

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА КЕРАТИНАЗЫ

Бабич О.О.¹, Касымов С.К.², Линник А.И.¹, Митрохин П.В.¹, Кригер О.В.¹

¹ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово, Россия (650056, Кемерово, б-р Строителей, 47), e-mail: olich.43@mail.ru

²Семипалатинский государственный университет имени Шакарима, Казахстан, Семей (Семей, ул. Глинки, 20А), e-mail: samat-kasymov@mail.ru

Изучены фенотипические, биохимические и антибиотические свойства штамма, выделенного из мяса крупного рогатого скота. Установлено, что выделенные микроорганизмы являются грамположительными спорообразующими палочками и принадлежат к штамму *Bacillus licheniformis*. Показано, что микроорганизмы *Bacillus licheniformis* не обладают резистентностью по отношению к антибиотикам хлорамфениколу, стрептомицину, тетрациклину, канамицину и пенициллину, но устойчивы к лизоциму. Проанализирована кератинолитическая активность выделенного штамма. Установлено, что микроорганизмы *Bacillus licheniformis*, выделенные из мяса крупного рогатого скота, обладают высокой кератинолитической активностью. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования бактерий *Bacillus licheniformis* в качестве штамма-производителя кератиназы с высокой активностью.

Ключевые слова: кератиназа, штамм-производитель, микроорганизмы, фенотипические свойства, биохимические свойства, антибиотическая активность, резистентность.

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE STRAIN PRODUCER OF KERATINASE

Babich O.O.¹, Kasymov S.K.², Linnik A.I.¹, Mitrohin P.V.¹, Kriger O.V.¹

¹Kemerovo Technological Institute of Food Industry, Kemerovo, Russia (650056, Kemerovo, boulevard of Builders, 47), e-mail: olich.43@mail.ru

²State University named after Shakarim Semey city, Republic of Kazakhstan, Semey, (Semey, st. Glinka, 20A), e-mail: samat-kasymov@mail.ru

Phenotypic, biochemical and antibiotic properties of the strain allocated from meat of cattle are studied. It is established that microorganisms are Gram-positive sporofforming sticks and belong to *Bacillus licheniformis* strain. It is shown that microorganisms of *Bacillus licheniformis* don't possess resistance in relation to antibiotics to chloramphenicol, streptomycin, tetracycline, kanamycin and to penicillin, but are steady to lysozyme. Keratolytic activity of the allocated strain is analysed. It is established that the microorganisms of *Bacillus licheniformis* allocated from meat of cattle, possess high keratolytic activity. The received results testify to possibility of use of bacteria of *Bacillus licheniformis* as a strain producer of keratinase with high activity.

Keywords: keratinase, strain producer, microorganisms, phenotypic properties, biochemical properties, antibiotic activity, resistance.

Введение

Рост численности населения планеты и урбанизация являются причинами увеличения количества и разнообразия отходов, образуемых промышленными и сельскохозяйственными предприятиями [5]. На 2002 год количество отходов оценивалось в 12 млрд. тонн, из которых 11 млрд. тонн составляли промышленные отходы и 1,6 млрд. тонн – твердые бытовые отходы. К 2025 году аналитики предполагают увеличение количества отходов до 90 млрд. тонн [1].

Никакая другая отрасль общественного производства не связана так с использованием природных ресурсов, как сельское хозяйство. Вклад птицеводческой отрасли в производство

мяса в России составляет 1,2 млн. т в год. При этом образуется 0,4 млн. т отходов потрошения птицы, что создаёт значительную проблему для перерабатывающей отрасли [3]. Среди всех отходов потрошения птицы наибольший интерес представляет перо-пуховое сырьё, в котором содержится около 65% кормового белка (специализированный белок – кератин), поэтому решение проблемы перевода основного белка пера в усвояемую форму имеет первоочередное значение как с позиции мобилизации резервов животного белка, так и с точки зрения охраны окружающей среды [2, 4].

Важным направлением современной биотехнологии являются исследования, направленные на расширение возможностей переработки кератинсодержащего сырья с целью обеспечения экологичности производств за счет создания безотходных и малоотходных технологий при максимальном вовлечении побочных продуктов переработки в основное производство. В связи с этим актуальны исследования, направленные на использование ферментативных процессов переработки кератинсодержащего сырья, в том числе с применением штаммов-продуцентов кератинолитических ферментов [7].

Продуценты протеолитических ферментов обнаружены среди самых различных групп микроорганизмов: бактерий (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*), микромицетов (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*), актиномицетов (*Streptomyces*, *Actinomyces*) [8]. Многие широко распространённые микроорганизмы секретируют значительное количество протеолитических биокатализаторов в окружающую среду, что значительно облегчает задачу их выделения и очистки. Возможность управления образованием ферментов за счёт подбора соответствующей питательной среды и условий культивирования позволяет не только увеличить выход ферментов, но и получать ферментные препараты с определёнными свойствами. Методы селекции и генной инженерии значительно увеличивают возможности целенаправленного биосинтеза ферментов. Существенна способность микроорганизмов вырабатывать ферменты, уникальные по своей субстратной специфичности (кератиназы, коллагеназы, эластазы) [6].

В целом следует отметить, что, несмотря на распространение протеолитических ферментов в природе и высокие объёмы их производства в промышленности, протеолитические ферменты с кератиназным действием требуют более детального изучения [10].

Считается что, среди микроорганизмов только патогенные грибы (дерматофиты) и отдельные виды бактерий и актиномицетов обладают способностью вырабатывать внеклеточные ферменты, разрушающие белки кератинов [11].

Известно, что кератинрасщепляющие микроорганизмы могут быть выделены из природных субстратов (почвы, водоемов) и из тела животных. Такие организмы были найдены среди

разных штаммов *Streptomyces rimosus*, *S. griseus*, *S. roseochromogenes*, *S. praecox*, *S. parvus*, *S. scabies*, *S. griseoluteus*, *Nocardia rubra*, *S. microflavus*, *S. globisporus vulgaris* [9].

Даная работа направлена на идентификацию штамма-продуцента кератиназы, выделенного из мяса крупного рогатого скота, и анализ его биохимических свойств.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования являлся штамм микроорганизмов, выделенный из мяса крупного рогатого скота.

С целью определения видовой принадлежности штамма использовали основные фенотипические характеристики. Фенотипические свойства изучали визуальным методом и методом микроскопирования. Анализировали форму, размер клеток, характер контура края колоний, рельеф, поверхность, цвет и структуру колоний, консистенцию.

Посев штаммов осуществляли на плотную питательную среду состава (г/л дистиллированной воды): панкреатический гидролизат рыбной муки – 12, пептон ферментативный - 12; натрия хлорид - 6; агар микробиологический. Оптимальная температура культивирования 37°С, рН среды 7,1-7,5.

Описание изучаемого штамма бактерий осуществляли в соответствии со стандартной методикой, руководствуясь правилами «Международного кодекса ботанической номенклатуры».

Для изучения биохимических свойств штамма использовали стандартизированные тест-системы API 50 CHB с программным обеспечением идентификации Apiweb производства BioMerieux (Франция). Данная тест-система включает 50 биохимических тестов по изучению углеводного обмена микроорганизмов и предназначена для идентификации бацилл, энтеробактерий и вибрионов.

Устойчивость штамма к антибиотикам определяли диффузионным методом с использованием дисков с антибиотиками. На поверхность агара в чашке Петри наносили бактериальную суспензию определенной плотности и затем помещали диски, содержащие определенное количество антибиотика. Диффузия антибиотика в агар приводила к формированию зоны подавления роста микроорганизма вокруг дисков. После инкубации чашек в термостате при температуре 35°С -37°С в течение 12 ч учитывали результат путем измерения диаметра зоны вокруг диска в миллиметрах. Определяли устойчивость к следующим антибиотикам: хлорамфеникол, стрептомицин, тетрациклин, канамицин, пенициллин, лизоцим.

Кератиназную активность штамма определяли спектрофотометрическим методом, измеряя оптическую плотность культуральной жидкости при 340 нм. По калибровочной кривой,

построенной по растворам сывороточного альбумина, определяли количество расщепленного белка ($\text{мкг}/\text{см}^3$) культуральной жидкости за 1 час гидролиза.

Удельная активность фермента представляет собой число единиц активности, отнесенное к 1 мг белка в ферментном препарате.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате анализа фенотипических свойств установлено, что бактерии образуют плоские, круглые, рельефные, шероховатые колонии неправильной формы с волнистыми краями телесного цвета. Консистенция колоний сухая, плотная с белым зернистым налетом, легко снимается с агара. Грамположительные бактерии размером $1,7-3 \times 4,0-0,6$ мкм при выращивании на питательной среде имеют вид толстых, больших палочек, иногда расположенных в цепочках. Палочки подвижны за счет перитрихальных жгутиков. Культура образует эллипсоидные или цилиндрические споры размером $1,0-1,5 \times 0,6-0,9$ мкм.

Форму и размер клеток определяли на разных временных и температурных участках. Первое измерение для определения размера клеток проводили при температуре 37°C на вторые сутки. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика фенотипических свойств выделенного штамма

Размер	$1,7-3 \times 4,0-0,6$ мкм
Форма	Палочкообразная, споры эллипсоидные или цилиндрические
Характер контура края	Волнистые, неправильной формы
Рельеф	Рельефные
Поверхность	Шероховатые
Цвет	Поверхность телесного цвета
Структура	Узорчатая, зернистая
Консистенция	Колония сухая, плотная с белым зернистым налетом, легко снимается с агара

Данные представленным в таблице 1, свидетельствуют о том что, микроорганизмы, полученные из мяса крупного рогатого скота, близки по фенотипическим показателям к бактериям рода *Bacillus*.

Результаты изучения биохимических свойств выделенного штамма представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты биохимического тестирования микроорганизмов рода *Bacillus*

№	Название	Результаты теста штамма	№	Название	Результаты теста штамма
1	Глицерол	+	26	Салицин	+
2	Эритрит	-	27	Целлобиоза	+
3	D-арабиноза	-	28	Мальтоза	+
4	L-арабиноза	+	29	Лактоза	-

5	Рибоза	+	30	Мелибиоза	–
6	D-ксилоза	+	31	Сахароза	+
7	L-ксилоза	–	32	Трегалоза	+
8	Рибит	–	33	Инулин	–
9	β -метил-ксилозид	–	34	Мелицитоза	–
10	Галактоза	–	35	D-рафиноза	–
11	D-глюкоза	+	36	Крахмал	+
12	D-фруктоза	+	37	Гликоген	+
13	D-манноза	+	38	Ксилит	–
14	L-сорбоза	–	39	β -генцибиоза	–
15	Рамноза	–	40	D-тураноза	–
16	Галактит	–	41	D-ликсоза	–
17	Инозитол	+	42	D-тагатога	+
18	Манитол	+	43	D-фукоза	–
19	Сорбитол	+	44	L-фукоза	–
20	α -метил-D-манозид	–	45	D-арабит	–
21	α -метил-D-глюкозид	+	46	L-арабит	–
22	N-ацетил-глюкозамин	–	47	Глюконат	–
23	Амигдалин	+	48	2-кето-глюконат	–
24	Арбутин	+	49	5-кето-глюконат	–
25	Эскулин	+	50	Контроль	–

Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что грамположительные палочки ферментируют: глицерол, L-арабинозу, рибозу, D-ксилозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, инозитол (циклогексан-1,2,3,4,5,6-гексол), маннитол, сорбитол (глюцит), α -метил-D-маннозид, амигдалин, арбутин (бета-D-глюкопиранозид), эскулин, салицин. Штамм бактерий обладает способностью вырабатывать целлобиозу (4-(β -глюкозидо)-глюкоза), мальтозу, сахарозу, трегалозу, крахмал, гликоген, туранозу. Данные биохимические характеристики соответствуют виду *Bacillus licheniformis* на 98%, а тест на вид *Bacillus subtilis* показал принадлежность к таксону данного микроорганизма на 1,1%.

Таким образом, стандартизированные тест-системы API 50 CH и API 20 позволили провести комплекс биохимических исследований и за короткий промежуток времени (24 часа) определить видовую принадлежность грамположительных палочек рода *Bacillus*, выделенных из говяжьего мяса.

Изучали резистентность выделенного штамма к антибиотикам. Истинная природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика или недоступности мишени вследствие первично низкой проницаемости либо ферментативной инактивации. Природная резистентность к антибиотикам является постоянным видовым признаком микроорганизмов и легко прогнозируется. В связи с этим

установление резистентности микроорганизмов является актуальным, так как позволяет упростить работы со штаммом в производственных масштабах.

Результаты анализа устойчивости штамма к антибиотикам представлены на рисунке 1 в таблице 3.

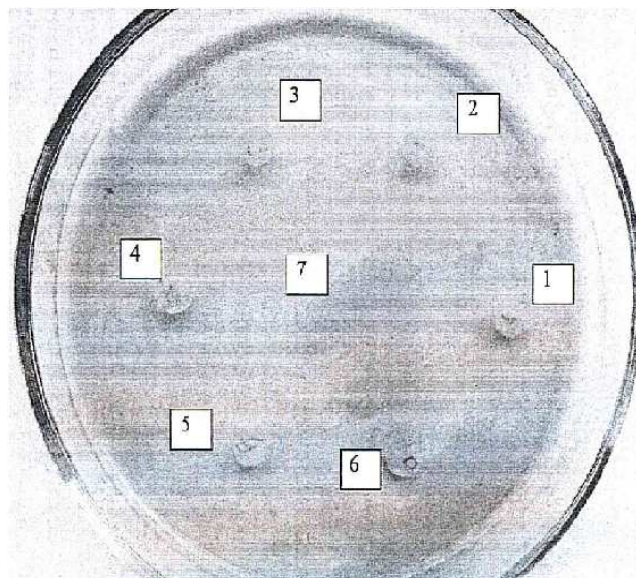


Рисунок 1. Антибиотическая устойчивость штамма *Bacillus licheniformis*: 1 – хлорамфеникол, 2 – стрептомицин, 3 – тетрациклин, 4 – канамицин, 5 – пенициллин, 6 – лизоцим, 7 – контроль

Таблица 3

Показатели антибиотической устойчивости *Bacillus licheniformis*

№	Наименование антибиотика	Концентрация антибиотика, %	Зона ингибирования роста бактерий, R, см
1	Хлорамфеникол	0,4	1,5
2	Стрептомицин	0,4	1,3
3	Тетрациклин	0,4	2,5
4	Канамицин	0,4	2,2
5	Пенициллин	0,4	1,7
6	Лизоцим	0,4	0,3
7	Контроль	0	-

Из представленных данных (рисунок 1, таблица 3) следует, что микроорганизмы не обладают природной устойчивостью к пяти изученным антибиотикам (хлорамфеникол, стрептомицин, тетрациклин, канамицин, пенициллин), так как радиус зоны ингибирования составляет от 1,3 до 2,5 см. Однако микроорганизмы проявляют переменную устойчивость к антибиотику лизоцим. Так, на третьи сутки зона ингибирования составляет 0,3 см, а на седьмые сутки полностью исчезает и культура свободно растет на плашке с лизоцимом. Таким образом, штамм *Bacillus licheniformis* обладает устойчивостью к лизоциму, который

на ранних стадиях развития культуры снижает скорость развития, но не ингибирует данный штамм.

Из литературных источников известно, что штамм *Bacillus licheniformis* является продуцентом фермента с кератинолитическим действием, избирательно расщепляющего кератин перьев и практически не действующего на кератин шерсти животных.

В связи с этим исследовали кератинолитическую активность выделенного штамма при оптимальной температуре 37°C (рисунок 2).

Из рисунка 2 следует, что штамм, выделенный из мяса крупного рогатого скота обладает высокой кератинолитической активностью, величина которой увеличивается с ростом продолжительности культивирования. Так, при продолжительности культивирования 2 ч активность равна 2,3 ед/мл, в то время как при продолжительности культивирования 24 ч – 5,0 ед/мл.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования штамма *Bacillus licheniformis* в качестве источника кератиназы с высокой активностью.

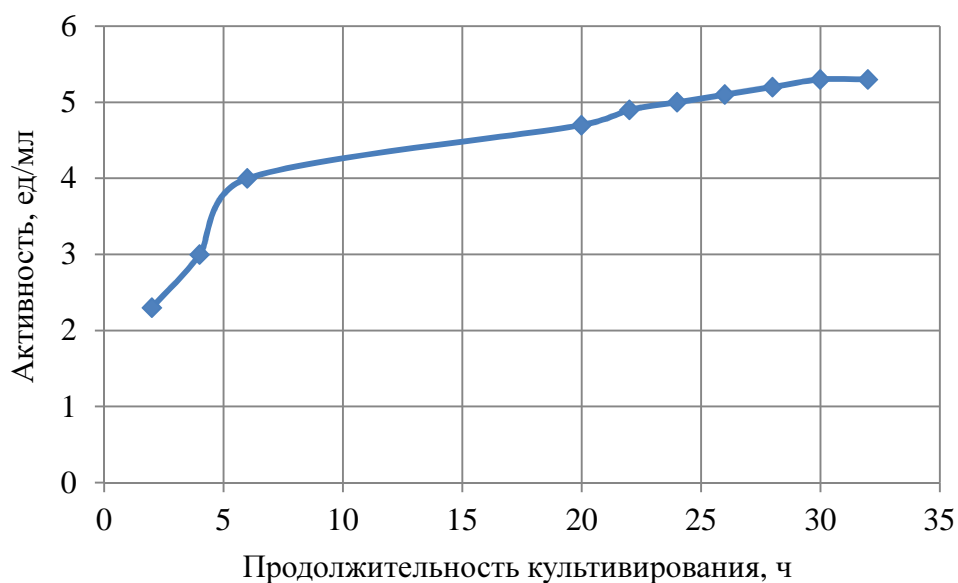


Рисунок 2. Кератинолитическая активность выделенного штамма в зависимости от продолжительности культивирования

Заключение

Изучены фенотипические свойства штамма, выделенного из мяса крупного рогатого скота. В результате анализа фенотипических свойств установлено, что выделенные микроорганизмы являются грамположительными палочками, образующими споры, и принадлежат к роду *Bacillus*. Проанализированы биохимические свойства изучаемого штамма, на основании которых выявлено, что микроорганизмы на 98% соответствуют виду *Bacillus licheniformis*.

Изучена резистентность выделенного штамма *Bacillus licheniformis* к антибиотикам. Показано, что микроорганизмы не обладают антибиотическим действием по отношению к хлорамфениколу, стрептомицину, тетрациклину, канамицину и пенициллину, но устойчивы к лизоциму. Исследована кератинолитическая активность выделенного штамма. Установлено, что *Bacillus licheniformis*, выделенный из мяса крупного рогатого скота, обладает высокой кератинолитической активностью. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования штамма *Bacillus licheniformis* в качестве источника кератиназы с высокой активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований, конкурс «мол_ин_пр», договор № НР 13-08-90902/13.

Список литературы

1. Вторичные сырьевые ресурсы пищевой и перерабатывающей промышленности АПК России и охрана окружающей среды. Справочник / под общ. ред. акад. РАСХН Е.И. Сизенко.- М.: Пищепромиздат, 1999.
2. Казюлин Г.П. Использование малоценного сырья при производстве рубленых полуфабрикатов / Г.П. Казюлин, В.В. Хорольский, С.В. Исаичкин // Мясная индустрия. 2001.- №1.- С. 18-19.
3. Каспарьянц С.А. Использование белоксодержащего сырья и его отходов // Аграрная наука.- 2000.- № 4.- С. 19-20.
4. Комаров В.И. Проблемы использования вторичных сырьевых ресурсов отраслей пищевой и перерабатывающей промышленности и их влияние на окружающую среду / В.И. Комаров, Е.И. Лебедев, Т.А. Мануйлова // Хранение и переработка сельхозсырья.- 1998.- №2.- С. 6-10.
5. Миленьева И.С. Изучение критериев качества и безопасности функциональных продуктов питания, полученных из вторичных продуктов переработки растительного сырья / И.С. Миленьева, О.О. Бабич, Л.А. Остроумов // Современные наукоемкие технологии.- 2012.- №12.- С. 24-27.
6. Миленьева И.С. Ферментативный гидролиз кератинсодержащего сырья / И.С. Миленьева, Л.А. Остроумов, О.О. Бабич, А.Ю. Полетаев // Вестник ВСГТУ.- 2011.- №3(34).- С. 95-98.
7. Полетаев А.Ю. Переработка вторичного кератинсодержащего сырья и получение белковых гидролизатов на пищевые и кормовые цели / А.Ю. Полетаев, И.С. Миленьева, О.О. Бабич, А.И. Морозова // Техника и технология пищевых производств.- 2011.- №2.- С.7-12.

8. Полетаев А.Ю. Разработка технологии переработки кератинсодержащего сырья с использованием *Streptomyces ornatus* S-1220: автореф. дис. канд. техн. наук.- Кемерово, 2011.- 18 с.
9. Bressollier P. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus* / P. Bressollier, F. Letourneau, M. Urdaci, B. Verneuil // *Appl. Environ. Microbiol.*- 1999.- vol. 65.- №6.- P. 2570-2576.
10. Cai C.-G. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain / C.-G. Cai, J.-S. Chen, J.-J. Qi, Y. Yin, X.-D. Zheng // *J Zhejiang Univ Sci B.*- 2008.- №9(9).- P. 713–720.
11. Nayaka S. Occurrence and extracellular enzyme potential of Actinomycetes of a thermotolerant, northern region of Karnataka, India / S. Nayaka, G.M. Vidyasagar // *International Multidisciplinary Research Journal.*- 2012.- №2(12).- P. 40-44.

Рецензенты:

Просеков А.Ю., д.т.н., профессор, заведующий кафедрой «Бионанотехнология», ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», г. Кемерово.

Сидорин Ю.Ю., д.ф.-м.н., доцент, профессор-консультант Научно-образовательного центра, ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», г. Кемерово.