-1-2011. Продукты пищевые. Определение общего содержания азота путем сжигания по методу Дюма и расчет содержания сырого протеина. Часть 1. Масличные культуры и корма для животных. – М. : Стандартинформ, 2013. – 28 с.

[3] ГОСТ Р 55987-2014. Корма, комбикормовое сырье. Метод определения переваримости муки из гидролизованного пера *in vitro*. – М. : Стандартинформ, 2014. – 7 с.

Таблица 2. Ферменты, участвующие в деградации пептидных и дисульфидных связей

Table 2. Enzymes involved in the degradation of peptide and disulfide bonds

Фермент	Количество	Деградируемые связи
Кератиназа	11	-CO-NH-
Дисульфидная редуктаза	13694	-S-S-
Сериновая протеаза	10239	-CO-NH-
Щелочная протеаза	125	-CO-NH-
Металлопротеаза	158	-CO-NH-
Субтилизин	220	-CO-NH-
Треодоксин	553	-S-S-

maltophilia и актинобактерии рода *Streptomyces*, а именно *S. albidoflavus* и *S. sp*.

Для выбора наиболее ценного по содержанию питательных компонентов перопухового сырья в качестве субстрата было осуществлено определение химического состава. Результаты представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 следует, что кератинсодержащие отходы (перо и пух), полученные от кур различных пород, характеризуется высоким содержанием сырого протеина (от 83 %), низким содержанием клетчатки (от 0,49 %), золы (от 0,09 %) и макроэлементов (кальция от 0,79 %, фосфора от 0,59 %, натрия от 0,16 %). Был сделан вывод о том, что перопуховые отходы от кур породы «Ломанн-ЛСЛ-Классик» являются богатым сырьем по химическому составу. Именно перо и пух этой породы кур использовались для дальнейших исследований в качестве субстрата для культивирования выбранных микроорганизмов.

На рисунке 1 представлено дерево сходства аминокислотных последовательностей белков микроорганизмов, продуцирующих ферменты, разлагающих кератин. Для построения данного дерева использовался раздел «Genbank» база данных NCBI.

Из рисунка 1 следует, что гомология более 98 %. Следовательно, микроорганизмы рода *Streptomyces* и *Bacillus* гомологичные по белкам штаммы. Этот

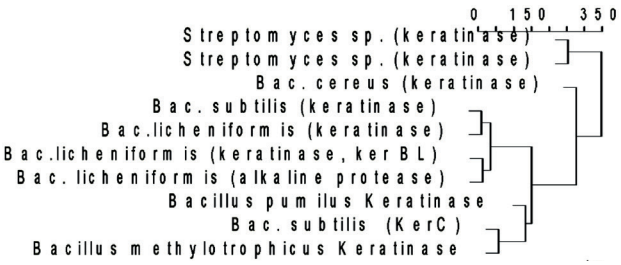

Рисунок 1. Древо сходства аминокислотных последовательностей белков выбранных штаммов

Figure 1. Tree of similarity for the amino acid sequences of the proteins obtained from the selected strains

вывод также подтверждается литературным анализом [4, 5, 10–12].

С помощью базы данных UniProt был осуществлен поиск ферментов (редуктаз и протеаз) по их наличию в штаммах микроорганизмов (а именно в бактериях, дрожжах и микроскопических грибах). Наибольшее количество ферментов двух групп продуцируется бактериями (дисульфидные редуктазы продуцируются в количестве 5593; а сериновые протеазы – 15948), данная информация также подтверждается результатами литературного анализа [4, 6].

Ферменты, которые потенциально могут деградировать кератин, т. е. разрушать как пептидные, так и дисульфидные связи, представлены в таблице 2. Поиск данных ферментов также осуществлялся в базе UniProt.

Домены белков, чаще всего встречающихся в ферментах и обладающих кератиназной активностью, представленые в таблице 2, были исследованы в базах данных InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) и Pfam (http://xfam.org/). Результаты исследования по идентификации и аннотирования представлены в таблице 3 [15].

При анализе представленных в таблице 3 данных видно:

– что во всех белках (ферментах), участвующих в процессе разложения кератина, действующих на пептидную (-CO-NH-) связь, присутствует один и тот же домен. В базе InterPro он имеет порядковый номер IPR000209 и аннотирован как Пептидаза S8/S53;

– что отличительной особенностью дисульфидных редуктаз, действующих на бисульфидную (-S-S-) связь, является отсутствие сходных с кератиназой доменов [15]. Это подтверждают литературные данные о необходимости наличия двух типов ферментов для протекания процесса гидролиза [4, 6].

Для филогенетической идентификации выявления взаимоотношений ферментов, представленных в таблице 2, был проведен анализ в программе InParanoid 8 (http://InParanoid.sbc.su.se). Программа представляет собой специализированный алгоритм поиска ортологичных генов. InParanoid 8 требует больших затрат вычисленных мощностей. Учитывая высокую гомологичность штаммов, было принято рациональное решение об исследовании только одного штамма – *Bacillus pumilus*.

Анализ в программе InParanoid 8 показал наличие кератиназных ортологов (гомологов) у *Bacillus pumilus* среди *B. licheniformis*, *B. Brevis* и *Streptomyces sp.* Данные микроорганизмы выделены зеленым в таблице 3.

Полученные результаты о выделении четырех штаммов легли в основу создания консорциума, обладающего кератинолитической активностью. Но для создания консорциума штаммы должны соответствовать следующим критериям: рост

Таблица 3. Доменная архитектура ферментов, участвующих в деградации кератина, полученная с помощью баз данных InterPro и Pfam

Table 3. Domain architecture of enzymes involved in keratin degradation obtained using the InterPro and Pfam databases

Ферменты	База данных			
	InterPro		Pfam	
	ID	Аннотация	ID	Аннотация
Кератиназа (11)	IPR000209 (10)	Пептидаза S8/S53	PF00082 (10*)	Пептидаза S8/S53 домен
	IPR015500 (10)	Пептидаза S8, субтилизин-подобная	PF05922 (6)	Ингибитор пептидазы I9
	IPR023827 (9)	Пептидаза S8, субтилизин	PF04151 (3)	Бактериальная пре-пептидаза С-терминальный домен
	IPR023828 (8)	Пептидаза S8, субтилизин, Ser- активный сайт		
Дисульфидная редуктаза (13694)	IPR012336 (5634)	Тиоредоксин	PF02683 (5549)	Трансмембранная область белка биогенеза цитохрома С
	IPR003834 (5549)	Цитохром	PF11412 (5549)	Тиол: дисульфидный обменный белок DsbD
	IPR017937 (4814)	Тиоредоксин	PF13098 (320)	Складка тиоредоксина
Щелочная протеаза (125)	IPR000209 (67)	Пептидаза S8/S53	PF00082 (8)	Пептидаза S8/S53 домен
	IPR022398 (53)	Пептидаза S8, субтилизин	PF05922 (4)	Ингибитор пептидазы I9
Сериновая протеаза (10239)	IPR002610 (3237)	Пептидаза S54, ромбоид	PF01694 (3237)	Доменные связи
	IPR022764 (3237)	Доменные связи	PF12122 (3229)	Белок неизвестной функции
	IPR022732 (3229)	Пептидаза S54, GlpG пептидаза, N-конец	PF13180 (357)	Доменные связи
	IPR023662 (3229)	Ромбоидная протеаза GlpG	PF00595 (131)	Доменные связи
Металло-протеазы (158)	IPR000209 (99)	Пептидаза S8/S53	PF00082 (99)	Пептидаза S8/S53 домен
	IPR015500 (98)	Пептидаза S8, субтилизин-подобная		
	IPR023828 (94)	Пептидаза S8, субтилизин		
Тиоредоксин протеаза (553)	IPR012336 (129)	Тиоредоксин	PF02943 (128)	Ферредоксин тиоредоксинредуктаза
	IPR004209 (128)	Бета-субъединица ферредоксина тиоредоксинредуктазы	PF00085 (83)	Тиоредоксин
	IPR005746 (83)	Тиоредоксин	PF00070 (65)	Пиридин-нуклеотид-дисульфид-оксидоредуктаза
Субтилизин (220)	IPR000209 (94)	Пептидаза S8/S53	PF00082 (94)	Пептидаза S8/S53 домен
	IPR023827 (63)	Пептидаза S8, субтилизин	PF05922 (29)	Ингибитор пептидазы I9

В скобках указано количество ферментов с соответствующим доменом. Разными цветами выделены домены, повторяющиеся в кератиназе и в других ферментах.

The number of enzymes with the corresponding domain is given in brackets. Domains repeated in keratinase and other enzymes are given in different colors.

на питательной среде, в состав которой входят максимально доступные компоненты, обладание высокой кератиназной активностью, меньшими сроками культивирования и продолжительностью продуцирования ферментов.

К важным показателям кератинолитических микроорганизмов относятся: кератинолитическая активность ферментов, концентрация биомассы микроорганизмов, степень гидролиза нативного кератина, массовая доля продуцируемого белка, перевариваемость кератинового гидролизата. Данные показатели и их значения представлены в таблице 4.

В результате изучения показателей, представленных в таблице 4, максимальное значение концентрации биомассы штаммов, накапливающееся за 12 ч культивирования, было у микроорганизмов рода *Bacillus*: B-740, B-508, ATCC 6051, а также рода *Streptomyces* ATCC 25422 (от 232 КОК/г·дм^3). Микроорганизмы рода *Bacillus* отличаются высоким уровнем активности ферментов, деградирующих кератин – в среднем 30 Е/мг белка, что в три раза выше, чем у других исследуемых штаммов, а также значимым показателем накопления белка (от 65,19 до 76,50 %) и степенью гидролиза белка (от 78,32 до 79,44 %) [15].

Особую роль в питательной ценности корма играет содержание белков, обуславливающих пищевую и биологическую ценность кормовых добавок. В кормлении животных под сырым протеином (белком) подразумевают соединения, содержащие азот, т. е. белки, пептиды и амиды. Амидами являются азотосодержащие соединения небелкового характера, т. е. свободные аминокислоты, амиды, органические основания, нуклеиновые кислоты, нитриты, нитраты, алкалоиды и соли аммония. Их определяют по разности между сырым протеином и белком доменов [15].

Таблица 4. Свойства кератинолитических микроорганизмов

Table 4. Properties of keratinolytic microorganisms

Используемый штамм	Показатель				
	Кератинолитическая активность ферментов, Е/мг белка	Концентрация полученной биомассы, КОЕ/г·дм^3	Степень гидролиза белка-кератина, %	Массовая доля полученного белка, %	Перевариваемость кератинового гидролизата, %
Рода *Bacillus*					
ATCC 8246	12,1 ± 0,6	187,0 ± 10,2	52,1 ± 3,0	43,9 ± 2,5	52,1 ± 2,3
B-740	36,0 ± 1,8	370,4 ± 22,1	80,1 ± 1,5	69,4 ± 4,2	75,1 ± 4,5
B-508	37,7 ± 1,7	451,3 ± 25,6	79,4 ± 0,8	76,5 ± 3,4	79,5 ± 2,1
ATCC 12980	10,9 ± 0,1	110,0 ± 6,5	34,0 ± 1,2	24,5 ± 1,8	41,0 ± 2,1
ATCC 6051	24,6 ± 3,7	289,5 ± 13,8	78,3 ± 1,8	66,2 ± 4,4	65,9 ± 3,9
B-64	13,5 ± 0,8	143,0 ± 8,5	50,2 ± 2,0	31,1 ± 2,0	42,1 ± 2,1
Рода *Bifidobacterium*					
ATCC 15707	9,7 ± 0,2	112,0 ± 6,5	41,1 ± 1,6	23,1 ± 1,2	41,0 ± 2,0
Рода *Stenotrophomonas*					
ATCC 13637	7,9 ± 0,2	87,0 ± 5,3	26,2 ± 0,7	21,1 ± 1,20	33,6 ± 1,3
Рода *Streptomyces*					
ATCC 25422	22,9 ± 1,9	232,0 ± 14,8	78,6 ± 1,6	65,1 ± 4,7	63,3 ± 5,2
OWU 1633	8,7 ± 0,4	113,2 ± 6,6	45,4 ± 1,4	25,4 ± 1,5	43,4 ± 2,1

Кератинолитическая активность штаммов, способных последовательно продуцировать протеолитические ферменты, выражается в осуществлении процессов биоконверсии кератина. Для исследуемых штаммов был проведен анализ изменения фракций пептидов и аминокислот. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Выбранные штаммы в процессе биоконверсии кератина обладают максимальным показателем уменьшения белков в течение 12 ч (от 164,00 до 212,00 мг/100 г образца), приростом пептидов (от 104,00 до 175,00 мг/100 г продукта), а также приростом аминокислот (от 4,00 до 7,00 мг/100 г продукта) в культуральной жидкости.

Концентрация биомассы микроорганизмов, степень гидролиза кератина, массовая доля продуцируемого белка, перевариваемость кератинового гидролизата – это показатели, характеризующие микроорганизмы, которые обладают кератинолитической активностью. По результатам исследования данных показателей были выбраны четыре штамма бактерий: *Streptomyces albidoflavus* ATCC 25422, *Bacillus licheniformis* B-740, *Bacillus pumilus* B-508 и

Таблица 5. Изменение фракций растворимых азотистых соединений

Table 5. Change in fractions of soluble nitrogenous compounds

Штамм	Фракции азотистых соединений (пептидов и аминокислот), мг/100 г образца		
	белки	пептиды	аминокислоты
Рода *Bacillus*			
B-740	–188,3 ± 0,2	175,2 ± 0,5	5,89 ± 0,04
B-508	–211,9 ± 1,1	158,4 ± 0,6	7,10 ± 0,10
ATCC 6051	–163,7 ± 0,2	103,9 ± 0,8	4,94 ± 0,10
ATCC 8246	22,4 ± 0,1	23,7 ± 0,4	4,00 ± 0,01
ATCC 12980	–15,3 ± 0,1	44,5 ± 0,6	0,72 ± 0,02
B-64	125,6 ± 0,6	–21,3 ± 0,7	3,90 ± 0,01
Рода *Streptomyces*			
ATCC 25422	–183,0 ± 0,9	125,8 ± 0,7	3,45 ± 0,1
Рода *Bifidobacterium*			
ATCC 15707	62,9 ± 0,3	–17,8 ± 0,8	2,50 ± 0,01
Рода *Stenotrophomonas*			
ATCC 13637	138,2 ± 0,7	–21,3 ± 0,9	0,59 ± 0,1
Рода *Streptomyces*			
OWU 1633	–82,4 ± 0,4	131,5 ± 0,2	3,00 ± 0,02

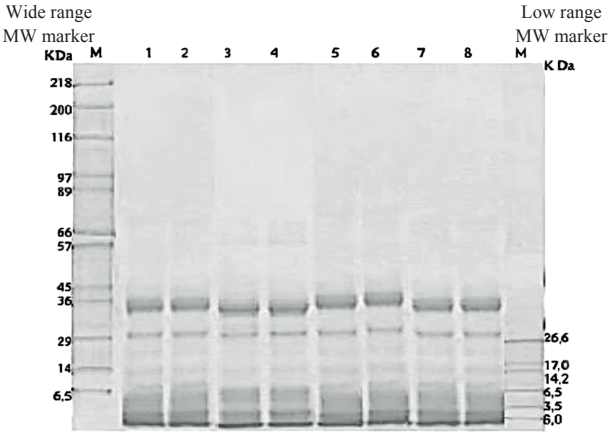

Рисунок 2. Электрофореграмма гидролизатов кератина, полученных при ферментации кератинолитических бактерий в течение 30 ч: М – маркер Sigma Aldrich (США); 1, 2 – B-740; 3, 4 – B-508; 5, 6 –ATCC 6051; 7, 8 – ATCC 25422

Figure 2. Electropherogram of keratin hydrolysates obtained by fermentation of keratinolytic bacteria for 30 h: M – Sigma Aldrich marker (USA); 1, 2 – B-740; 3, 4 – B-508; 5, 6 – ATCC 6051; 7, 8 – ATCC 25422

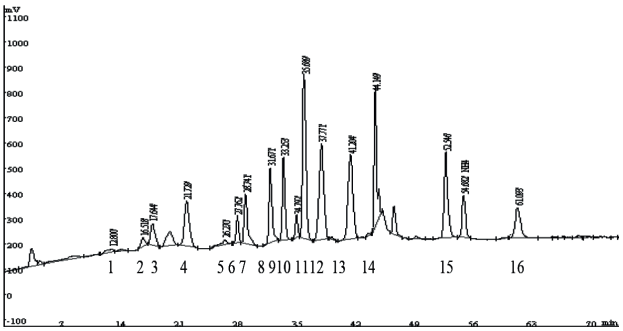

Рисунок 3. Хроматограмма, показывающая аминокислотный состав гидролизата перопуховых отходов, полученного под действием *B. licheniformis* (B-740) в течение 30 ч культивирования: 1 – His, 2 – Met, 3 – Ile, 4 – Tre, 5 – Phe, 6 – Val, 7 – Lys, 8 – Gly, 9 – Cys, 10 – Met, 11 – Asp, 12 – Leu, 13 – Ala, 14 – Glu, 15 – цистин, 16 – Arg

Figure 3. Chromatogram of the amino acid composition of the feather waste hydrolyzate obtained under the action of *B. licheniformis* (B-740) after 30 h of cultivation: 1 – His, 2 – Met, 3 – Ile, 4 – Tre, 5 – Phe, 6 – Val, 7 – Lys, 8 – Gly, 9 – Cys, 10 – Met, 11 – Asp, 12 – Leu, 13 – Ala, 14 – Glu, 15 – cystine, 16 – Arg

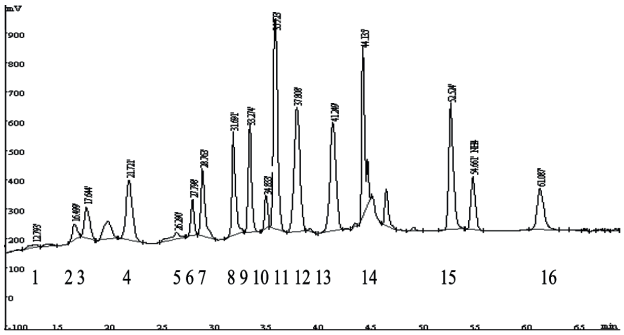

Рисунок 4. Хроматограмма, показывающая аминокислотного состава гидролизата, полученного под действием *B. pumilus* (B-508) в течение 30 ч культивирования: 1 – Ile, 2 – Val, 3 – Phe, 4 – Lys, 5 – His, 6 – Met, 7 – Cys, 8 – Gly, 9 – Met, 10 – Tre, 11 – Asp, 12 – цистин, 13 – Ala, 14 – Glu, 15 – Leu, 16 – Arg

Figure 4. Chromatogram of the amino acid composition of the hydrolyzate obtained by *B. pumilus* (B-508) after 30 h of cultivation: 1 – Ile, 2 – Val, 3 – Phe, 4 – Lys, 5 – His, 6 – Met, 7 – Cys, 8 – Gly, 9 – Met, 10 – Tre, 11 – Asp, 12 – cystine, 13 – Ala, 14 – Glu, 15 – Leu, 16 – Arg

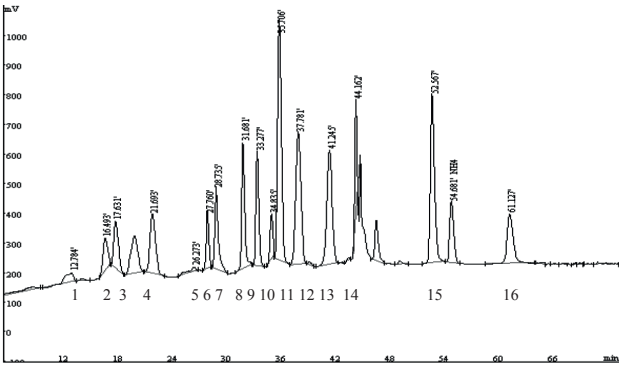

Рисунок 5. Хроматограмма, на которой представлен аминокислотный состав гидролизата перопуховых отходов, полученного под действием *B. subtilis* ATCC 6051 в течение 30 ч культивирования: 1 – His, 2 – Phe, 3 – Val, 4 – Arg, 5 – Met, 6 – Ile, 7 – Lys, 8 – цистин, 9 – Cys, 10 – Met, 11 – Asp, 12 – Ala, 13 – Gly, 14 – Leu, 15 – Glu, 16 – Tre

Figure 5. Chromatogram of the amino acid composition of the feather waste hydrolyzate obtained under the action of *B. subtilis* ATCC 6051 after 30 h of cultivation: 1 – His, 2 – Phe, 3 – Val, 4 – Arg, 5 – Met, 6 – Ile, 7 – Lys, 8 – cystine, 9 – Cys, 10 – Met, 11 – Asp, 12 – Ala, 13 – Gly, 14 – Leu, 15 – Glu, 16 – Tre

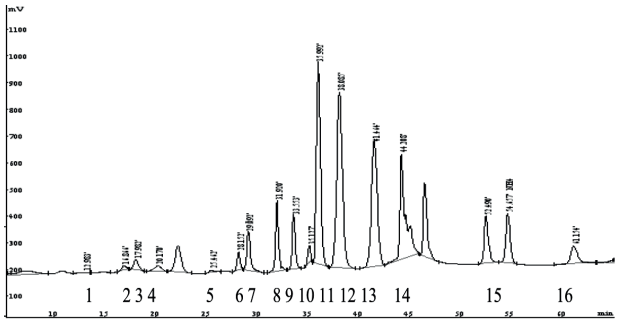

Рисунок 6. Хроматограмма, на которой представлен аминокислотный состав гидролизата перопухового сырья, полученного под действием *S. albidoflavus* ATCC 25422 в течение 30 ч культивирования: 1 – His, 2 – Phe, 3 – Met, 4 – Arg, 5 – Met, 6 – Tre, 7 – Lys, 8 – Ala, 9 – Gly, 10 – Ile, 11 – Asp, 12 – цистин, 13 – Cys, 14 – Leu, 15 – Glu, 16 – Val

Figure 6. Chromatogram of the amino acid composition of the hydrolyzate of feather raw materials obtained under the action of *S. albidoflavus* ATCC 25422 after 30 h of cultivation: 1 – His, 2 – Phe, 3 – Met, 4 – Arg, 5 – Met, 6 – Tre, 7 – Lys, 8 – Ala, 9 – Gly, 10 – Ile, 11 – Asp, 12 – cystine, 13 – Cys, 14 – Leu, 15 – Glu, 16 – Val

Bacillus subtilis ATCC 6051. У выбранных штаммов все перечисленные критерии имели максимальные значения. В дальнейшем эти штаммы использовались для создания консорциума по преобразованию перопуховых отходов птицефабрик в кормовую добавку.

Для получения наиболее полной характеристики химического состава гидролизатов перопухового сырья изучали состав пептидных фракций методом электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли (ПААГ). Электрофореграмма гидролизатов, ферментированных кератинолитическими бактериями, представлена на рисунке 2.

Результаты распределение пептидных фракций (по молекулярной массе) в гидролизате, полученном при ферментации бактерий B-740, B-508, ATCC 6051, ATCC 25422 в течение 30 ч, представлены в таблице 6. При учете пептидного состава важно иметь в виду наличие продуктов клеточного обмена (белков и аминокислот) в гидролизате. Для того чтобы уменьшить погрешность

Таблица 6. Молекулярно-массовое распределение фракций в гидролизате, ферментированном в течение 30 ч

Table 6. Molecular weight distribution of fractions in the hydrolyzate fermented for 30 h

№, п/п	Молекулярные массы, кДа	Содержание белковой фракции, %			
		B-740	B-508	ATCC 6051	ATCC 25422
1	89,0–66,0	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,01
2	65,0–57,0	0,5 ± 0,01	0,8 ± 0,03	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01
3	57,0–45,0	0,6 ± 0,01	0,9 ± 0,03	0,6 ± 0,03	0,3 ± 0,01
4	45,0–36,0	4,0 ± 0,10	4,1 ± 0,10	3,9 ± 0,10	3,6 ± 0,10
5	37,0–30,0	21,1 ± 0,50	24,3 ± 0,50	20,1 ± 0,50	19,4 ± 0,50
6	30,0–14,0	14,7 ± 0,50	15,0 ± 0,50	14,5 ± 0,50	14,3 ± 0,50
7	14,0–6,5	12,7 ± 0,20	12,9 ± 0,20	12,0 ± 0,20	11,6 ± 0,20
8	6,5–3,5	38,3 ± 0,50	39,0 ± 0,50	37,6 ± 0,50	37,2 ± 0,50
9	3,5–3,0	45,2 ± 0,80	59,0 ± 0,80	44,3 ± 0,80	43,6 ± 0,80

Таблица 7. Содержание свободных аминокислот в гидролизате

Table 7. Content of free amino acids in the hydrolyzate

Наименование аминокислоты	Содержание аминокислот, г/100 г образца				
	B-740	B-508	ATCC 6051	ATCC 25422	Исходное сырье
Аспарагиновая кислота (Asp)	10,24 ± 0,47	11,24 ± 0,91	12,08 ± 0,64	10,17 ± 0,61	14,37 ± 0,61
Глутаминовая кислота (Glu)	7,26 ± 0,59	7,48 ± 0,61	11,24 ± 0,45	8,19 ± 0,38	13,78 ± 0,59
Лейцин (Leu)	7,11 ± 0,52	7,49 ± 0,46	6,09 ± 0,45	7,49 ± 0,44	9,59 ± 0,46
Цистин	9,11 ± 0,59	8,37 ± 0,67	7,78 ± 0,40	8,19 ± 0,46	10,15 ± 0,51
Аланин (Ala)	9,19 ± 0,46	8,92 ± 0,83	7,49 ± 0,40	8,58 ± 0,43	10,82 ± 0,34
Цистеин (Cys)	5,18 ± 0,31	5,32 ± 0,39	5,19 ± 0,33	5,22 ± 0,31	6,36 ± 0,30
Глицин (Gly)	5,45 ± 0,39	5,69 ± 0,38	5,67 ± 0,33	5,84 ± 0,23	6,97 ± 0,31
Лизин (Lys)	5,47 ± 0,28	5,21 ± 0,26	5,34 ± 0,27	5,02 ± 0,19	5,59 ± 0,27
Треонин (Tre)	4,15 ± 0,21	4,25 ± 0,74	4,78 ± 0,21	4,65 ± 0,19	4,98 ± 0,21
Аргинин (Arg)	3,95 ± 0,12	4,05 ± 0,34	4,01 ± 0,21	4,03 ± 0,45	3,98 ± 0,20
Валин (Val)	5,04 ± 0,22	4,22 ± 0,21	4,67 ± 0,23	5,00 ± 0,25	5,10 ± 0,26
Изолейцин (Ile)	4,12 ± 0,16	4,14 ± 0,21	4,01 ± 0,20	2,98 ± 0,15	4,22 ± 0,21
Метионин (Met)	2,28 ± 0,17	2,09 ± 0,10	2,28 ± 0,11	1,32 ± 0,07	2,34 ± 0,11
Фенилаланин (Phe)	0,50 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,94 ± 0,04	0,55 ± 0,03
Гистидин (His)	0,34 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,54 ± 0,02
Всего	79,36	79,44	78,35	78,62	89,98

значений, вызванных присутствием в гидролизатах продуктов клеточного обмена, необходимо проводить анализ спустя 24–30 ч после начала культивирования, т. е. на фазе отмирания, когда происходит автолиз (распад белков клеток под действием собственных клеточных ферментов).

Во фракции под номером 6, с диапазоном молекулярных масс от 36,0 до 29,0 кДа наблюдается большое количество пептидов. Разбег молекулярной массы фракции 6 схож с молекулярной массой α-кератина, находящейся в пределах от 40 до 69 кДа [16, 17]. Следовательно, в данной фракции находятся продукты гидролиза α-кератина и частично продукты автолиза бактериальных культур (крупномолекулярные фракции). Также видно, что в исследуемых гидролизатах присутствуют белковые фракции с молекулярными массами от 89,0 до 3,5 кДа.

По результатам проведенного анализа видно, что присутствуют низкомолекулярные пептиды с молекулярной массой меньше 19 кДа и свободные аминокислоты (примерно в 100–200 Да), относящиеся к представителям β-кератинов и образовавшихся в результате автолиза.

Таким образом, в гидролизате кератина, полученном под действием кератинолитических ферментов, продуцируемых бактериями B-740, B-508, ATCC 6051 и ATCC 25422, преобладают фракции низкомолекулярного состава. Данные результаты подтверждают высокую кератинолитическую активность ферментов, получаемых при культивировании консорциума подобранных штаммов.

Таблица 8. Устойчивость кератинолитических штаммов к действию антибиотиков

Table 8. Antibiotic resistance of the keratinolytic strains

Штаммы	Колистин	Тетрациклин	Энрофлоксацин	Ципрофлоксацин
	Радиус зоны ингибирования роста (R), мм			
B-740	1,0 ± 0,4	9,3 ± 0,2	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,4
B-508	1,0 ± 0,5	6,2 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,3
ATCC 6051	1,6 ± 0,6	10,7 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2
ATCC 25422	1,8 ± 0,5	8,8 ± 0,2	1,7 ± 0,5	7,8 ± 0,5

Таблица 9. Антагонистические свойства кератинолитических штаммов

Table 9. Antagonistic properties of the keratinolytic strains

Микроорганизм	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella typhimurium*	*Salmonella pullorum*	*Clostridium perfringens*	*Escherichia coli*	*Proteus vulgaris*	*Pseudomonas aeruginosa*
	Радиус зоны ингибирования роста (R), мм						
B-740	11,0 ± 2,5	14,0 ± 1,4	16,0 ± 0,4	18,0 ± 2,2	19,0 ± 0,2	19,0 ± 2,7	20,0 ± 1,9
B-508	11,0 ± 1,3	15,0 ± 1,9	16,0 ± 0,9	18,0 ± 2,9	20,0 ± 1,6	21,0 ± 0,6	21,0 ± 1,6
ATCC 6051	9,0 ± 3,3	13,0 ± 2,3	15,0 ± 1,5	17,0 ± 0,9	19,0 ± 0,1	19,0 ± 2,9	20,0 ± 1,9
ATCC 25422	10,0 ± 1,9	13,0 ± 1,5	17,0 ± 0,7	18,0 ± 0,2	19,0 ± 2,2	20,0 ± 0,1	20,0 ± 2,4

Изучение, выделение и культивирование бактерий B-740, B-508, ATCC 6051 и ATCC 25422 является перспективным направлением по получению ферментов, обладающих способностью разлагать кератин. Применение данных штаммов для переработки кератинсодержащего сырья является актуальным процессом создания кормовых добавок с заданным белковым и пептидным профилем.

Так как важным показателем качества кормов животных является их аминокислотный состав, то был осуществлен количественный анализ по содержанию заменимых и незаменимых аминокислот в полученных гидролизатах кератина. Хроматоргаммы, свидетельствующие об аминокислотном составе, представлены на рисунках 3–6.

Данные хроматоргафического исследования представлены в таблице 7.

По результатам исследования аминокислотного состава полученных гидролизатов выявлено, что при культивировании бактерии *Bacillus licheniformis* B-740 получается гидролизат богатый цистином, валином, аланином, лизином, метионином; *Bacillus pumilus* B-508: гидролизат содержит наибольшее количество аспарагиновой кислоты, лейцина, аргинина, цистеина, изолейцина; *Bacillus subtilis* ATCC 6051: в гидролизате преимущественно содержится глутаминовая кислота, треонин, гистидин; *Streptomyces albidoflavus* ATCC 25422: глицин и фенилаланин преобладают в полученном гидролизате.

Содержание глутаминовой кислоты (Glu) для всех гидролизатов составляет 8,79 г/100 г образца, содержание аспарагиновой кислоты (Asp) – 10,93 г/100 г образца. Отмечено высокое содержание других аминокислот: лейцина (Leu) (7,14 г/100 г образца), аланина (Ala) (8,70 г/100 г образца), цистина (8,38 г/100 г образца), цистеина (Cys) (5,22 г/100 г образца), глицина (Gly) (5,65 г/100 г образца). Данные результаты подтверждают наличие биологически активных веществ в полученных гидролизатах и возможность их использования в качестве высокобелковых кормовых добавок для животных.

Принимая во внимание вышеуказанные факторы, можно сделать вывод о том, что переработанные с помощью ферментов перопуховые отходы можно применять в качестве субстрата для получения сбалансированных кормовых добавок с высоким содержанием белка.

Перьевой покров может содержать патогенную микрофлору, т. к. птицы обитают среди постоянного присутствия источников инфекционного риска. Зараженные птицы очищают клюв о перья, тем самым загрязняя их. К тому же патогенная микрофлора также может использовать послеубойные отходы в качестве питательного субстрата. В связи с этим обработка перьевого сырья перед культивированием является важным подготовительным этапом. В производстве для обработки перьев используют химиотерапевтические средства (антибиотики, сульфаниламиды, фторхиноы и т. д.) [18]. Однако данные препараты не вызывают стопроцентной гибели патогенной микрофлоры. Поэтому важно, чтобы используемые в переработке перьев микроорганизмы обладали резистентностью к патогенной микрофлоре.

Используемые полезные штаммы должны обладать стойкостью к действию применяемого антибиотика, устойчивость к которым объясняется либо отсутствием мишени, либо ее недоступностью из-за пониженной проницаемости клеточной стенки, а также из-за инактивации антибиотика клеточными ферментами [19]. Зачастую устойчивость к анти-

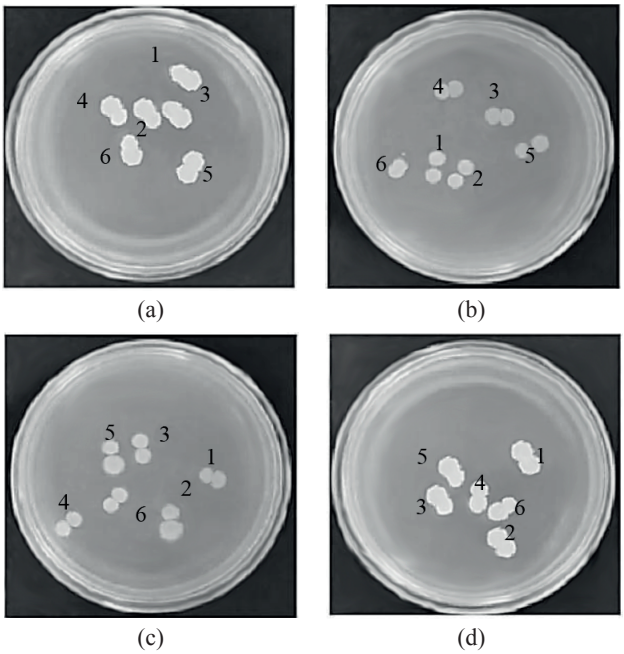

Рисунок 7. Оценка биосовместимости выбранных бактерий, осуществляемая методом взаимного присутствия при следующих концентрациях бактериальной суспензии: (a) 1×10^{-3} КОЕ/г; (b) 1×10^{-4} КОЕ/г; (c) 1×10^{-5} КОЕ/г; (d) 1×10–6 КОЕ/г: 1 – В-508 + В-740; 2 – В-508 + ATCC 6051; 3 – В-508 + ATCC 25422; 4 – В-740 + ATCC 6051; 5 – ATCC 6051 + ATCC 25422; 6 – В-740 + ATCC 25422

Figure 7. Biocompatibility of the bacteria by the method of mutual presence at the following concentrations of the bacterial suspension: (a) 1×10^{-3} КОЕ/г; (b) 1×10^{-4} КОЕ/г; (c) 1×10^{-5} КОЕ/г; (d) 1×10^{-6} КОЕ/г: 1 – В-508 + В-740; 2 – В-508 + ATCC 6051; 3 – В-508 + ATCC 25422; 4 – В-740 + ATCC 6051; 5 – ATCC 6051 + ATCC 25422; 6 – В740 + ATCC 25422

биотикам является видовым признаком, который легко прогнозируется.

Установление устойчивости для полезных штаммов является актуальным и необходимым этапом при масштабировании биотехнологического процесса, т. к. упрощает работу со штаммами в производственных масштабах. В данной работе проводились исследования по выявлению антагонистических свойств в отношении патогенной микрофлоры, а также исследования антибиотикорезистентности выбранных полезных штаммов. В ходе исследования устойчивости к антибиотикам кератинолитических штаммов использовали следующие антибиотики: колистин, энрофлоксацин, тетрациклин и ципрофлоксацин. Результаты опытов приведены в таблице 8.

В соответствии с данными, приведенными в таблице 8, выбранные штаммы микроорганизмов проявляют устойчивость по отношению к колистину, энрофлоксацину и ципрофлоксацину. Так средний радиус зоны ингибирования для *Bacillus pumilus* В-508 составил 1,33 мм, для *Bacillus licheniformis* В-740 – 1,28 мм, для *Bacillus subtilis* ATCC 6051 – 1,58 мм. Было выявлено, что штамм *Streptomyces albidoflavus* ATCC 25422 проявляет высокие результаты резистентности при тесте с колистином и энрофлоксацином – 1,8 и 1,7 мм, но не обладает устойчивостью к действию ципрофлоксацина. У всех штаммов отсутствует устойчивость к тетрациклину (радиус зоны ингибирования от 8,8 до 10,7 мм).

В данной работе также изучались антагонистические свойства выбранных штаммов по отношению к представителям патогенной микрофлоры, а именно к *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella pullorum* и представителям условно-патогенной микрофлоры *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*. Влияние микроорганизмов друг на друга оценивалось путем взаимного присутствия на твердой питательной среде с патогенными тест-штаммами методом дисков. Учет вели путем фиксации величины зон задержки роста тест-микробов. Результаты опытов приведены в таблице 9.

В результате культивирования видно, что изучаемые штаммы бактерий обладают значительной антагонистической активностью по отношению к представленным патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Это также подтверждается литературными данными [4, 7, 9, 10].

Средний радиус зоны ингибирования (R, мм) роста патогенных и условно-патогенных микроорганизмов для *Bacillus pumilus* (В-508) составляет 16,71 мм, для штамма *Bacillus licheniformis* В-740 – 15,82 мм, для *Bacillus subtilis* ATCC 6051 – 14,55 мм, для *Streptomyces albidoflavus* ATCC 25422 – 17, 92 мм [15].

В дальнейшем оценивалась биосовместимость четырех выбранных штаммов. Оценка производилась путем метода совместного (взаимного) присутствия данных штамов на одной питательной среде с поледующей оценкой зон перекрытия. При культивировании варьировали концентрацией микроорганизмов во вносимой бактериальной суспензии. Концентрация составляла: 1×10^{-3} КОЕ/г, 1×10^{-4} КОЕ/г, 1×10^{-5} КОЕ/г, 1×10^{-6} КОЕ/г. Результаты совместного культивирования представлены на рисунке 7.

В результате определения биосовместимости выбранных четырех штаммов бактерий, являющихся продуцентами ферментов, разлагающих кератин, было выявлено, что данные микроорганизмы не проявляют антагонистического эффекта по отношению друг к другу. Благодаря высокой степени биосовместимости подобранных кератинолитических штаммов их можно применять в качестве составляющих консорциума для переработки перопуховых отходов.

Выводы

Перопуховое сырье является недооцененным отходом птицеводства, содержащим в себе большое количество полезных пищевых компонентов.

Благодаря богатому белковому составу и наличию углеводов и макроэлементов перопуховой отход может использоваться в качестве субстрата, т. е. в качестве питательной среды для роста и развития микроорганизмов. В данной работе описан перспективный и инновационный способ переработки кератинсодержащего сырья (перопухового отхода) с помощью штаммов микроорганизмов, продуцирующих полезные метаболиты.

В данной работе описывался процесс выбора субстрата (перопухового отхода), наиболее богатого питательными компонентами, для культивирования микроорганизмов, которые обладают кератинолитической активностью. Для подбора необходимых микроорганизмов был произведен скрининг кератинолитических с использованием баз данных белковых последовательностей. Доказано, что гомологичные (гомология более 98 %) по кератиназам штаммы относятся к родам *Streptomyces* и *Bacillus*.

К группам ферментов, потенциально участвующих в деградации кератина, относятся дисульфидные редуктазы и сериновые протеазы. Представлена доменная архитектура данных ферментов. Для филогенетической идентификации редуктаз и протеаз был проведен анализ с использованием специализироанного алгоритма для поиска ортологичных генов InParanoid 8.

Были изучены свойства десяти микроорганизмов, обладающих способностью разлагать кератин. Из десяти штаммов были выделены четыре микроорганизма (*Bacillus licheniformis* B-740, *Bacillus pumilus* B-508, *Bacillus subtilis* ATCC 6051 и *Streptomyces albidoflavus* ATCC 25422), обладающие максимально выраженными производственными признаками: концентрация биомассы при культивировании данных штаммов равнялась 335,0 1×10^{-3} КОЕ/г, уровень кератинолитической активности продуцируемых штаммами ферментов – в среднем 30 Е/мг белка, показатель накопления белка в биомассе от 65,2 до 76,5 % и степень гидролиза белка от 78,4 до 79,4 %. Для выбранных штаммов была оценена антибиотическая активность по отношению к представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры. В результате опытов выбранные микроорганизмы обладали высокой устойчивостью к действию тест-культур.

Четыре исследуемых штамма были проверены на резистентность к действию антибиотиков, применяемых в промышленности. В результате *Bacillus pumilus* B-508, *Bacillus licheniformis* B-740 и *Bacillus subtilis* ATCC 6051 имели выраженную устойчивость по отношению к колистину, энрофлоксацину и ципрофлоксацину. Бактерия *Streptomyces albidoflavus* ATCC 25422 показала высокие результаты при тесте с колистином и энрофлоксацином. Данный штамм не обладал устойчивостью к действию ципрофлоксацина. И ни один из четырех микроорганизмов не имел резистентность к действию тетрациклина.

Была доказана биосовместимость подобранных штаммов. С их помощью можно получать биологически ценные гидролизаты, в дальнейшем используемых в качестве высокобелковых кормовых добавок для сельскохозяйственных животных

Критерии авторства

Авторы были в равной степени вовлечены в написание рукописи и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствие конфликта интересов.

Contribution

The authors were equally involved in the writing of the manuscript and are equally responsible for any potential plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Efficient keratinase expression via promoter engineering strategies for degradation of feather wastes / J.-S. Gong, J.-P. Ye, L.-Y. Tao [et al.] // Enzyme and Microbial Technology. – 2020. – Vol. 137. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109550.

2. Abdel-Naby, M. A. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Bacillus pumilus* FH9 keratinase conjugated with activated pectin / M. A. Abdel-Naby, M. H. El-Araby, H. A. El-Refai // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – Vol. 85. – P. 238–245. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.078.

3. Combining pro-peptide engineering and multisite saturation mutagenesis to improve the catalytic potential of keratinase / C. Su, J.-S. Gong, Y.-X. Sun [et al.] // ACS Synthetic Biology. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 425–433. https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00442.

4. Biodegradation of feather waste keratin by the keratin-degrading strain *Bacillus subtilis* 8 / Z. He, R. Sun, Z. Tang [et al.] // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 28, № 2. – P. 314–322. https://doi.org/10.4014/jmb.1708.08077.

5. Bhari, R. Thermostable and halotolerant keratinase from *Bacillus aerius* NSMk2 with remarkable dehairing and laundary applications / R. Bhari, M. Kaur, R. S. Singh // Journal of Basic Microbiology. – 2019. – Vol. 59, № 6. – P. 555–568. https://doi.org/10.1002/jobm.201900001.

6. Molecular and biochemical characterization of a thermostable keratinase from *Bacillus altitudinis* RBDV1 / V. A. Pawar, A. S. Prajapati, R. C. Akhani [et al.] // 3 Biotech. – 2018. – Vol. 8, № 2. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1130-5.

7. Identification of two new keratinolytic proteases from a *Bacillus pumilus* strain using protein analysis and gene sequencing / S. Fellahi, A. Chibani, E. Feuk-Lagerstedt [et al.] // AMB Express. – 2016. – Vol. 6, № 1. https://doi.org/10.1186/s13568-016-0213-0.

8. Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates / M.-Y. Wan, G. Dong, B.-Q. Yang [et al.] // Biotechnology Letters. – 2016. – Vol. 38, № 4. – P. 643–649. https://doi.org/10.1007/s10529-015-2016-9.

9. Yang, Y. Utilizing discarded plastic bags as matrix material for composites reinforced with chicken feathers / Y. Yang, N. Reddy // Journal of Applied Polymer Science. – 2013. – Vol. 130, № 1. – P. 307–312. https://doi.org/10.1002/app.39173.

10. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1 / A. M. Abdel-Fattah, M. S. El-Gamal, S. A. Ismail [et al.] // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2018. – Vol. 16, № 2. – P. 311–318. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.005.

11. Effective biodegradation of chicken feather waste by co-cultivation of keratinase producing strains / Z. Peng, X. Mao, J. Zhang [et al.] // Microbial Cell Factories. – Vol. 2019. – Vol. 18, № 1. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1134-9.

12. Huang, M. Secretory expression and purification of *Bacillus licheniformis* keratinase in insect cells / M. Huang, R. Chen, G. Ren // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183764.

13. Пискаева, А. И. Оптимизация параметров культивирования консорциума микроорганизмов-деструкторов кератина в биотехнологических целях / А. И. Пискаева, А. Ю. Просеков // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2016. – Т. 16. – С. 53–61.

14. Научно-методические подходы к развитию технологии белковых гидролизатов для специального питания. Часть 1. Технология производства и технические характеристики гидролизатов / Ю. Я. Свириденко, Д. С. Мягконосов, Д. В. Абрамов [и др.] // Пищевая промышленность. – 2017. – № 5. – С. 48–51.

15. Пискаева, А. И. Получение высокобелковой кормовой добавки из перопуховых отходов: дис. … канд. техн. наук: 03.01.06 / Пискаева Анастасия Игоревна. – Кемерово, 2020. – 172 с.

16. Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive / M. Ramakrishna Reddy, K. Sathi Reddy, Y. Ranjita Chouhan [et al.] // Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 243. – P. 254–263. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.067.

17. Abdel-Naby, M. A. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of Keratinase from *Bacillus pumilus* FH9 / M. A. Abdel-Naby, H. A. El-Refai, M. H. A. Ibrahim [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 105. – P. 973–980. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.118.

18. Nnolim, N. E. *Bacillus* sp. FPF-1 produced keratinase with high potential for chicken feather degradation / N. E. Nnolim, A. I. Okoh, U. U. Nwodo // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 7. https://doi.org/10.3390/molecules25071505.

19. Егоров, А. М. Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам / А. М. Егоров, М. М. Уляшова, М. Ю. Рубцова // Acta Naturae. – 2018. – Т. 10, № 4 (39). – С. 33–48.

References

1. Gong J-S, Ye J-P, Tao L-Y, Su C, Qin J, Zhang Y-Y, et al. Efficient keratinase expression via promoter engineering strategies for degradation of feather wastes. Enzyme and Microbial Technology. 2020;137. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109550.

2. Abdel-Naby MA, Ibrahim MH, El-Refai HA. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Bacillus pumilus* FH9 keratinase conjugated with activated pectin. International Journal of Biological Macromolecules. 2016;85:23 –245. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.078.

3. Su C, Gong JS, Sun YX, Qin J, Zhai S, Li H, et al. Combining pro-peptide engineering and multisite saturation mutagenesis to improve the catalytic potential of keratinase. ACS Synthetic Biology. 2019;8(2):425–433. https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00442.

4. He Z, Sun R, Tang Z, Bu T, Wu Q, Li C, et al. Biodegradation of Feather waste keratin by the keratin-degrading strain *Bacillus subtilis* 8. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2018;28(2):314–322. https://doi.org/10.4014/jmb.1708.08077.

5. Bhari R, Kaur M, Singh RS. Thermostable and halotolerant keratinase from *Bacillus aerius* NSMk2 with remarkable dehairing and laundary applications. Journal of Basic Microbiology. 2019;59(6):555–568. https://doi.org/10.1002/jobm.201900001.

6. Pawar VA, Prajapati AS, Akhani RC, Patel DH, Subramanian RB. Molecular and biochemical characterization of a thermostable keratinase from *Bacillus altitudinis* RBDV1. 3 Biotech. 2018;8(2). https://doi.org/10.1007/s13205-018-1130-5.

7. Fellahi S, Chibani A, Feuk-Lagerstedt E, Taherzadeh MJ. Identification of two new keratinolytic proteases from a *Bacillus pumilus* strain using protein analysis and gene sequencing. AMB Express. 2016;6(1). https://doi.org/10.1186/s13568-016-0213-0.

8. Wan M-Y, Dong G, Yang B-Q, Feng H. Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. Biotechnology Letters. 2016;38(4):643–649. https://doi.org/10.1007/s10529-015-2016-9.

9. Yang Y, Reddy N. Utilizing discarded plastic bags as matrix material for composites reinforced with chicken feathers. Journal of applied polymer science. 2013;130(1):307–312. https://doi.org/10.1002/app.39173.

10. Abdel-Fattah AM, El-Gamal MS, Ismail SA, Emran MA, Hashem AM. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2018;16(2):311–318. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.005.

11. Peng Z, Mao X, Zhang J, Du G, Chen J. Effective biodegradation of chicken feather waste by co-cultivation of keratinase producing strains. Microbial Cell Factories. 2019;18(1). https://doi.org/10.1186/s12934-019-1134-9.

12. Huang M, Chen R, Ren G. Secretory expression and purification of *Bacillus licheniformis* keratinase in insect cells. PLoS One. 2017;12(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183764.

13. Piskaeva AI, Prosekov AYu. Optimization of cultivation parameters of the microbial consortium for recycling of feather wastes into fertilizer. The Bulletin of Irkutsk State University. Series: Biology. Ecology. 2016;16:53–61. (In Russ.).

14. Sviridenko YuYa, Myagkonosov DS, Abramov DV, Ovchinnikova EG. Theoretical and practical aspects of development technology of manufacturing protein hydrolyzates for special nutrition use. Part 1. Technology of production and technical characteristics of hydrolysates. Food Industry. 2017;(5):48–51. (In Russ.).

15. Piskaeva AI. Poluchenie vysokobelkovoy kormovoy dobavki iz peropukhovykh otkhodov [Obtaining a high-protein feed additive from feather waste]. Cand. eng. sci. diss. Kemerovo: Kemerovo State University; 2020. 172 p.

16. Ramakrishna Reddy M, Sathi Reddy K, Ranjita Chouhan Y, Bee H, Reddy G. Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive. Bioresource Technology. 2017;243:254–263. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.067.

17. Abdel-Naby MA, El-Refai HA, Ibrahim MHA. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of Keratinase from *Bacillus pumilus* FH9. International Journal of Biological Macromolecules. 2017;105:973–980. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.118.

18. Nnolim NE, Okoh AI, Nwodo UU. *Bacillus* sp. FPF-1 produced keratinase with high potential for chicken feather degradation. Molecules. 2020;25(7). https://doi.org/10.3390/molecules25071505.

19. Egorov AM, Ulyashova MM, Rubtsova MYu. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. Acta Naturae. 2018;10(4)(39):33–48. (In Russ.).

Сведения об авторах

Дмитриева Анастасия Игоревна
научный сотрудник лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (923) 606-33-73, e-mail: a_piskaeva@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-8764-4049

Алексеенко Андрей Владимирович
канд. техн. наук, научный сотрудник кафедры микробиологии, опухолевой и клеточной биологии, Каролинский институт, 17177, Швеция, г. Стокгольм, Solnavägen, 1, тел.: +46-07-07-47-2172, e-mail: andrey.alekseenko@scilifelab.se
https://orcid.org/0000-0001-8812-6481

Белова Дарья Дмитриевна
канд. техн. наук, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии и биотехнологий Института живых систем, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, тел.: +7 (951) 617-71-53, e-mail: antonina-daria@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-0630-7658

Пискаева Нина Игоревна
студент, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (951) 577-80-54, e-mail: nina-piskaeva@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-3712-6590

Терещук Любовь Васильевна
д-р техн. наук, профессор, профессор кафедры технологии продуктов питания из растительного сырья, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (3842) 39-68-51, e-mail: terechuk_l@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-0321-160X

Information about the authors

Anastasia I. Dmitrieva
Researcher of the Laboratory of Natural Nutraceuticals Biotesting, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (923) 606-33-73, e-mail: a_piskaeva@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-8764-4049

Andrey V. Alexeyenko
Cand.Sci.(Eng.), Researcher of the Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institute, 1, Solnavägen, Stockholm, 17177, Sweden, phone: +46-07-07-47-2172, e-mail: andrey.alekseenko@scilifelab.se
https://orcid.org/0000-0001-8812-6481

Daria D. Belova
Cand.Sci.(Eng.), Junior Researcher of the Laboratory of Microbiology and Biotechnology of the Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (951) 617-71-53, e-mail: antonina-daria@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-0630-7658

Nina I. Piskaeva
Student, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (951) 577-80-54, e-mail: nina-piskaeva@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-3712-6590

Lubov V. Tereshchuk
Dr.Sci.(Eng.), Professor, Professor of the Department of Food Technology from Plant Raw Materials, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-51, e-mail: terechuk_l@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-0321-160X