

**Кормовые растения и добавки**

УДК 636.087.8:573.6.086.83:577.15

doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1274rus

**ПРОТЕИНАЗА БАЦИЛЛ НА ОСНОВЕ ГЕННОЙ КОНСТРУКЦИИ  
КАК КОРМОВАЯ ДОБАВКА ДЛЯ ПТИЦЕВОДСТВА\*****А.О. КОРЯГИНА, Н.Л. РУДАКОВА, М.Т. ЛУТФУЛЛИН, Г.Ф. ХАДИЕВА,  
А.А. ТОЙМЕНЦЕВА, А.М. МАРДАНОВА, М.Р. ШАРИПОВА**

Усвояемость питательных пищевых веществ рациона и, как следствие, его удешевление определяются не только составом и активностью ферментов в организме, но и кормовыми ферментными добавками. Применение бактериальных ферментов, в частности протеиназ, в качестве биодобавок в птицеводстве активно развивается. Расщепляя белки, протеиназы повышают их доступность (как следствие, экономятся средства на приобретение синтетических аминокислот) и снижают негативный эффект ингибиторов пищеварения. Биотехнологии получения ферментов основаны на применении бактерий или микроскопических грибов, при этом для увеличения выхода и направленного воздействия на свойства продукта используются методы генной инженерии. Бактериальные сериновые протеиназы обладают высокой термостабильностью и устойчивы к ингибиторам животного происхождения. В настоящем сообщении мы впервые представляем данные о получении высокоочищенной секретрируемой субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus pumilus* при экспрессии рекомбинантного вектора в штаммах *B. subtilis* и приводим основные физико-химические и биологические характеристики синтезируемого продукта. Цель нашего исследования — получение с использованием экспрессионной системы высокоочищенной субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B. pumilus* как перспективной кормовой добавки для птицеводства. Показано, что у полученной сериновой протеиназы субстратная специфичность по глубине осуществляемого гидролиза соответствует таковой у субтилизинов, фермент расщепляет связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот лейцина, фенилаланина и тирозина, а также ряда гидрофильных аминокислот. Исследование влияния температуры и pH на активность этой сериновой протеиназы показало, что в присутствии ионов кальция в конечной концентрации 5 мМ температурный оптимум фермента достигает 50 °С. Фермент сохранял стабильность в интервале pH от 7 до 10. При определении активности рекомбинантной протеиназы при значениях pH, имитирующих условия желудочно-кишечного тракта кур, оказалось, что в слабощелочной среде (pH 5,5, зоб) активность сохраняется полностью (100 %), при pH 2,9 (желудок) активность фермента снизилась на 40 %, а при переходе снова в щелочные условия pH 6,5-8,0 (тонкий и толстый кишечник) активность фермента восстанавливалась и возрастала относительно контроля на 13 %. Таким образом, фермент способен оставаться в активном состоянии на всем протяжении пищеварительного тракта. Активность протеиназы не подавлялась природными ингибиторами, например, ингибитором трипсина, что позволяет ферменту функционировать в желудочно-кишечном тракте кур. При воздействии куриной желчи в концентрациях от 0,01 % до 0,05 % в течение 1 ч при 40 °С активность микробной протеиназы полностью сохранялась, а при увеличении концентрации куриной желчи до 1 % наблюдали снижение активности фермента на 10 %. Токсичность протеиназы оценили на 1-суточных цыплятах-бройлерах кросса Cobb 500 при наблюдении в течении 10 сут. Бактериальная протеиназа в дозе 100 ЕУ/кг корма не обладала токсичностью, физиологические показатели птицы оставались в норме. Нами установлено, что на ранних стадиях выращивания цыплят (0-10 сут) эффективно добавление протеиназы в комбикорм Старт в дозе 5 ЕУ/кг корма. На поздних стадиях роста птицы (21-42 сут) при использовании комбикорма Финишер эффективно повышение дозы бактериальной протеиназы до 15 ЕУ/кг. В обоих случаях добавление протеиназы позволяет повысить прирост биомассы птицы (соответственно на 13,9 % и 7,9 %), а также улучшает конверсию корма (на 14 % и 8,5 %). Таким образом, количество вносимого фермента необходимо корректировать в зависимости от возраста птицы и состава комбикорма. Основные показатели развития цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 при применении рекомбинантной протеиназы позволяют сделать заключение о ее перспективности в качестве кормовой добавки.

**Ключевые слова:** *Bacillus pumilus*, рекомбинантная субтилизиноподобная сериновая протеиназа, субстратная специфичность, стабильность, активность, влияние pH и температуры, кормовая добавка, цыплята-бройлеры, Cobb 500.

Получение экономической выгоды от более полного усвоения зерновых кормов за счет повышения усвояемости питательных веществ оста-

\* Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РНФ № 16-16-04062.

ется актуальной проблемой в птицеводстве (1-5). Задача может быть решена с помощью комплекса ферментов, включая бациллярные протеиназы. Протеиназы повышают переваримость белковых компонентов, необходимых для роста бройлеров, а также разрушают связи между белками, крахмалом или клетчаткой, что положительно влияет на усвояемость крахмала, повышая его биодоступность (6-10). Применение микробных протеаз также позволяет улучшить усвояемость кормов с высоким содержанием некрахмалистых полисахаридов (11-13). Введение в рацион кур-несушек мультиферментных комплексов (протеаза/ $\beta$ -клюканаза/пектиназа) приводило к увеличению живой массы птицы, повышению массы яйца и образованию более темного желтка, а также положительно влияло на органы пищеварения (14). Кроме того, введение экзогенных протеиназ в корма повышает переваримость питательных веществ вследствие воздействия на антипитательные факторы рациона, например за счет деструкции ингибиторов трипсина и лектинов в соевом шроте (15, 16). Экзогенные протеазы служат профилактическим средством, снижая количество непереваренного белка, который служит фактором колонизации кишечника патогенными микроорганизмами, приводя к развитию кокцидиоза и некротического энтерита у цыплят (17, 18). Установлена роль непереваренного белка в развитии дисбактериоза, вызывающего некротический энтерит (19, 20). Добавление протеазы улучшало продуктивность бройлеров, инфицированных *Eimeria* spp. (каузативный агент некротического энтерита) (21). Комплексные препараты живых бактерий или спор в комбинации с экзогенными протеазами оказывают на цыплят ростостимулирующее и профилактическое действие (22, 23)

Поиск новых продуцентов и получение эффективных рекомбинантных микробных ферментов, применяемых в качестве кормовых добавок, — важная биотехнологическая задача (24-26). Для получения кормовых добавок на основе микробных протеиназ в необходимом количестве разрабатывают эффективные экспрессионные системы (27). Недорогие компоненты сред для культивирования бацилл, а также безопасный статус этих микроорганизмов определяют перспективность их использования в птицеводстве.

В настоящем сообщении мы впервые представляем данные о получении высокоочищенной секретируемой субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus pumilus* при экспрессии рекомбинантных векторов в штаммах *B. subtilis* и приводим основные физико-химические и биологические характеристики рекомбинантного продукта, определяющие перспективность его применения в качестве кормовой добавки.

Цель нашего исследования — получение с использованием экспрессионной системы высокоочищенной субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus pumilus* как кормовой добавки для птицеводства.

**Методика.** В работе использовали штаммы и плазмиды из музея лаборатории микробных биотехнологий Казанского федерального университета: природный изолят *B. pumilus* 7P, его стрептомициноустойчивый мутант *B. pumilus* 7P/3-19, плазмиды pCS9 с геном субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* (предоставлена С.В. Костровым, Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва), pGP382 (предоставлена Dr Prof. T. Mascher, Ludwig-Maximilians-Universität München, Германия). В качестве реципиента использовали протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BG 2036 (любезно предоставлен Prof. E. Ferrarri, «Genencor Int., Inc.», США). Рекомбинантными векторами pTN 3036 (pLIKE-реп + *aprBp*), pTN 3050 (pLIKE-реп + SP<sub>Рac</sub> + *aprBp*), pTN 3093 (pLIKE-реп + SP<sub>Yngk</sub> + *aprBp*) и pTN 3801 (pGP382 + *aprBp*) трансформировали клетки протеазодефицитного штамма

*B. subtilis* BG 2036, в результате получили штаммы соответственно *B. subtilis* MRB044, *B. subtilis* MRB045, *B. subtilis* MRB046 и *B. subtilis* MRB072.

Штаммы выращивали в среде следующего состава (г/л): пептон бактериологический («Sigma», США) — 20, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O — 0,6, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0,5, NaCl — 3, MnSO<sub>4</sub> — 0,1, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0,2, NH<sub>4</sub>Cl — 0,2. Штаммы *B. subtilis*, содержащие рекомбинантные конструкции, культивировали с добавлением эритромицина и линкомицина (соответственно 10 и 25 мкг/мкл), рекомбинантный штамм *B. subtilis* pCS9 — с добавлением эритромицина (20 мкг/мкл). Продуктивность синтеза субтилизиноподобной протеиназы оценивали отношением протеолитической активности к величине биомассы и выражали в условных единицах.

Активность протеиназы определяли по гидролизу азоказеина («Sigma», США) согласно описанию (28, 29). За единицу активности (EU) принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин. Специфичность протеиназы изучали по действию на β-цепь окисленного инсулина овцы (30). Измерения проводили на спектрофотометре xMark («Bio-Rad», США).

Для накопления протеиназы использовали биореактор (Biotron LiFlus SP30L («Biotron, Inc.», Корея). В реактор помещали 15 л среды, которую стерилизовали 30 мин при 121 °С, pH среды доводился до pH 8,5 автоматически и поддерживался добавлением 2 н. NaOH через перистальтическую систему биореактора. В ферментер вносили 300 мл 16-часовой культуры (2 % от объема среды, OD<sub>600</sub> инокулята — 3 опт. ед.), антибиотик эритромицин (до конечной концентрации 10 мкг/мл) и пеногаситель Софэксил 1250 («Софэкс», г. Москва). Культивирование проводили в течение 24 ч при 37 °С с постоянной аэрацией при скорости потока 10 л/мин (содержание O<sub>2</sub> не ниже 20 %) и постоянном перемешивании (150-900 об/мин). К 24 ч роста культуры, когда активность фермента достигала максимума (4,4 ед/мл, OD<sub>600</sub> — 6 опт. ед.) клетки удаляли центрифугированием (5000 об/мин, 15 мин, Beckman Avanti JXN-26, «Beckman Coulter, Inc.», США). Очистку протеиназы проводили на колонке с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) («Sigma», США). Супернатант, полученный после центрифугирования, разводили в 10 раз дистиллированной водой, доводили pH до 6,3 и смешивали с КМЦ, уравновешенной 0,02 М Na-ацетатным буфером (pH 6,3). Смесь выдерживали в течение 90 мин при постоянном перемешивании для сорбции фермента. Затем КМЦ осаждали, удаляли надосадочную жидкость и помещали сорбент на колонку. Колонку промывали тем же буфером, элюировали белок 0,2 М Na-ацетатным буфером, pH 6,3 и измеряли активность фермента в полученных фракциях.

Молекулярную массу продуцируемой протеиназы определяли с помощью SDS-электрофореза (31).

Физико-химические свойства полученного препарата протеиназы оценивали по температурному оптимуму в присутствии и в отсутствие ионов кальция (5 mM CaCl<sub>2</sub>). Для изучения термостабильности растворы ферментов в 0,05 М Трис-HCl буфере (pH 7,2) инкубировали при температурах от 0 до 70 °С в течение 30 мин, затем определяли активность при 37 °С, как описано выше. Для оценки pH-оптимума определяли активность фермента в 0,05 М Трис-HCl буфере. При изучении pH-стабильности инкубировали растворы белков в 0,05 М Трис-HCl буфере в течение 1 ч при 25 °С, далее добавляли раствор азоказеина и определяли активность при 37 °С согласно приведенному выше описанию.

Влияние ингибиторов на протеиназу изучали с использованием фенолметилсульфонилфторида (PMSF), этилендиаминтетрауксусной кис-

лоты (EDTA), о-фенантролина (специфический ингибитор металлопротеиназ) и овомукоида (ингибитор трипсина). Раствор белка инкубировали с ингибитором в течение 1 ч при 37 °С в Трис-НСl буфере (рН 7,2) и определяли протеолитическую активность, как описано выше.

Для имитации условий желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) кур использовали универсальный буфер Бриттона-Робинсона (32). Готовили серию из четырех аликвот универсального буфера (0,04 М) с разными значениями рН (2,9; 5,5; 6,0; 6,3 и 8,0). Фермент переносили из одного раствора в другой методом последовательных разведений и выдерживали в каждом из растворов соответствующее время; итоговое разведение фермента — в 200 раз. Последовательность аликвот соответствовала последовательности отделов ЖКТ кур: рН 5,5 (50 мин) — модель «зоб»; рН 2,9 (90 мин) — модель «желудок»; рН 6,5 (30 мин) — модель «тонкий кишечник», рН 8 (70 мин) — модель «толстый кишечник». На протяжении всего эксперимента температура буфера составляла 40 °С.

Желчь, полученную от цыплят-бройлеров 10-суточного возраста, разводили 0,02 М Na-ацетатным буфером (рН 6,3). Пробы с содержанием желчи в ферментном растворе от 0,01 % до 5 % выдерживали при 40 °С в течение 60 мин. Каждые 15 мин отбирали пробы для измерения активности. В качестве контроля использовали раствор фермента в 0,02 М Na-ацетатном буфере (рН 6,3) без желчи. Контрольный раствор фермента выдерживали при 40 °С в течение 1 ч и определяли активность протеиназы.

Свойства протеиназы как кормовой добавки изучали в условиях крестьянско-фермерского хозяйства (дер. Среднее Азяково, Медведевский р-н, Республика Марий Эл). Для опыта отобрали 1-суточных цыплят кросса Cobb 500 (225 гол.) со средней живой массой  $0,049 \pm 0,003$  кг, из которых сформировали контрольную группу (75 гол.), получавшую в рационах стандартный комбикорм, и две опытные группы (по 75 гол.), где в комбикорм птице добавляли рекомбинантную протеиназу в дозе 5 ЕУ/кг (I группа) или 15 ЕУ/кг (II группа). Продолжительность опыта составила 42 сут. Цыплята в возрасте 0–10 сут получали комбикорм Старт, 11–20 сут — Рост, 21–42 сут — Финишер в соответствии с технологиями выращивания (ООО «Алгоритм инвестиций», г. Йошкар-Ола, Республика Марий Эл). Ферментный раствор вносили в сухой корм опрыскиванием пульверизатором при постоянном перемешивании. Цыплят содержали в вентилируемых клеточных батареях при температуре 35–36 °С. Прирост массы у цыплят оценивали от начального до заключительного дня эксперимента ежедневно. Количество потребляемого корма пересчитывали на одного цыпленка. Коэффициент конверсии корма вычисляли, как отношение количества потребленного корма к приросту живой массы.

Токсичность препарата протеиназы исследовали на 1-суточных цыплятах кросса Cobb 500 массой  $0,047 \pm 0,001$  кг, из которых сформировали контрольную группу (15 гол.), получавшую только комбикорм, и опытную группу (15 гол.), где птице в комбикорм добавляли протеиназу (100 ЕУ/кг корма) в течение 10 сут. В период опыта учитывали массу цыплят, наблюдали за их поведением, состоянием помета. Через 10 сут из каждой группы случайным образом отобрали по 3 цыпленка, которых усыпляли ингаляционным наркозом с помощью хлороформа для исследования состояния внутренних органов.

Статистическая обработка результатов включала расчет среднего значения ( $M$ ) и стандартные ошибки среднего ( $\pm SEM$ ). Достоверность различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Мы сравнили экспрессию субтилизиноподобной внеклеточной сериновой протеиназы *B. pumilus* в природных и рекомбинантных штаммах. Штамм дикого типа *B. pumilus* 7P — природный изолят, который выделили по признаку повышенной продукции внеклеточной рибонуклеазы и других ферментов, включая протеиназу, *B. pumilus* 7P/3-19 — его стрептомицинустойчивый мутант. Мы получили рекомбинантный штамм *B. subtilis* pCS9, который несет мультикопийную плазмиду pCS9, содержащую ген протеиназы *B. pumilus* (*aprBp*) с собственным сигнальным пептидом под контролем собственного промотора. Для клонирования гена *aprBp* также использовали оптимизированную LIKE-систему экспрессии на основе промотора *liaI* *B. subtilis*, который регулируется двухкомпонентной индуцируемой антибиотиком системой LiaRS (33, 34). В составе вектора pLIKE-геп в штамм *B. subtilis* MRB044 ввели ген *aprBp* с собственным сигнальным пептидом (pTN 3036 — pLIKE-геп + *aprBp*), в штамм *B. subtilis* MRB045 — с нуклеотидной последовательностью сигнального пептида гена пенициллинамидазы (пенициллинамидогидролаза, КФ 3.5.1.11) *B. megaterium* (pTN 3050 — pLIKE-геп + SP<sub>pac</sub> + *aprBp*), в штамм *B. subtilis* MRB046 — с последовательностью рекомбинантного сигнального пептида гена гликозидгидролазы (КФ 3.2.1.-) *B. megaterium* (pTN 3093 (pLIKE-геп + SP<sub>Yngk</sub> + *aprBp*). Для клонирования гена *aprBp* также использовали вектор экспрессии pGP382 с сильным конститутивным промотором (P<sub>DegQ</sub>) (35). Ген *degQ* кодирует белок (46 а.о.), участвующий в фосфорилировании двухкомпонентной системы DegS/DegU, контролирующей синтез протеиназ (36). Штамм *B. subtilis* MRB072 содержал плазмиду pGP382 (pTN 3801 — pGP382 + *aprBp*) с геном *aprBp* и Стр меткой в составе вектора для аффинной очистки белка. Сравнение экспрессии показало, что наиболее эффективным продуцентом протеиназы был штамм *B. subtilis* pCS9 (табл. 1), который использовали для продолжения экспериментов.

### 1. Протеолитическая активность в культуральной жидкости исследуемых природных изолятов *Bacillus* и рекомбинантных штаммов с геном субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B. pumilus aprBp* в различных конструкциях (n = 10)

Штамм	Активность, EU	Продуктивность, усл. ед
<i>B. pumilus</i> 7P	1,50±0,02	0,50±0,01*
<i>B. pumilus</i> 7P/3-19	2,90±0,01	0,93±0,02*
<i>B. subtilis</i> pCS9	3,50±0,01	1,14±0,02*
<i>B. subtilis</i> MRB044	0,25±0,05	0,10±0,01
<i>B. subtilis</i> MRB045	0,30±0,02	0,12±0,02
<i>B. subtilis</i> MRB046	0,42±0,03	0,17±0,02*
<i>B. subtilis</i> MRB072	0,50±0,01	0,20±0,04

\* Различия с контролем статистически значимы при p < 0,05.

### 2. Очистка рекомбинантной субтилизиноподобной протеиназы, экспрессируемой в штамме *Bacillus subtilis* pCS9 с геном *aprBp* *B. pumilus* в плазмиде pCS9 (n = 5)

Стадия очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Активность			Степень очистки	Выход, %
			EU/мл	всего, EU	удельная, EU/мг		
Культуральная жидкость	12800	870±20*	4,4±0,07*	56320 <sup>a</sup>	0,005	1,0	100
Ионообменная хроматография на карбоксиметилцеллюлозе	470	383±10*	33,8±0,1*	15886 <sup>a</sup>	0,088	17,6	28,2

П и м е ч а н и е. <sup>a</sup> — средние значения активности.

\* Различия с контролем статистически значимы при p < 0,05.

После культивирования *B. subtilis* pCS9 в биореакторе и очистке протеиназы ее фракции с высокой активностью, полученные при хроматографическом разделении продукта экспрессии, объединили и получили пре-

парат с суммарной активностью 15886 EU (табл. 2). Анализ методом SDS-электрофореза подтвердил наличие белка с молекулярной массой 28 кДа. Таким образом, с помощью хроматографии на КМЦ был получен высокоочищенный препарат рекомбинантной субтилизиноподобной протеиназы в 0,2 М Na-ацетатном буфере (рН 6,3). Так как компоненты буферной смеси нетоксичны для кур, их присутствие в растворе фермента не служило препятствием для использования в экспериментах с птицей.

Температурный оптимум рекомбинантного фермента составил 37 °С (рис. 1, А). Для практического использования важно, что в присутствии ионов кальция в конечной концентрации 5 мМ температурный оптимум фермента повышался до 50 °С. При этом активность фермента увеличивалась в среднем на 40 % при 50 °С и на 60 % — при 55 °С (см. рис. 1, Б). Протеиназа оставалась стабильной в интервале температуры от 0 до 40 °С.

Оптимум кислотности для протеиназы приходился на рН 9,5. Протеиназа сохраняла стабильность в интервале рН 7-10. При рН 3 и рН 11 падение активности не превышало 40 % (см. рис. 1, В). Данные по терм- и рН-стабильности белка свидетельствуют о возможности его применения в качестве кормовой добавки. При разведении аликвоты фермента раствором специфического ингибитора сериновых протеиназ PMSF (1:1000) энзиматическая активность полностью подавлялась, в присутствии ингибиторов металлопротеиназ EDTA и о-фенантролина (соотношение 1:100) — не изменялась. Эти данные свидетельствовали о принадлежности фермента к классу сериновых протеиназ. Активность протеиназы не подавлял ингибитор трипсина, на основании чего мы предположили, что рекомбинантный фермент будет способен функционировать в ЖКТ кур.

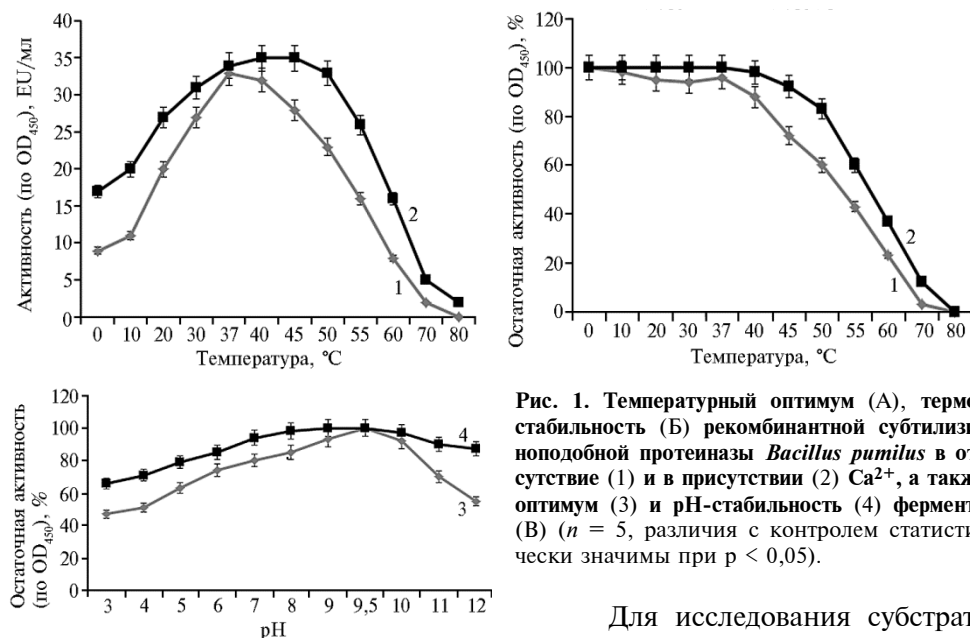


Рис. 1. Температурный оптимум (А), термостабильность (Б) рекомбинантной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* в отсутствие (1) и в присутствии (2) Ca<sup>2+</sup>, а также оптимум (3) и рН-стабильность (4) фермента (В) ( $n = 5$ , различия с контролем статистически значимы при  $p < 0,05$ ).

Для исследования субстратной специфичности протеиназы использовали  $\beta$ -цепь окисленного инсулина. Гидролиз  $\beta$ -цепи приводил к накоплению многочисленных пептид фрагментов, выявляемых при тонкослойной хроматографии (данные не приведены), что указывало на широкую субстратную специфичность, характерную для известных субтилизиноподобных ферментов — протеиназы К, эсперазы *B. lentus* и субтилизина BPN' *B. amyloliquefaciens* (37). Фермент гидролизует связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных

аминокислот (Phe1-Val2, Leu11-Val12, Leu15-Tyr16, Phe25-Tyr26 и др.), а также гидрофильных аминокислот (Asn3-Gln4, Gln4-His5, Cys7-Gly8, Ser9-His10, Tyr16-Leu17 и др.). Следовательно, полученная протеиназа *B. pumilus* обладает широкой субстратной специфичностью и способностью к глубокому гидролизу белковых субстратов, что также определяет перспективность фермента как биодобавки, расщепляющей белковые компоненты кормов.

Для эффективной работы в пищеварительном тракте птицы протеиназа должна сохранять активность при повышенной температуре (40 °С) и агрессивных значениях рН среды, меняющихся от кислого к щелочному. Эксперимент с имитацией условий ЖКТ кур (рН, время и температура) показал, что протеиназа успешно функционирует в таких условиях (рис. 2). В слабокислой среде (рН 5,5, модель «зоб») фермент сохранял активность в пределах контроля. В сильнокислой среде (рН 2,9, модель «желудок») активность фермента снизилась на 40 %, а в щелочных условиях (рН 6,5-8,0, модель «тонкий и толстый кишечник») — возросла на 10-13 % относительно контроля. Эти данные показали, что протеиназа может оставаться в активном состоянии на всем протяжении пищеварительного тракта птицы.

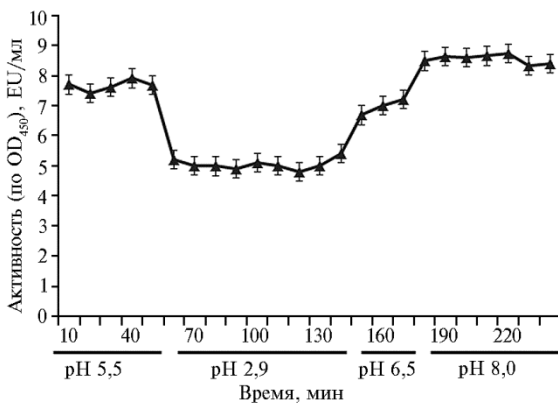


Рис. 2. Активность рекомбинантной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* при различных значениях рН, имитирующих условия в желудочно-кишечном тракте цыплят ( $n = 5$ , различия с контролем статистически значимы при  $p < 0,05$ ).

Изучение активности и стабильности фермента при воздействии желчью в течение 1 ч при 40 °С показало, что при ее концентрации от 0,01 до 0,05 % активность фермента сохранялась в пределах контроля. При увеличении концентрации до 1 % активность фермента снижалась на 10 %, а при концентрации 5 % остаточная активность фермента составила 60 % (рис. 3). Следовательно, полученный бактериальный фермент способен сохранять каталитическую активность при воздействии желчи в условиях ЖКТ кур.

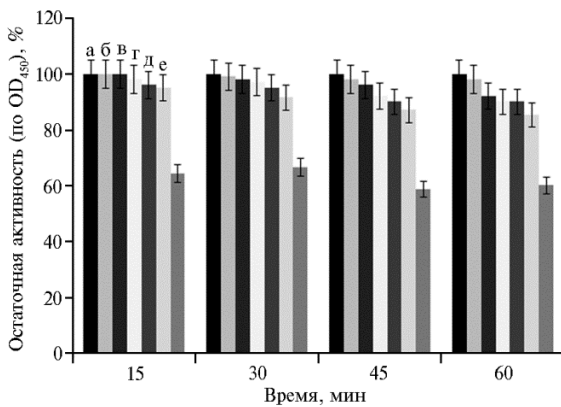


Рис. 3. Активность рекомбинантной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* при разных концентрациях желчи: а — 0,01 %, б — 0,05 %, в — 0,10 %, г — 0,25 %, д — 0,50 %, е — 1 %, ж — 5 % ( $n = 5$ , различия с контролем статистически значимы при  $p < 0,05$ ).

При оценке токсичности препарата цыплят содержали в вольерах. Предварительно цыплят осматривал ветеринарный специалист для выявления больных и ослабленных особей (их исключали из эксперимента). Использовали стартовый комбикорм в виде крупки. Расход препарата протеиназы составлял 12,5 мл/кг корма на 15 гол. В течение

10 сут (период наблюдения) все цыплята оставались здоровыми, активными, хорошо поедали корм, физиологических отклонений и изменения поведенческих реакций у них не наблюдали. Живая масса цыплят в опыте сохранялась в пределах контроля. Помет цыплят-бройлеров был нормальный. После вскрытия во внутренних органах цыплят повреждений и патологических изменений не выявили. Эти результаты подтвердили, что препарат бактериальной протеиназы был безопасен для птицы и не обладал токсичностью.

### 3. Динамика основных зоотехнических показателей у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 при добавлении рекомбинантной протеиназы *Bacillus pumilus* в корма ( $M \pm SEM$ , физиологический опыт, крестьянско-фермерское хозяйство, Республика Марий Эл)

Показатель	Контроль ( $n = 25$ )	I группа, 5 EU/кг корма ( $n = 25$ )	II группа, 15 EU/кг корма ( $n = 25$ )
Прирост живой массы, кг:			
0 сут	0,049±0,003	0,049±0,003	0,049±0,003
1-10 сут	0,201±0,007	0,229±0,008	0,214±0,005
11-20 сут	0,364±0,014	0,402±0,014	0,391±0,010
21-42 сут	1,551±0,032	1,668±0,038	1,674±0,039
Итого	2,165±0,044	2,348±0,044	2,328±0,037
Потребление комбикорма в расчете на одного цыпленка, кг:			
Старт (0-10 сут)	0,343	0,336	0,347
Рост (11-20 сут)	0,729	0,705	0,719
Финишер (21-42 сут)	3,112	3,127	3,071
Итого	4,184	4,168	4,137
Конверсия корма:			
Старт (0-10 сут)	1,71	1,47	1,62
Рост (11-20 сут)	2,00	1,75	1,84
Финишер (21-42 сут)	2,01	1,88	1,84
Итого	1,98	1,81	1,82
Сохранность поголовья	100 %	100 %	100 %

Примечание. В I и II группах к основному (контрольному) рациону добавляли препарат субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* (см. раздел «Методика»). Различия с контролем статистически значимы при  $p < 0,05$ .

При определении питательной ценности кормов (Рост, Старт, Финишер) в случае добавления бактериальной протеиназы содержание кальция (около 1 %) было достаточным для стабилизации активности вносимого фермента. В течение 42 сут (период наблюдений) все цыплята оставались здоровыми, активными, хорошо поедали корм, их поведенческие реакции не изменялись. Сохранность поголовья составила 100 % в контрольной и опытных группах. К концу откорма живая масса птицы, получавшей протеиназу в качестве добавки, была выше контроля в I группе (5 EU/кг) в среднем на 8,7 % ( $p < 0,05$ ), во II группе (15 EU/кг) — на 7,7 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 3). В период 0-10 сут (комбикорм Старт) прирост живой массы цыплят в I и II группах был выше, чем в контроле, соответственно на 13,9 % ( $p < 0,05$ ) и 6,5 % ( $p < 0,05$ ) (см. табл. 3). Конверсия корма в обеих группах улучшилась (соответственно на 14,0 и 5,3 %,  $p < 0,05$ ). С 11-х по 20-е сут (комбикорм Рост) прирост массы в I группе был выше на 10,4 % ( $p < 0,05$ ), во II группе — на 7,4 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При этом конверсия корма улучшалась (соответственно на 12,5 и 8,0 %,  $p < 0,05$ ). При использовании комбикорма Финишер (21-42-е сут) наблюдали прирост в I группе на 7,5 % ( $p < 0,05$ ), во II — на 7,9 % ( $p < 0,05$ ). В этот период конверсия корма в опытных группах улучшалась соответственно на 6,5 и 8,5 % ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus pumilus*, экспрессируемая в клетках *Bacillus subtilis* pCS9 с геном *aprVp* в составе плазмиды pCS9, проявляет широкую субстратную специфичность, стабильна (выдерживает колебания pH, температуры, высокие концентрации



желчи), высокоактивна (способна сохранять активность как в верхних, так и в нижних отделах кишечника цыплят кросса Cobb 500) и нетоксична для птицы. Эти свойства препарата необходимы в условиях желудочно-кишечного тракта бройлеров, поскольку фермент должен удалять субстраты, которые могли бы нарушить пищеварение и баланс микрофлоры, по мере продвижения химуса по всему кишечнику. Полученные данные позволили нам сделать заключение, что на ранних стадиях роста (0–10 сут) при использовании рецептуры Старт эффективная доза протеиназы — 5 ЕУ/кг корма (проявляется тенденция к улучшению конверсии корма). То же отмечали позднее (21–42-е сут) при добавлении протеиназы в дозе 15 ЕУ/кг к комбикорму Финишер. Полученная рекомбинантная бациллярная протеиназа может рассматриваться как потенциальная кормовая добавка для повышения прироста живой массы и снижения потребления корма при выращивании цыплят-бройлеров.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии,

420008 Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,  
e-mail: tihonovaa093@gmail.com ✉, natatialrudakova@gmail.com,  
MarTLutfullin@kpfu.ru, GuFHadieva@kpfu.ru, tojmencevaa@mail.ru,  
mardanovaaylsu@mail.ru, marsharipova@gmail.com

Поступила в редакцию  
19 сентября 2018 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 6, pp. 1274–1284

## GENE CONSTRUCT-BASED SERINE PROTEASE OF *Bacillus pumilus* AS A FEED ADDITIVE FOR POULTRY FARMING

A.O. Koryagina, N.L. Rudakova, M.T. Lutfullin, G.F. Khadieva, A.A. Toymentseva,  
A.M. Mardanova, M.R. Sharipova

Kazan (Volga region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, 18, Kremlyovskaya ul., Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia, e-mail tihonovaa093@gmail.com (✉ corresponding author), natatialrudakova@gmail.com, MarTLutfullin@kpfu.ru, GuFHadieva@kpfu.ru, tojmencevaa@mail.ru, mardanovaaylsu@mail.ru, marsharipova@gmail.com

ORCID:

Koryagina A.O. orcid.org/0000-0003-1859-8269

Rudakova N.L. orcid.org/0000-0000-3685-2016

Lutfullin M.T. orcid.org/0000-0003-1985-480X

Khadieva G.F. orcid.org/0000-0002-9281-3994

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

This work is a part of the State Program to improve the world research and education competitiveness of the Kazan (Volga Region) Federal University

Supported financially by Russian Science Foundation (science project No. 16-16-04062)

Received September 19, 2018

doi: 10.15389/agrobiol.2018.6.1274eng

### Abstract

Bacterial enzymes, in particular proteinases, as dietary additives in poultry farming, improve digestibility of feed nutrients and, as a consequence, make animal diets cheaper. This explains why bioadditives are being actively developed worldwide. Proteinases break down proteins and reduce the negative effect of digestive inhibitors thus allow the costs for purchasing synthetic amino acids to be lower. Bacteria and microscopic fungi, including those with gene constructs developed to increase yield and improve properties of the expressed enzymes, may be producers. Bacterial serine proteinases have a high thermostability and are resistant to inhibitors of animal origin. In this paper, we report for the first time about the production of highly purified secreted subtilisin-like serine proteinase from *Bacillus pumilus* upon expression of the recombinant vector in *B. subtilis* strains and evaluate the main physicochemical and biological characteristics of the synthesized product. The goal of our study is to obtain, by using the expression system, the highly purified subtilisin-like serine proteinase from *B. pumilus* as a promising feed additive for the poultry industry. The substrate specificity of the produced serine proteinase, i.e. the depth of hydrolysis, corresponds to the specificity of subtilisins, the enzyme cleaves the bonds formed by the carboxyl groups of the hydrophobic amino acids leucine, phenylalanine and tyrosine, as well as a number of hydrophilic amino acids. An investigation of the effect of temperature and pH on serine proteinase activity showed that in the presence of cal-

cium ions at a final concentration of 5 mM, the temperature optimum of the enzyme reached 50 °C. The enzyme remains stable in the pH range from 7 to 10. The proteinase activity was studied at various pH values to simulate the conditions of the gastrointestinal tract of chickens. In a weakly acidic medium (pH 5.5, goiter) proteinase completely retains its activity (100 %), at pH 2.9 (stomach) the enzyme activity decreases by 40 %, and upon transition again to alkaline conditions (pH 6.5-8.0, small intestine and large intestine), the enzyme restores activity up to the values exceeding control by 13 %. Thus, the enzyme can remain active throughout the whole digestive tract of broiler chicks. The proteinase activity was not inhibited by natural inhibitors, such as a trypsin inhibitor, which would also allow the enzyme to function in the gastrointestinal tract of chickens. In experiments on the effect of chicken bile from 0.01 % to 0.05 % for 1 hour at 40 °C on the microbial proteinase, the enzyme completely preserved its activity. With an increase in the concentration of chicken bile to 1 %, the enzyme activity decreased by 10 %. To study the toxicity of proteinase, 1-day-old Cobb 500 broiler chickens were observed for 10 days. The dietary proteinase at 100 EU/kg concentration showed no toxicity, and all the indices of the poultry remained normal. We found that in the early period, during 0-10 days of growth when the chickens are fed with Start ration, a dosage of 5 EU/kg of proteinase is effective. In the late stages of poultry growth (21-42 days), the use of the Finisher mixed feed supplemented with bacterial proteinase at a dose of 15 EU/kg is optimal. In both cases, the dietary proteinase increases poultry weight gain by 13.9 % and 7.9 %, and also improves feed conversion by 14 % and 8.5 %, respectively. Thus, the amount of the introduced enzyme must be adjusted depending on the age of birds and the feed composition. The main indicators of Cobb 500 broiler chickens' growth when using recombinant proteinase allow us to conclude that this proteinase is promising as a feed additive.

Keywords: *Bacillus pumilus*, recombinant subtilisin-like serine proteinase, substrate specificity, stability, activity, effects of pH and temperature, fodder additive, broiler chickens, Cobb 500.

## REFERENCES

1. Zhu H.L., Hu L.L., Hou Y.Q., Zhang J., Ding B.Y. The effects of enzyme supplementation on performance and digestive parameters of broilers fed corn-soybean diets. *Poultry Sci.*, 2014, 93(7): 1704-1712 (doi: 10.3382/ps.2013-03626).
2. Stefanello C., Vieira S.L., Santiago G.O., Kindlein L., Sorbara J.O., Cowieson A.J. Starch digestibility, energy utilization, and growth performance of broilers fed corn-soybean basal diets supplemented with enzymes. *Poultry Sci.*, 2015, 94(10): 2472-2479 (doi: 10.3382/ps/pev244).
3. Pekel A.Y., Horn N.L., Adeola O. The efficacy of dietary xylanase and phytase in broiler chickens fed expeller-extracted camelina meal. *Poultry Sci.*, 2017, 96(1): 98-107 (doi: 10.3382/ps/pew183).
4. Cowieson A.J., Adeola O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poultry Sci.*, 2005, 84(12): 1860-1867 (doi: 10.1093/ps/84.12.1860).
5. Ushakova N.A., Nekrasov R.V., Pravdin V.G., Kravtsova L.Z., Bobrovskaya O.I., Pavlov D.S. *Fundamental'nye issledovaniya. Nauchnye obzory*, 2012, 1: 184-192 (in Russ.).
6. Kaczmarek S.A., Rogiewicz A., Mogielnicka M., Rutkowski A., Jones R.O., Slominski B.A. The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. *Poultry Sci.*, 2014, 93(7): 1745-1753 (doi: 10.3382/ps.2013-03739).
7. Yuan C., Ding Y., Qiang He, Azzam M.M.M., Lu J.J., Zou X.T. L-arginine upregulates the gene expression of target of rapamycin signaling pathway and stimulates protein synthesis in chicken intestinal epithelial cells. *Poultry Sci.*, 2015, 94(5): 1043-1051 (doi: 10.3382/ps/pev051).
8. Toghyani M., Wu S.B., Pérez-Maldonado R.A., Iji P.A., Swick R.A. Performance, nutrient utilization, and energy partitioning in broiler chickens offered high canola meal diets supplemented with multicomponent carbohydrase and mono-component protease. *Poultry Sci.*, 2017, 96(11): 3960-3972 (doi: 10.3382/ps/pev212).
9. Goodarzi Borojjeni F., Senz M., Kozłowski K., Boros D., Wisniewska M., Rose D., Männer K., Zentek J. The effects of fermentation and enzymatic treatment of pea on nutrient digestibility and growth performance of broilers. *Animal*, 2017, 11(10): 1698-1707 (doi: 10.1017/S1751731117000787).
10. Adebiyi A.O., Olukosi O.A. Metabolizable energy content of wheat distillers' dried grains with solubles supplemented with or without a mixture of carbohydrases and protease for broilers and turkeys. *Poultry Sci.*, 2015, 94(6): 1270-1276 (doi: 10.3382/ps/pev089).
11. Romero L.F., Sands J.S., Indrakumar S.E., Plumstead P.W., Dalsgaard S., Ravindran V. Contribution of protein, starch, and fat to the apparent ileal digestible energy of corn- and wheat-based broiler diets in response to exogenous xylanase and amylase without or with protease. *Poultry Sci.*, 2014, 93(10): 2501-2513 (doi: 10.3382/ps.2013-03789).
12. Olukosi O.A., Beeson L.A., Englyst K., Romero L.F. Effects of exogenous proteases without or with carbohydrases on nutrient digestibility and disappearance of non-starch polysaccharides in broiler chickens. *Poultry Sci.*, 2015, 94(11): 2662-2669 (doi: 10.3382/ps/pev260).
13. Amerah A.M., Romero L.F., Awati A., Ravindran V. Effect of exogenous xylanase, amylase, and protease as single or combined activities on nutrient digestibility and growth performance of

- broilers fed corn/soy diets. *Poultry Sci.*, 2017, 96(4): 807-816 (doi: 10.3382/ps/pew297).
14. Markin Yu., Nesterov N. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2018, 2: 8-11 (in Russ.).
  15. Erdaw M.M., Wu S., Iji P.A. Growth and physiological responses of broiler chickens to diets containing raw, full-fat soybean and supplemented with a high-impact microbial protease. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 2017, 30(9): 1303-1313 (doi: 10.5713/ajas.16.0714).
  16. Erdaw M.M., Perez-Maldonado R.A., Iji P.A. Physiological and health-related response of broiler chickens fed diets containing raw, full-fat soya bean meal supplemented with microbial protease. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 2018, 102(2): 533-544 (doi: 10.1111/jpn.12785).
  17. Williams R.B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology*, 2005, 34(3): 159-80 (doi: 10.1080/03079450500112195).
  18. Khochamit N., Siripornadulsil S., Sukon P., Siripornadulsil W. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. *Microbiological Research*, 2015, 170: 36-50 (doi: 10.1016/j.micres.2014.09.004).
  19. Timbermont L., Lanckriet A., Dewulf J., Nollet N., Schwarzer K., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathology*, 2010, 39(2): 117-121 (doi: 10.1080/03079451003610586).
  20. Yan W., Sun C., Yuan J., Yang N. Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45308 (doi: 10.1038/srep45308).
  21. Caly D.L., D'Inca R., Auclair E., Drider D. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: a microbiologist's perspective. *Front. Microbiol.*, 2015, 6: 1336 (doi: 10.3389/fmicb.2015.01336).
  22. Askelson T.E., Flores C.A., Dunn-Horrocks S.L., Dersjant-Li Y., Gibbs K., Awati A., Lee J.T., Duong T. Effects of direct-fed microorganisms and enzyme blend co-administration on intestinal bacteria in broilers fed diets with or without antibiotics. *Poultry Sci.*, 2018, 97(1): 54-63 (doi: 10.3382/ps/pex270).
  23. Wu B.Q., Zhang T., Guo L.Q., Lin J.F. Effects of *Bacillus subtilis* KD<sub>1</sub> on broiler intestinal flora. *Poultry Sci.*, 2011, 90(11): 2493-2499 (doi: 10.3382/ps.2011-01529).
  24. Ryb'yakov M., Timoshenko R. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2014, 6: 20-21 (in Russ.).
  25. Pavlenko A., Golovachev D. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2015, 3: 48-50 (in Russ.).
  26. Demina T.B., Fomenko I.E. *Pitisevodstvo*, 2013, 8: 17-19 (in Russ.).
  27. Liu L., Yang H., Shin H.D., Chen R.R., Li J., Du G., Chen J. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered*, 2013, 4(4): 212-223 (doi: 10.4161/bioe.24761).
  28. Charney J., Tomarelli R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biochem.*, 1947, 177: 501-505.
  29. Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya I.V., Demidyuk E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius*. Protein Engineering, Design and Selection, 2004, 17(5): 411-416 (doi: 10.1093/protein/gzh050).
  30. Itskovich E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Shakirov E.V., Sharipova M.R., Leshchinskaya I.B., Ksenofontov A.L., Rudenskaya G.N. *Biokhimiya*, 1997, 62(1): 60-65 (in Russ.).
  31. Laemmli H.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685 (doi: 10.1038/227680a0).
  32. Britton H.T.K., Robinson R.A. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.*, 1931, 0: 1456-1462 (doi: 10.1039/JR9310001456).
  33. Toymntseva A.A., Schrecke K., Sharipova M.R., Mascher T. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for based on the *liaI* promoter. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 143-156 (doi: 10.1186/1475-2859-11-143).
  34. Tikhonova A., Toymntseva A., Sharipova M. Screening of heterologous signal peptides for optimization of the LIKE-expression system. *BioNanoScience*, 2017, 7(2): 408-414 (doi: 10.1007/s12668-016-0357-z).
  35. Herzberg C., Weidinger L.A.F., Dörrbecker B., Hübner S., Stülke J., Commichau F.M. SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics*, 2007, 7(22): 4032-4035 (doi: 10.1002/pmic.200700491).
  36. Msadek T., Kunst F., Klier A., Rapoport G. DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. *J. Bacteriol.*, 1991, 173(7): 2366-2377.
  37. Stepanov V.M., Markarian A.N., Strongin A.I., Timokhina E.A. Specific features of intracellular serine proteinase of *Bacillus amyloliquefaciens* on native and denatured protein substrates. *Biokhimiia*, 1982, 47(9): 1427-1430.