

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2573>
<https://elibrary.ru/YZSUVC>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Активность и состав секретлируемых гидролаз термофильного штамма *Bacillus* sp. при культивировании на средах с растительной мукой



М. В. Романова*^{ORCID}, Ф. Д. Макеев^{ORCID}, Н. А. Мирзалиева^{ORCID},
С. А. Евдокимова^{ORCID}, А. В. Белодед^{ORCID}

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева^{ROR}, Москва, Россия

Поступила в редакцию: 03.07.2024
Принята после рецензирования: 28.08.2024
Принята к публикации: 01.04.2025

*М. В. Романова: romanova.m.v@muctr.ru,
<https://orcid.org/0000-0003-3109-8445>
Ф. Д. Макеев: <https://orcid.org/0009-0008-9627-7499>
Н. А. Мирзалиева: <https://orcid.org/0009-0000-7076-1794>
С. А. Евдокимова: <https://orcid.org/0000-0002-4808-5002>
А. В. Белодед: <https://orcid.org/0000-0002-4425-8068>

© М. В. Романова, Ф. Д. Макеев, Н. А. Мирзалиева,
С. А. Евдокимова, А. В. Белодед, 2025



Аннотация.

Растительное сырье – доступный и перспективный субстрат для получения индивидуальных ферментов и мультиэнзимных композиций разного назначения. Эффективными продуцентами для промышленного производства ферментных препаратов могут стать термофильные бактерии, поскольку их ферменты обладают рядом преимуществ – термоустойчивостью и химической стабильностью. Актуальным является поиск термофильных штаммов, способных продуцировать промышленно ценные ферменты с высоким выходом при использовании недорогих растительных субстратов. Цель исследования – изучить состав комплекса гидролитических ферментов термофильного штамма-продуцента протеаз *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35 при культивировании на средах с компонентами растительного происхождения и выбрать перспективное сырье для синтеза термостабильных гидролаз, в частности протеаз, амилаз и гемицеллюлаз.

Объект исследования – термофильный штамм Кб.12.Гл.35, выделенный из образца компоста и идентифицированный методом секвенирования гена 16S рРНК как *Bacillus subtilis*. Для исследования состава комплекса гидролаз штамм выращивали на средах с растительной мукой в комбинации с дрожжевым или кукурузным экстрактом, оценивали активность внеклеточных ферментов. В качестве растительной муки в количестве 1 % использовали гороховую, льняную, нуттовую, овсяную, рисовую, амарантовую, соевую, а также смесь на основе амарантовой и соевой муки. Активность протеаз определяли по казеину и на основе зимографического анализа, активность карбогидраз – методом с 3,5-динитросалициловой кислотой.

При культивировании продуцента гидролаз на питательных средах с растительной мукой (1 %) и кукурузным экстрактом (0,5 %) максимальный уровень синтеза протеаз (более 400 ед/мл) выявлен при использовании амарантовой, овсяной и рисовой муки; амилаз (более 1300 ед/мл) – нуттовой, овсяной и рисовой муки; галактоманназа (более 200 ед/мл) и ксиланаза (более 60 ед/мл) – амарантовой, гороховой и нуттовой; арабиногалактаназа (более 35 ед/мл) – амарантовой, нуттовой и рисовой муки. По результатам зимографического анализа можно предположить, что наибольшую роль в протеолитической активности играют ферменты массой 24,7–28,2 кДа, а также протеазы массой 62,7–75,0 кДа, т. к. их активность ярко выражена при культивировании на растительном сырье, в отличие от стандартной среды LB. Секретция протеазы массой 15,1 кДа на сырье практически не отличалась от ее уровня на стандартной среде.

Термофильный штамм Кб.12.Гл.35 можно рассматривать в качестве перспективного продуцента для получения протеаз, амилаз и гемицеллюлаз при использовании в составе среды растительной муки и кукурузного экстракта. Дальнейшие исследования могут быть направлены на оптимизацию состава питательных сред и условий культивирования для повышения выхода целевой группы гидролитических ферментов.

Ключевые слова. Термофильные бактерии, *Bacillus*, протеазы, амилазы, растительное сырье, зимография

Для цитирования: Романова М. В., Макеев Ф. Д., Мирзалиева Н. А., Евдокимова С. А., Белодед А. В. Активность и состав секретлируемых гидролаз термофильного штамма *Bacillus* sp. при культивировании на средах с растительной мукой. Техника и технология пищевых производств. 2025. Т. 55. № 2. С. 300–314. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2573>

Activity and Composition of Hydrolases Secreted by Thermophilic Strain *Bacillus* sp. Grown on Plant Flour Media



Mariia V. Romanova*^{ORCID}, Fedor D. Makeev^{ORCID}, Nargiz A. Mirzalieva^{ORCID},
Svetlana A. Evdokimova^{ORCID}, Andrey V. Beloded^{ORCID}

Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia^{ROR}, Moscow, Russia

Received: 03.07.2024

Revised: 28.08.2024

Accepted: 01.04.2025

*Mariia V. Romanova: romanova.m.v@muctr.ru,

<https://orcid.org/0000-0003-3109-8445>

Fedor D. Makeev: <https://orcid.org/0009-0008-9627-7499>

Nargiz A. Mirzalieva: <https://orcid.org/0009-0000-7076-1794>

Svetlana A. Evdokimova: <https://orcid.org/0000-0002-4808-5002>

Andrey V. Beloded: <https://orcid.org/0000-0002-4425-8068>

© M.V. Romanova, F.D. Makeev, N.A. Mirzalieva, S.A. Evdokimova, A.V. Beloded, 2025



Abstract.

Plant raw materials are an accessible and efficient substrate for multipurpose enzymes and multi-enzyme complexes obtaining. Thermophilic bacteria are reliable producer strains for industrial enzymes with valuable physicochemical properties, e.g., heat resistance, stability at extreme pH, and chemical stability. Food scientists are on the lookout for new thermophilic strains capable of producing high yields of industrially valuable enzymes from cheap plant raw materials. In this research, various plant cultivation media affected the complex hydrolytic enzymes produced by a thermophilic strain of *Bacillus subtilis* Kb.12.Gl.35. The research objective was to select the optimal raw materials for the synthesis of thermostable hydrolases, i.e., proteases, amylases, and hemicellulases.

The thermophilic strain was isolated from a compost sample, identified by 16S rRNA sequencing, and tested using standard microbiological and biochemical methods. The strain grew on different media with plant flour combined with yeast or corn extract. The activity of extracellular enzymes made it possible to study the composition of the hydrolase complex. The proteolytic activity was determined using casein as the substrate and by zymography. The 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method revealed the carbohydrase activity.

When culturing the hydrolase producer on nutrient media with plant flour (1%) and corn extract (0.5%), the highest level of protease synthesis (≥ 40 units/mL) was detected in the samples with amaranth, oat, and rice flour. The highest level of amylase ($\geq 1,300$ units/mL) belonged to the chickpea, oat, and rice flour samples. The biggest yields of galactomannanase (≥ 200 units/mL) and xylanases (≥ 60 units/mL) was found in the samples with amaranth, pea, and chickpea samples. The biggest amount of arabinogalactanase (≥ 35 units/mL) belonged to the amaranth, chickpea, and rice flour. Based on the zymographic analysis, the enzymes of 24.7–28.2 kDa and the proteases of 62.7–75.0 kDa appeared to be the most efficient proteolytic agents. Their activity was obvious on plant raw materials, in contrast to the standard LB medium. The secretion level of 15.1 kDa proteases was the same on the plant media as on the standard medium.

Bacillus subtilis Kb.12.Gl.35 proved to be an effective producer of proteases, amylases, and hemicellulases with plant flour and corn extract in the medium. Further studies are needed to optimize the composition of nutrient media and cultivation conditions to increase the yield of the target hydrolytic enzymes.

Keywords. Thermophilic bacteria, *Bacillus*, proteases, amylases, plant raw materials, zymography

For citation: Romanova MV, Makeev FD, Mirzalieva NA, Evdokimova SA, Beloded AV. Activity and Composition of Hydrolases Secreted by Thermophilic Strain *Bacillus* sp. Grown on Plant Flour Media. Food Processing: Techniques and Technology. 2025;55(2):300–314. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2573>

Введение

В промышленных технологиях для интенсификации процессов все чаще применяются ферменты – высокоэффективные биокатализаторы белковой природы. Благодаря селективности, регулируемости и относительно мягким условиям действия (атмосферное дав-

ление, оптимальная температура – 30–50 °С, pH среды часто близкий к нейтральному) применение ферментов дает ряд преимуществ по сравнению с химическими катализаторами. Например, их использование снижает затраты на энергию и сырье, уменьшает образование побочных соединений и отходов, повышает

качество и выход целевого продукта [1–3]. Среди многочисленных источников ферментов следует выделить микроорганизмы, поскольку они обладают биохимическим разнообразием продуцируемых метаболитов, легко культивируются и дают возможность применять методы современной молекулярной генетики для получения модифицированных ферментов с улучшенными характеристиками, такими как повышенная каталитическая активность, специфичность, стабильность, чистота [4–6]. Большое значение в промышленности имеют ферменты класса гидролаз, обеспечивающие гидролиз широкого круга соединений, в частности биополимеров. К ним относятся протеазы, амилазы, целлюлазы, глюканызы, ксиланазы, маннаназы и др. [1, 7]. Данные ферменты успешно применяются в пищевой, кормовой промышленности, текстильном и бумажном производстве, в составе моющих средств и при переработке отходов [4, 8].

В промышленном производстве часто реализуются процессы при повышенных температурах и экстремальных pH, что накладывает ограничение на использование некоторых коммерческих ферментных препаратов, выделенных из мезофильных организмов. В связи с этим многие исследования направлены на модификации мезофильных ферментов для придания им подходящих биохимических свойств, а также на поиск высокоэффективных ферментов термофильных микроорганизмов – термозимов [9]. Ввиду компактной структуры и большого числа стабилизирующих связей термозимы обладают высокой каталитической активностью, термостабильностью, а также устойчивы к различным химическим агентам [10, 11]. Высокотемпературные процессы, позволяющие оптимально использовать термостабильные ферменты, отличаются высокой скоростью реакции, лучшей растворимостью, диффузией субстратов и отводом летучих продуктов [12].

Способность расти и развиваться при высоких температурах встречается у некоторых бактерий, архей, а также грибов [13]. Среди термофильных бактерий наиболее распространены представители родов *Bacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Thermus* и др. [14, 15]. Чтобы выживать в экстремальных условиях термофилы продуцируют ряд соединений с уникальными свойствами, например, ферменты, белки стресса, антибиотики, полисахариды [16]. Ферменты термофильных бактерий обладают потенциалом широкого применения. Термостабильные целлюлазы, маннаназы и ксиланазы могут эффективно использоваться в целлюлозно-бумажной промышленности для отбеливания бумаги и в конверсии лигноцеллюлозного сырья для получения биотоплива [12]. С помощью маннаназ получают пребиотики на основе маннанолигосахаридов, а также они могут применяться в производстве растворимого кофе с целью снижения его вязкости. [17, 18]. Термостабильные амилазы и пектиназы используются, чтобы осветлять фрукто-

вые соки, в текстильной промышленности и других областях. Самой востребованной группой гидролаз являются протеазы – ферменты, катализирующие гидролиз белков. Их спектр применения охватывает множество областей: хлебопечение, сыроделие, пивоварение, кожевенная промышленность, медицина, синтез пептидов, деструкция биопленок, переработка отходов [19]. Мультиэнзимные композиции на основе термостабильных гидролаз входят в состав кормовых добавок, повышая их питательную ценность, а также стиральных порошков [20, 21].

Для промышленного получения ферментов, в частности гидролаз, важно учитывать физиологические особенности продуцента. Добавление в среду моносахаридов, таких как глюкоза, манноза или фруктоза, ингибирует синтез внеклеточных протеаз и амилаз бактерий – данное явление называется катаболитной репрессией [22, 23]. А наличие в среде олигомеров и полимеров может приводить к индукции синтеза деполимеризующих ферментов, главным образом гидролаз. На синтез внеклеточных гидролаз также оказывают влияние такие физико-химические факторы, как отношение углерода и азота в среде, температура и pH культивирования, аэрация, присутствие кофакторов в виде ионов металлов, объем посевного материала и пр. [24]. Поскольку ферментация составляет значительную долю стоимости ферментных препаратов – около 30–40 %, в промышленном масштабе в качестве компонентов питательной среды целесообразно использовать недорогое и доступное сырье: муку, отруби, патоку, жмыхи, шроты, перья [25, 26].

Бактерии рода *Bacillus*, особенно термофильные представители *B. subtilis* и родственные виды *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* и др., быстро растут на недорогих субстратах и характеризуются высокой секрецией белка, что делает их подходящей платформой синтеза ферментов [27]. Например, M. Bawela *et al.* изучали оптимизацию синтеза термостабильной и устойчивой к детергентам щелочной протеазы *B. pumilus* MP 27 при использовании пшеничной соломы и пептона в качестве источника углерода и азота соответственно [28]. В исследовании [29] для продукции α -амилазы штаммами *B. amyloliquefaciens* BT 2022 и *B. licheniformis* Basma 87 использовали хлебные отходы в качестве субстрата, а полученный амилолитический фермент иммобилизовали в альгинатном геле и тестировали на способность препарата амилазы удалять крахмал после расшлихтовки ткани. S. Devi *et al.* для оптимального синтеза ксиланазы *B. subtilis* XPS7 в качестве источников углерода выбрали доступные сельскохозяйственные отходы – пшеничную солому, отруби и шелуху, а в качестве источника азота – неорганические соли [30].

P. K. Srivastava и M. Kapoor [31] проводили оптимизацию содержания компонентов среды (шелухи зеленой чечевицы и подсолнечного жмыха) для получения эндоманнаназы, используемой в дальнейшем

для получения маннанолигосахаридов из гуаровой камеди, далее олигосахариды проверяли на способность стимулировать рост лактобактерий. Так как растительное сырье варьируется по углеводному составу и соотношению отдельных олиго- и полисахаридов, в процессе роста культуры может вырабатываться комплекс гидролитических ферментов, и экспрессия отдельных групп карбогидраз может изменяться в зависимости от используемого сырья, что следует учитывать при разработке технологии получения ферментных препаратов.

Цель данной работы – изучить состав комплекса гидролитических ферментов термофильного штамма-продуцента протеаз *B. subtilis* Кб.12.Гл.35 при культивировании на средах с компонентами растительного происхождения и выбрать перспективное сырье для синтеза термостабильных гидролаз, в особенности протеаз, амилаз и гемицеллюлаз.

Объекты и методы исследования

Выделение и идентификация штамма-продуцента. Объект исследования – термотолерантный штамм-продуцент секретируемых протеаз *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35, выделенный ранее методом накопительных культур из образца компоста при 50 °С [32]. Штамм был первично охарактеризован по морфологическим свойствам (форма клеток, окраска по Граму, окраска спор, подвижность клеток) и путем проведения биохимических тестов (каталаза, уреазы, образование кислот из углеводов) согласно методикам из справочника Берджи по бактериологической систематике [33]. Микроморфологию культуры изучали с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия).

Идентификацию штамма проводили на основе секвенирования гена 16S рРНК. Нуклеиновые кислоты выделяли из ночной культуры, выращенной на стандартной среде LB при 50 °С. Экстракцию ДНК выполняли с использованием набора для выделения геномной ДНК из бактериальных клеток (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя. В анализе использовали универсальные праймеры 8F (5'-AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYT-ACSTTGTTACGACTT-3') (Евроген, Россия). Полимеразную цепную реакцию осуществляли при помощи набора реактивов для ПЦР с *Taq* ДНК-полимеразой (Диаэм, Россия) в амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США). Реакционная смесь включала ПЦР буфер – 5 мкл, смесь dNTP – 0,5 мкл, 50 мМ MgCl₂ – 1 мкл, прямой и обратный праймеры – по 0,2 мкл, ДНК-матрицу – 1 мкл, ДНК-полимеразу – 0,2 мкл, деионизованную воду – 16,9 мкл. При постановке ПЦР использовали следующие температурные условия: предварительная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, затем 34 цикла, включающих денатурацию при 95 °С на 30 с, отжиг при 54 °С на 30 с и элонгацию при 72 °С на 90 с, далее следовал цикл финальной элонгации 72 °С в течение 10 мин.

Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК проводили по методу Сэнгера с предварительной очисткой на оборудовании компании Евроген (Россия). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями гена 16S рРНК родственных видов из базы данных GenBank NCBI при помощи инструмента поиска BLAST. Филогенетический анализ выполняли с использованием метода присоединения соседей (neighbor-joining) в программном обеспечении MEGA [34].

Скрининг штаммов на наличие внеклеточных гидролаз. Выявление внеклеточных гидролаз осуществляли путем посева культуры на агаризованные питательные среды с соответствующими субстратами. Посевы инкубировали при 50 °С в течение 24 ч. Для скрининга на секретируемые протеазы использовали молочный агар следующего состава, г/л: сухое обезжиренное молоко пищевое (1,5 %, Fit Parad) – 28, триптон – 5, дрожжевой экстракт – 2,5, глюкоза – 1, агар – 15. Наличие протеолитической активности фиксировали при появлении зон гидролиза казеина вокруг колоний штамма. Гидролитическую активность по отношению к полисахаридам тестировали на средах, г/л: полисахарид – 2, триптон – 5, дрожжевой экстракт – 2, NaCl – 5, агар – 15. В качестве полисахаридных субстратов применяли растворимый крахмал, карбоксиметилцеллюлозу (пищевая), галактоманнан (камедь рожкового дерева пищевая), арабиногалактан (из березы, пищевой) и ксилан (из бука). В целях визуализации зон гидролиза субстратов чашки с крахмалом окрашивали йодным раствором, остальные – 0,5 % раствором Конго красного. Чашки Петри промывали дистиллированной водой до появления светлых зон на фоне окрашенного субстрата.

ПЦР-скрининг штаммов на наличие генов внеклеточных гидролаз. Скрининг на наличие структурных генов секретируемых гидролаз проводили посредством ПЦР в реальном времени. Праймеры для ПЦР подбирали при помощи инструмента Primer-BLAST на основе последовательностей структурных генов протеаз и амилаз бактерий *B. subtilis* и родственных видов, в том числе эталонного штамма *B. subtilis* 168. В качестве контрольной мишени использовали ген 16S рРНК с универсальными праймерами 337F и 518R (табл. 1). Все олигонуклеотиды синтезировали на оборудовании компании Евроген (Россия).

ПЦР проводили в амплификаторе Real-Time CF X96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США). Реакционная смесь объемом 25 мкл включала 12,5 мкл Био-Мастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия), 1 мкл каждого праймера с конечной концентрацией 100 нМ и 1 мкл раствора, содержащего ДНК. При постановке ПЦР были применены следующие температурные режимы: предварительная денатурация при 95 °С в течение 3 мин, затем 30 циклов, включающих денатурацию при 95 °С на 20 с, отжиг при 56 °С на 20 с и элонгацию при 72 °С в течение 25 с. Специ-

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

Table 1. Primers used for real-time polymerase chain reaction (PCR)

Ген	Продукт	Последовательность праймеров 5'-3'	Длина фрагмента, п.н.
<i>aprE</i>	Субтилизин	GAGTGTTTGTCCAGTTCGGGT	130
		GGCGTCTCTATCCAAAGCAC	
<i>bpr</i>	Бациллопептидаза F	GGAAGCTGGTGAATGGGT	225
		GCCGGATTGCGATAGAACC	
<i>vpr</i>	Сериновая протеаза Vpr	GATGCTACACTCCTTGCCCTAC	329
		GAGGAATAGGAACCGAAGGAGA	
<i>epr</i>	Сериновая протеаза Epr	TGACGGACGCAAGAGACAAA	232
		CTGACTGCTTTTTGGGCTTT	
<i>nprE</i>	Бациллолизин	GGAAAGAGGCGAGAAGAATGAG	250
		GGGCACACTCGTATCAAGCA	
<i>nprB</i>	Нейтральная протеаза B	CTGACCGTGATGATTGGGAGA	149
		GACTCCGCCATAATCCTCTGTT	
<i>mpr</i>	Глутамил-специфичная эндопептидаза	ATGTGGTCTGATACAAAGCCGA	192
		GAATACATCGTTCGTCACCCCTT	
<i>amyE</i>	α -Амилаза	TCTCGAACCCGAATGGAAACAA	190
		TTGATCGTGCCTGTCAGTTT	
<i>amyX</i>	Пуллуланаза	ACGAGGTTGACGAATGGAAAGA	141
		TCTTGATTCTGTTGGGCTTCTCT	
<i>malL</i>	α -Глюкозидаза	ATACGATGAAGGAACAGGGCA	133
		GTCAACGCCTCTATCCATCCA	
16S рПНК	16S рПНК (337F и 518R)	GACTCCTACGGGAGGCAGCAG	≈ 200
		GTATTACCGCGGCTGCTGG	

фичность проведения ПЦР устанавливали с помощью построения кривых плавления при нагревании проб в диапазоне температур 58–90 °C с шагом 0,5 °C/5 с. Пороговый цикл C_q определяли как цикл, который соответствует пересечению кривой амплификации и пороговой линии. Базовая и пороговая линии были рассчитаны программным обеспечением CFX Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories, США).

Культивирование штаммов на средах с растительным сырьем. Штамм культивировали на средах с комплексным растительным сырьем и на стандартной среде LB. В качестве комплексных источников углерода использовали растительную муку в количестве 1 %: гороховую, льняную, нуттовую, овсяную и рисовую марки «С.Пудовь», амарантовую «Амарант-мастер» и смесь на основе амарантовой и соевой муки «Спарта» (БэйкЛаб, Россия), муку соевую обезжиренную дезодорированную «Соянга-200». Источником азота являлись дрожжевой экстракт (Диаэм, Россия) и кукурузный экстракт (Masklin, Китай) в количестве 0,5 %. Для поддержания pH в питательные среды вносили MgSO₄ и CaCO₃. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера на 250 мл в объеме среды 50 мл в аэробных условиях на качалке при 200 об/мин при 50 °C в течение 48 ч.

Сырой протеин определяли методом Кьельдаля согласно ГОСТ 32044.1-2012 с использованием комплекта оборудования «Кельтран» (Сибагроприбор, Россия).

Определение протеолитической активности по казеину. Для анализа биомассу отделяли от культуральной жидкости на центрифуге (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Германия) при 8500 об/мин в течение 15 мин, полученный супернатант использовали в качестве источника ферментов. 0,1 мл супернатанта инкубировали с 0,5 мл Tris-HCl буфера (0,05 М, pH 8,0) и 0,4 мл 1 % раствора казеина по Гаммерстену (Sigma, США) в том же буфере 30 мин при 50 °C и интенсивном перемешивании. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали 10 мин при 8500 об/мин, затем измеряли оптическую плотность супернатанта при длине волны 280 нм на спектрофотометре СФ-104 (Аквилон, Россия). В качестве контролей использовали пробы, содержащие аналогичные компоненты в тех же пропорциях с добавлением казеина после осаждения ТХУ. По разнице оптической плотности опытных и контрольных проб судили о содержании ароматических аминокислот, образованных в ходе гидролиза казеина. Активность выражали в мкмоль тирозина, высвободившегося в ходе гидролиза казеина на 1 мл реакционной смеси за 1 мин относительно контрольной пробы.

Определение ферментативной активности карбогидраз, катализирующих гидролиз полисахаридов, проводили методом с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНСК). С этой целью биомассу отделяли от культуральной жидкости путем центрифугирования

при 8500 об/мин в течение 15 мин, полученный супернатант служил источником ферментов. Для постановки реакции 0,15 мл супернатанта инкубировали с 0,15 мл 0,5 % раствора субстрата в Tris-HCl буфере (0,05 М, рН 8,0) 30 мин при 50 °С на роторном шейкере. Далее отбирали 0,25 мл содержимого из каждой пробы и переносили в пробирки с 0,5 мл раствора ДНСК, помещали их на кипящую водяную баню на 10 мин. Контролями являлись пробы, в которые субстрат был добавлен непосредственно перед смешиванием с ДНСК. После кипячения пробирки охлаждали в воде со льдом. 0,5 мл цветного раствора переносили в пробирки с 5 мл дистиллированной воды, перемешивали, измеряли оптическую плотность проб при 540 нм на спектрофотометре СФ-104. Сравнивали разницу в оптической плотности опытных и контрольных образцов, чтобы оценить содержание редуцирующих веществ, образовавшихся в ходе гидролиза полисахаридов. Активность выражали в мкмоль моносахарида, высвободившегося в ходе гидролиза полисахарида на 1 мл реакционной смеси за 1 мин относительно контрольной пробы. Активность амилаз пересчитывали на мкмоль глюкозы, галактоманназы – маннозы, арабиногалактаназы – галактозы, ксиланазы – на мкмоль ксилозы.

Зимография протеаз. С целью детекции отдельных протеолитических ферментов в культуральной жидкости проводили зимографический анализ, основанный на электрофорезе в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) согласно методике [35], с некоторыми модификациями. Образцы супернатанта культуральной жидкости смешивали с буфером для проб в соотношении 1:1 без добавления меркаптоэтанола. Полученные пробы без предварительного кипячения загружали в лунки в количестве 10 мкл. Молекулярную массу определяли белковым предокрашенным маркером Prism Ultra Protein Ladder, 5–245 кДа (Abcam, Великобритания), который добавляли в лунку геля в количестве 5 мкл. Разделение белков проводили в камере для вертикального электрофореза (Компания Хеликон, Россия) с использованием источника питания серии «Эльф» (ДНК-Технология, Россия) в 12 % полиакриламидном геле с включенным в матрицу казеином с концентрацией 0,1 %. По окончании электрофореза дорожку с маркером отрезали и фиксировали в 5 % ТХУ на протяжении 5 мин. Чтобы удалить SDS из геля, дорожки с опытными пробами инкубировали в течение часа в 2,5 % растворе Triton X-100 при комнатной температуре со встряхиванием, далее в 50 мМ Tris-HCl рН 8,0 для удаления Triton X-100 при тех же условиях. Гель выдерживали в инкубационном буфере 50 мМ Tris-HCl рН 8,0, 200 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂ 18 ч при 50 °С. После инкубации гель окрашивали 0,25 % Кумасси бриллиантовым голубым G-250 (Диаэм, Россия) в течение 3 ч, избыток красителя отмывали в 20 % этаноле и 10 % уксусной кислоте до проявления зон протеолиза в виде светлых полос на синем фоне геля.

Статистический анализ. Все исследования проводились в трехкратной повторности. Статистическую обработку данных осуществляли по стандартным методикам с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2019. Для полученных данных были рассчитаны средние значения (М) и стандартные отклонения (\pm SD).

Результаты и их обсуждение

Выделение и характеристика термофильного штамма-продуцента протеаз. В качестве продуцента внеклеточных гидролаз был взят ранее выделенный из компоста термофильный штамм *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35, показавший высокий уровень синтеза протеаз в предыдущих исследованиях [32]. Для первичной идентификации культуры проводили стандартные микробиологические и биохимические тесты (табл. 2).

Исследования показали, что штамм Кб.12.Гл.35, помимо протеолитических ферментов, продуцирует ряд карбогидраз, в том числе амилазы, целлюлазы, галактоманназы, ксиланазы, арабиногалактаназы.

Таблица 2. Физиолого-биохимическая характеристика термофильного штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35

Table 2. Physiological and biochemical profile of thermophilic strain *Bacillus subtilis* Kб.12.Gl.35

Характеристика	Результат
Морфология клеток	Палочковидная
Окраска по Граму	Грамположительные
Образование эндоспор	+
Подвижность	+
Каталаза	+
Уреаза	–
Образование кислот из углеводов	
Ксилозы	+
Арабинозы	+
Галактозы	–
Фруктозы	+
Маннозы	+
Рамнозы	–
Сорбозы	+
Сахарозы	+
Мальтозы	+
Лактозы	–
Раффинозы	–
Внеклеточные ферментативные активности	
Протеолитическая	+
Амилазная	+
Целлюлазная	+
Глюканазная	+
Маннаназная	+
Ксиланазная	+
Арабиногалактаназная	+

Примечание: «+» – обнаружено; «–» – не обнаружено.

Note: “+” – detected; “–” – not detected.

По результатам проведенного секвенирования гена 16S рРНК штамма Кб.12.Гл.35 было обнаружено более чем 99 % совпадение с типовым штаммом *B. subtilis* 168 (рис. 1).

Скрининг штаммов на наличие генов, кодирующих внеклеточные гидролазы. В качестве мишеней для ПЦР-скрининга были выбраны бациллярные гены, кодирующие внеклеточные протеолитические и амилолитические ферменты. Результаты ПЦР-анализа представлены на рисунке 2.

Согласно полученным данным, термофильный штамм *B. subtilis* Кб.12.Гл.35 имеет потенциальную способность синтезировать внеклеточные сериновые протеазы (AprE, Vpr), металлопротеазы (NprE, Mpr), α -амилазу (AmyE), пуллулазу (AmyX) и α -глюкозидазу (MalL).

Определение активности гидролитических ферментов при культивировании термофилов на средах с растительным сырьем. Для дальнейших исследований в качестве комплексных субстратов использовали растительную муку как основной источник углерода и азота. А дополнительным источником азота, витаминов и микроэлементов являлся традиционный при культивировании микроорганизмов дрожжевой или кукурузный экстракт. Содержание сырого протеина и пищевая ценность использованных субстратов представлены в таблице 3.

Растительная мука, помимо белка, содержит углеводные компоненты, являющиеся резервным источником питания (крахмал) и входящие в состав клеточных стенок (некрахмалистые гомо- и гетерополисахариды – целлюлоза, пектин, маннаны, галактаны,

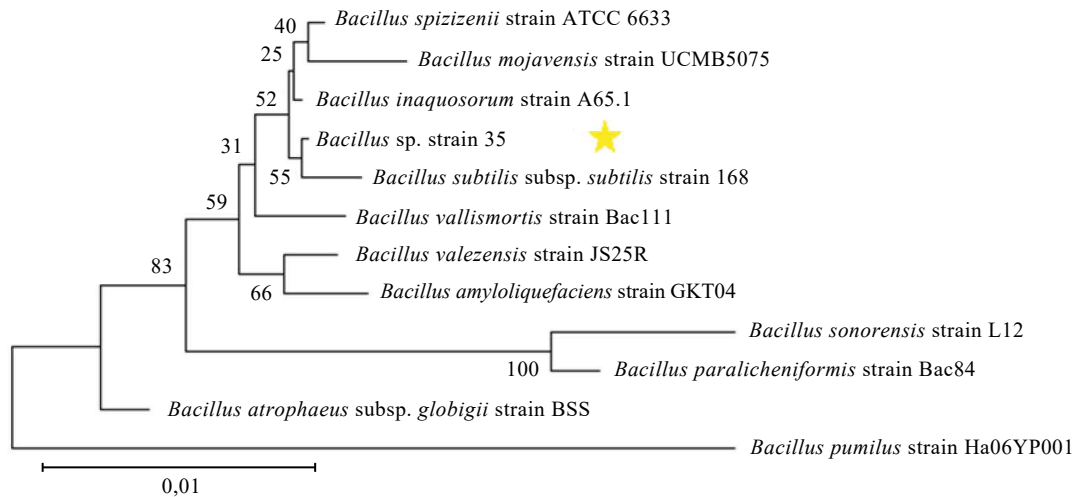


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное методом присоединения соседей на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК термофильного штамма Кб.12.Гл.35 (на схеме обозначен как *Bacillus sp. strain 35*) и типовых штаммов рода *Bacillus*

Figure 1. Phylogenetic tree constructed by neighbor joining based on comparison of nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of the thermophilic strain Kb.12.Gl.35 (*Bacillus sp. strain 35*) and typical genus *Bacillus* strains

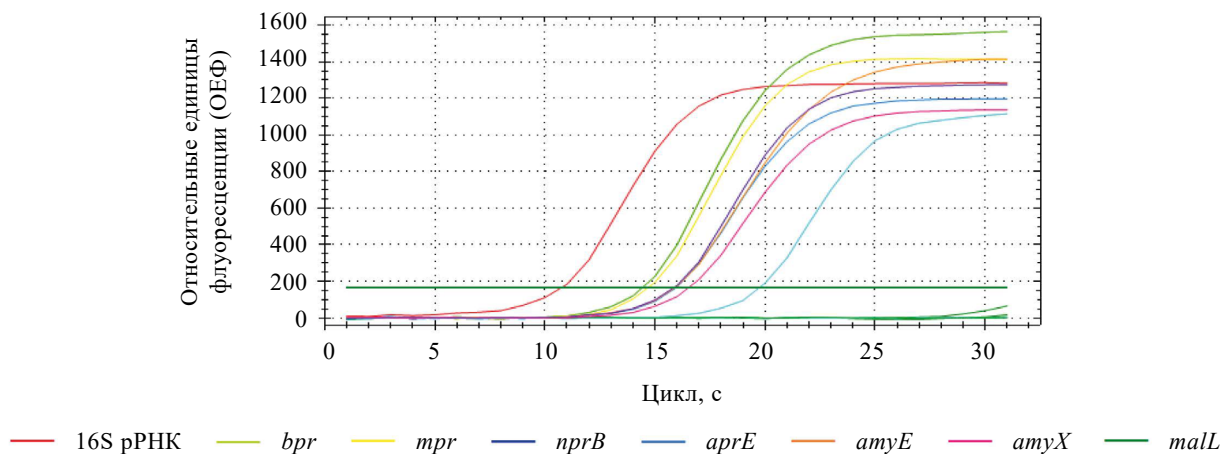


Рисунок 2. Кривые амплификации фрагментов ДНК штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35

Figure 2. Amplification curves of DNA fragments of the *Bacillus subtilis* strain Kb.12.Gl.35

Таблица 3. Содержание основных компонентов в используемых субстратах

Table 3. Major components in plant substrates

Субстрат	Сырой протеин, % от сухих веществ	Пищевая ценность на 100 г продукта*, г		
		Белки	Жиры	Углеводы
Амарантовая мука	7,9	13,5	3,0	61,2
Гороховая мука	18,0	21,0	2,0	49,0
Льняная мука	27,0	25,0	5,0	20,0
Нутовая мука	14,7	22,0	7,0	58,0
Овсяная мука	10,8	13,0	7,0	63,0
Соевая мука	60,1	49,0	1,0	21,7
Смесь на основе амарантовой и соевой муки	29,9	37,0	6,5	38,0
Рисовая мука	4,5	7,0	1,0	79,0
Дрожжевой экстракт	31,7	–	–	–
Кукурузный экстракт	32,8	–	–	–

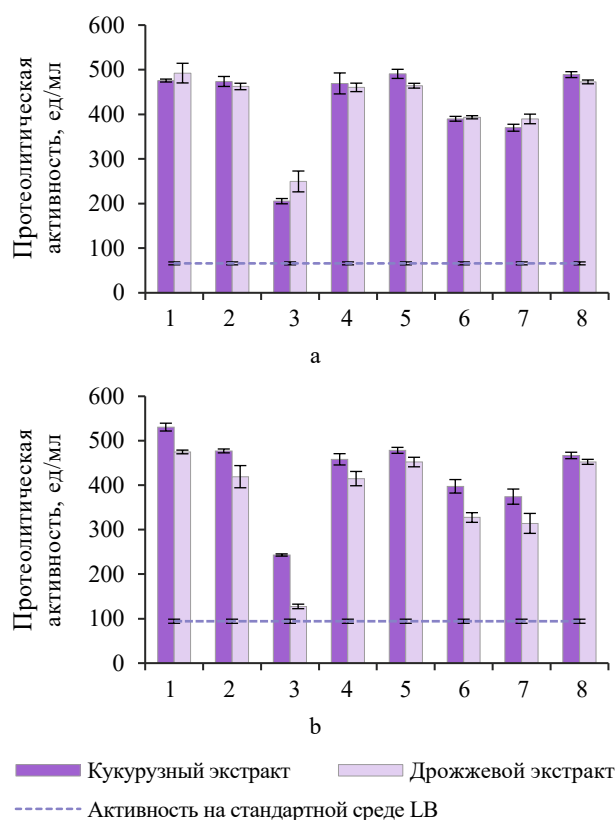
Примечание: * – данные производителя.

Note: * – as reported by the producer.

ксиланы, арабиногалактаны, галактоманнаны, арабиноксиланы и др.). Кукурузный экстракт является побочным продуктом производства крахмала из зерен кукурузы. Экстракт получают путем замачивания кукурузных початков в растворе сернистой кислоты или сульфита натрия, в результате чего происходит высвобождение растворимых бекон, аминокислот, углеводов, витаминов и других веществ [36]. Поскольку карбогидразы относятся к индуцибельным ферментам, можно сделать предположение, что их экспрессия будет зависеть в том числе от углеводного состава сырья.

Предварительные исследования показали, что в случае культивирования термофильного штамма на средах с растительным сырьем, содержащим крахмал, на начальных фазах роста наблюдалось умеренное закисление среды (до pH 6), что приводило к снижению активности внеклеточных протеаз. При внесении в среды с растительной мукой солей $MgSO_4$ и $CaCO_3$ отмечали повышение активности протеаз, максимальная активность была зафиксирована при одновременном применении обеих солей. Это может объясняться буферированием ферментационной среды, а также использованием бактериями катионов металлов в качестве кофакторов для функционирования ферментов. Например, внеклеточные протеазы и амилазы бактерий *B. subtilis* характеризуются наличием в структуре ферментов кальций-связывающих каналов, которые играют важную роль в поддержании термостабильности белковых молекул [37].

На первом этапе исследования определили протеолитическую активность штамма *B. subtilis* Кб.12.Гл.35 спустя 24 и 48 ч роста на комплексных средах (рис. 3). Максимальный синтез протеаз происходил при культивировании на средах с амарантовой, гороховой, нутовой, овсяной и рисовой мукой (более 400 ед/мл культуральной жидкости) относительно стандартной среды LB. Согласно результатам (табл. 3), содержание



1 – Амарантовая мука, 2 – Гороховая мука, 3 – Льняная мука, 4 – Нутовая мука, 5 – Овсяная мука, 6 – Соевая мука, 7 – Смесь на основе амарантовой и соевой муки, 8 – Рисовая мука

Рисунок 3. Протеолитическая активность термофильного штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35 спустя 24 (а) и 48 ч (б) культивирования на средах с растительной мукой и кукурузным или дрожжевым экстрактом

Figure 3. Proteolytic activity of *Bacillus subtilis* Kб.12.Gl.35 after 24 (a) and 48 h (b) of cultivation on media with plant flour and corn or yeast extract

сырого протеина в данных субстратах варьировалось от 4,5 до 18,0 %. Соевая и льняная мука, с более высоким содержанием сырого протеина, снижала синтез протеаз. Через сутки культивирования замена дрожжевого экстракта на кукурузный влияла на активность протеаз незначительно. Однако спустя 48 ч наблюдалось снижение активности протеаз при росте продуцента на среде с дрожжевым экстрактом и растительной мукой любого типа. Используемые экстракты близки по содержанию сырого протеина (табл. 3). Кукурузный экстракт содержит некоторое количество углеводов в виде моносахаридов, олигосахаридов и декстринов. Тем не менее в ходе исследований не было зафиксировано явления катаболитной репрессии, что может объясняться постепенным гидролизом сложных углеводов без образования избытка моносахаридов в питательной среде. Наличие в средах углеводов в кукурузном экстракте могло замедлить переход культуры в стационарную фазу, в отличие от роста на средах с дрожжевым экстрактом, что способствовало сохранению биосинтетической активности клеток.

На следующем этапе исследования провели определение активности карбогидраз: амилаз, галактоманназа, арабиногалактаназа и ксиланаза. Высокое содержание крахмала характерно для зерен кукурузы, пшеницы, ячменя, риса; низкое – для соевой и льняной муки [38–40]. На рисунке 4 представлены результаты измерения амилазной активности комплекса внеклеточных гидролаз штамма *B. subtilis* Кб.12.Гл.35.

Полученные значения амилазной активности на первые сутки культивирования частично соотносятся с содержанием крахмала в выбранных видах муки – максимальная активность амилаз была зафиксирована на средах с овсяной, рисовой и нутовой мукой. Наличие в ферментационной среде кукурузного экстракта практически во всех вариантах провоцировало более высокую амилазную активность культураль-

ной жидкости на 24 ч роста культуры, по сравнению с дрожжевым экстрактом. Спустя 48 ч синтез амилаз на средах с дрожжевым экстрактом значительно снизился – в ряде сред активность амилаз оказалась ниже, чем при росте на стандартной среде LB. Более высокая амилолитическая активность в случае культивирования на средах с кукурузным экстрактом может быть связана с содержанием в нем декстринов и мальто-олигосахаридов, которые могут выступать дополнительными индукторами синтеза амилаз.

Проанализирована амилолитическая активность, активность ряда гемицеллюлаз, в том числе гидролаз гексозанов и пентозанов. При росте штамма Кб.12.Гл.35 на амарантовой муке в комбинации с кукурузным экстрактом наблюдалась самая высокая суммарная гидролитическая активность по отношению к галактоманнану, арабиногалактану и ксилану (рис. 5–7).

Арабиноксилан и арабиногалактан – смешанные полисахариды из зерен амаранта [41]. Их присутствие в среде могло усилить у штамма экспрессию генов ксиланаза, арабиназа и манназа. Основной полисахарид клетчатки риса – арабиноксилан и глюкуроноарабиноксилан, а также в ее состав входит глюкоманнан, что, предположительно, могло индуцировать синтез соответствующих гемицеллюлаз. Нутовая и гороховая мука характеризуются высоким содержанием арабинана и смешанных полисахаридов арабиногалактуронана, рамногалактуронана и ксилоглюкана [42]. Их наличие может обуславливать высокую арабиногалактаназную и ксиланазную активность комплекса гидролаз, синтезируемых спустя сутки культивирования. Соевая мука также содержит некрахмалистые полисахариды, галактуронаны, арабиногалактуронаны, арабинаны и характеризуется небольшим содержанием маннанов (до 1,61 %) [43, 44], это может объяснять невысокие уровни синтеза галактоманназа. При использовании льняной муки умеренная активность гемицеллюлаз

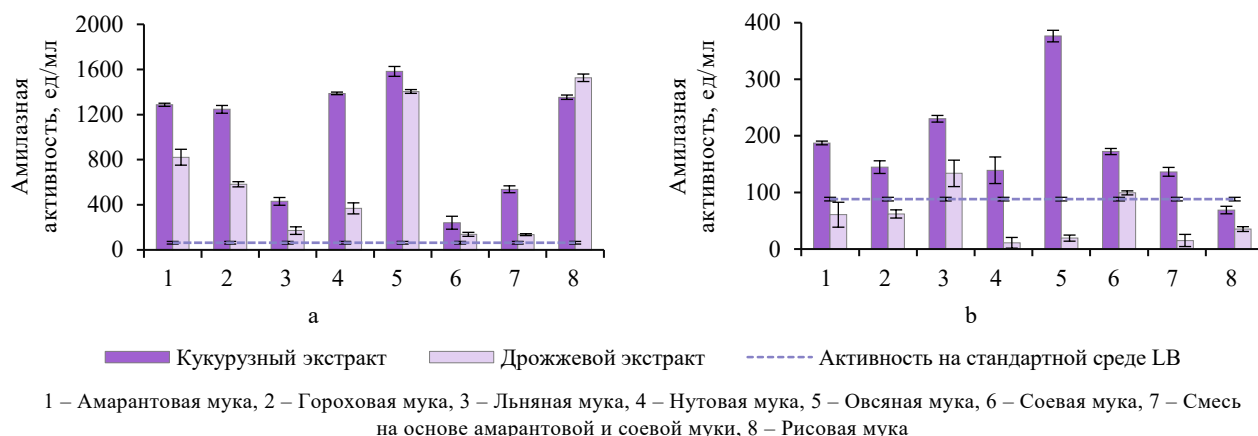


Рисунок 4. Амилазная активность термофильного штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35 спустя 24 (а) и 48 ч (б) культивирования на средах с растительной мукой и кукурузным или дрожжевым экстрактом

Figure 4. Amylase activity of *Bacillus subtilis* Kб.12.Gl.35 after 24 (a) and 48 h (b) of cultivation on media with plant flour and corn or yeast extract

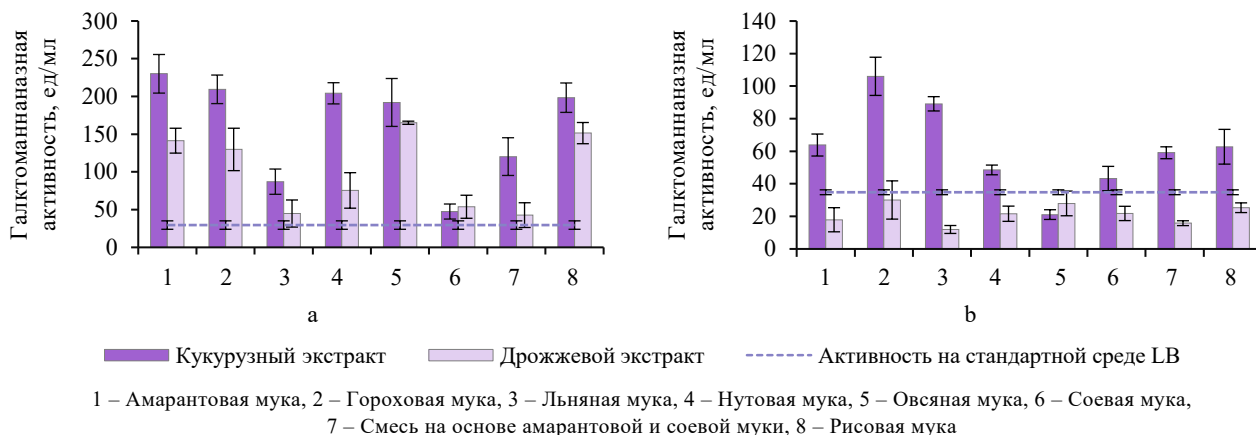


Рисунок 5. Галктоманнаназная активность термофильного штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35 спустя 24 (а) и 48 ч (б) культивирования на средах с растительной мукой и кукурузным или дрожжевым экстрактом

Figure 5. Galactomannase activity of *Bacillus subtilis* Kb.12.Gl.35 after 24 (a) and 48 h (b) of cultivation on media with plant flour and corn or yeast extract

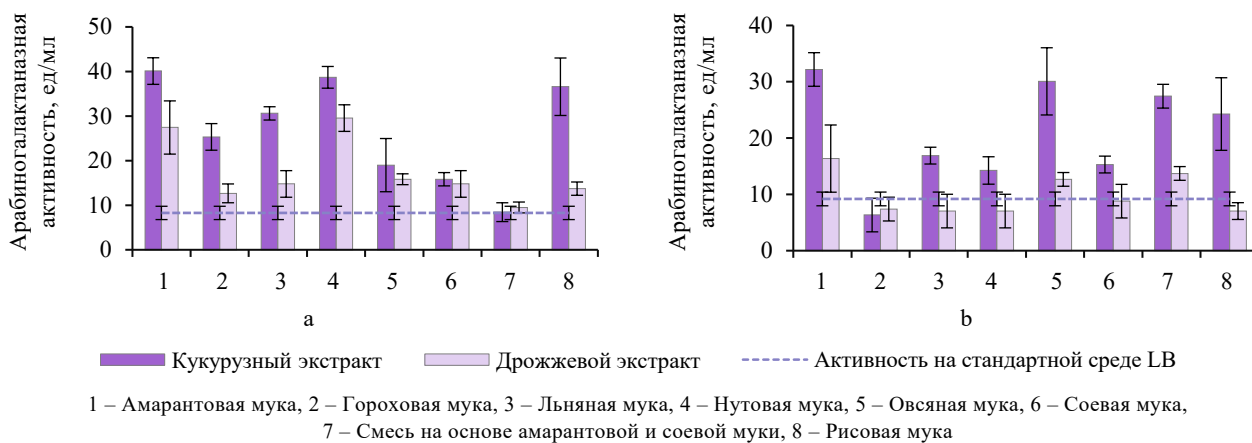


Рисунок 6. Арабиногалактаназная активность термофильного штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35 спустя 24 (а) и 48 ч (б) культивирования на средах с растительной мукой и кукурузным или дрожжевым экстрактом

Figure 6. Arabinogalactanase activity of *Bacillus subtilis* Kb.12.Gl.35 after 24 (a) and 48 h (b) of cultivation on media with plant flour and corn or yeast extract

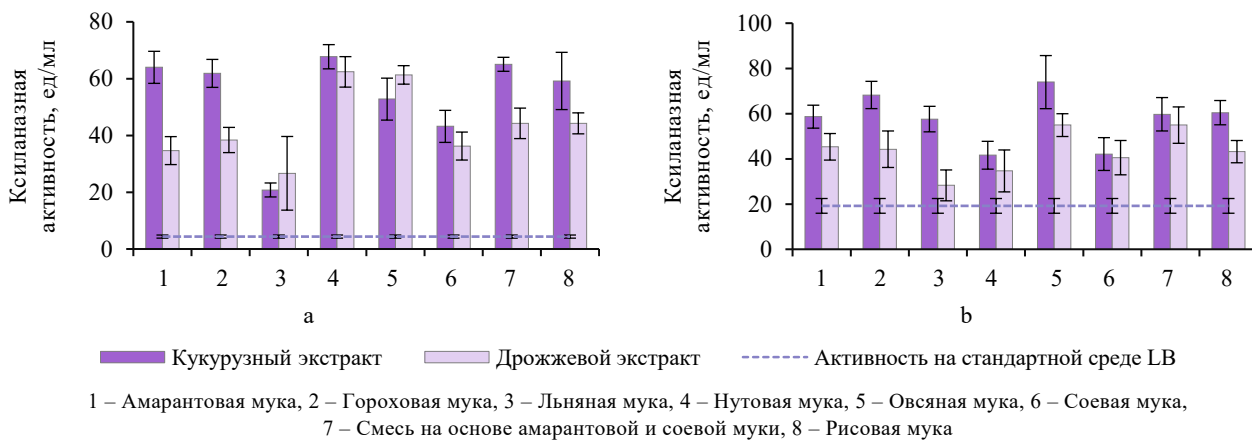


Рисунок 7. Ксиланазная активность термофильного штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35 спустя 24 (а) и 48 ч (б) культивирования на средах с растительной мукой и кукурузным или дрожжевым экстрактом

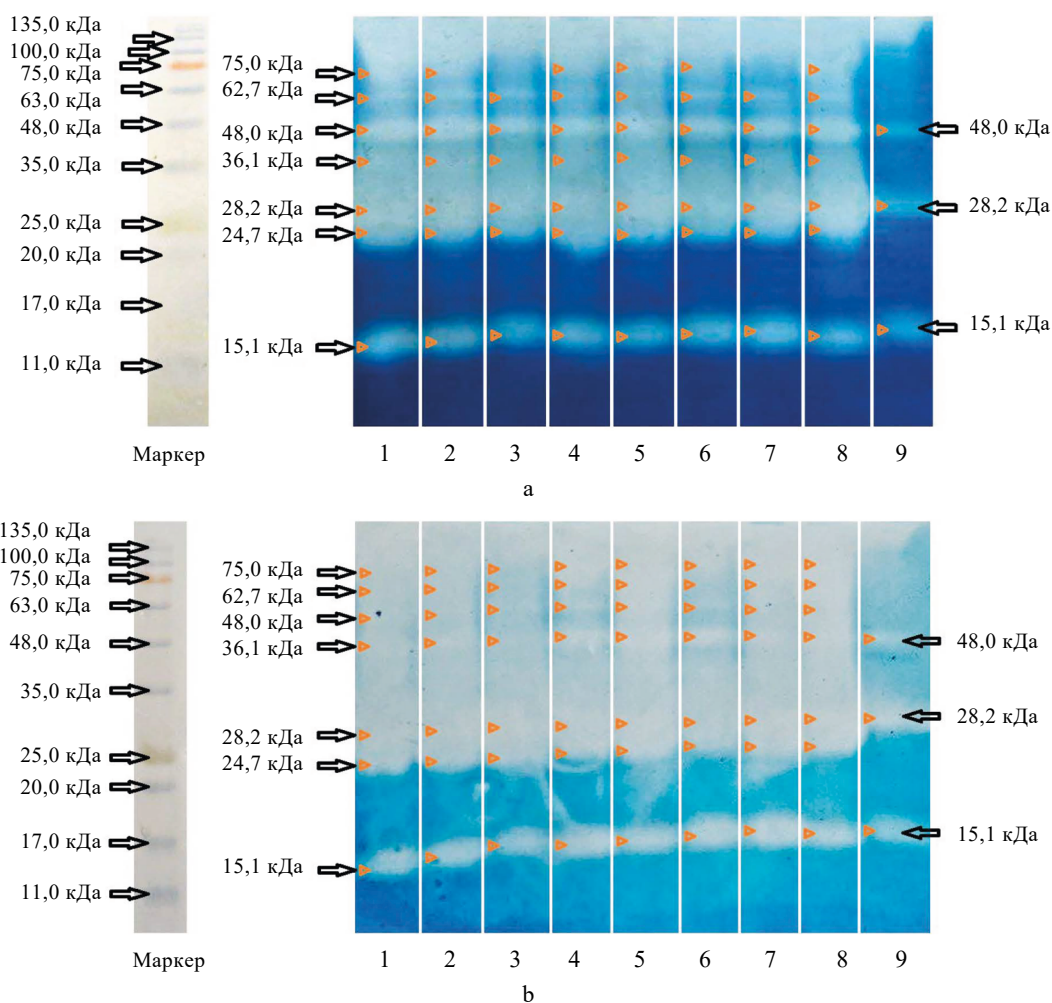
Figure 7. Xylanase activity of *Bacillus subtilis* Kb.12.Gl.35 after 24 (a) and 48 h (b) of cultivation on media with plant flour and corn or yeast extract

по отношению к арабиногалактану и низкая к остальным некрахмалистым углеводам может быть обусловлена полисахаридным составом семян льна, включающим рамногалактуронан и арабиноксилан [45].

В ряде случаев резкое снижение уровня амилаз на 48 ч культивирования штамма фиксировалось одновременно с небольшим снижением активности других карбогидраз. Вероятно, причина в частичном переключении метаболизма с потребления крахмала и продуктов его деструкции – мальтозы и глюкозы, на утилизацию некрахмалистых углеводов. Данное явление хорошо наблюдалось при росте штамма *B. subtilis* Кб.12.Гл.35 на средах с кукурузным экстрактом, на основании чего было сделано предположение: олигосахариды, присутствующие в кукурузном экстракте, например, ксилоолигосахариды и арабиноолигосахариды [46], могут выступать индуктором синтеза гemicеллюлаз.

Зимографический профиль протеолитических ферментов при культивировании на средах с растительным сырьем. В ходе изучения пула внеклеточных протеаз термофильного штамма *B. subtilis* Кб.12.Гл.35 обнаружено, что при росте на стандартной среде LB в течение 24 ч в культуральной жидкости наблюдается активность минимум трех протеолитических ферментов с массами 15,1; 28,2 и 48,0 кДа (рис. 8).

При выращивании штамма-продуцента на средах с растительным сырьем получен более представительный профиль ферментов с протеолитической активностью. В случае использования в качестве дополнительного источника азота дрожжевого экстракта в комбинации с растительной мукой экзопротеазный профиль практически идентичен для всех видов используемой муки и характеризовался наличием до семи отдельных ферментов с массами от 15,1 до 75,0 кДа. В ходе



1 – Амарантовая мука, 2 – Гороховая мука, 3 – Льняная мука, 4 – Нутовая мука, 5 – Овсяная мука, 6 – Соевая мука, 7 – Смесь на основе амарантовой и соевой муки, 8 – Рисовая мука

Рисунок 8. Зимограмма внеклеточных протеаз штамма *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35 при культивировании на средах с растительной мукой в комбинации с дрожжевым (а) или кукурузным (б) экстрактом и на стандартной среде LB

Figure 8. Zymogram of extracellular proteases of *Bacillus subtilis* Kб.12.Gл.35 on media with plant flour in combination with yeast (a) or corn (b) extract vs. standard LB medium

анализа протеаз культуральной жидкости, полученной при выращивании штамма на среде с кукурузным экстрактом, был выявлен набор ферментов с аналогичными молекулярными массами, также обнаружены отличия в синтезе отдельных протеаз. Например, при использовании льняной и соевой муки секреция протеазы массой 48,0 кДа была снижена, а протеаза массой 62,7 кДа в культуральной жидкости практически отсутствовала. Согласно данным зимографического исследования (рис. 8), наибольшее количество протеаз в культуральной жидкости наблюдалось при применении гороховой, овсяной, рисовой муки в комбинации с кукурузным экстрактом. Это соотносится с данными протеолитической активности по казеину (рис. 3).

Данные исследования F. Xie *et al.* [47] и результаты проведенного скрининга генома штамма Кб.12. Гл.35 (рис. 2) позволяют предположить, что протеаза массой 28,2 кДа принадлежит семейству субтилизинов – протеаз, за продукцию которых отвечает ген *aprE*, а протеаза 36,1 кДа – нейтральная протеаза – продукт экспрессии гена *nprE*. Некоторые из обнаруженных ферментов могут являться продуктами экспрессии гена *bpr*, обнаруженного у штамма *B. subtilis* Кб.12.Гл.35, поскольку процессинг предшественника *Bpr*, или бациллопептидазы F, приводит к образованию ферментов с различной молекулярной массой. Например, X. C. Wu *et al.* идентифицировали протеазы *Bpr* с массами 80, 68, 50 и 48 кДа [48]. Y. Ning *et al.* обнаружили протеазы *Bpr* с массами от 11 до 75 кДа [49].

Так как у штамма *B. subtilis* Кб.12.Гл.35 был обнаружен ген *bpr*, ферменты с массами 48,0–75,0 кДа можно предварительно отнести к продуктам процессинга данного гена. На дорожке зимограммы протеолитического комплекса, полученного на стандартной среде LB, проявилась одна полоса предполагаемого продукта процессинга белка *Bpr* – 48,0 кДа, а на средах с растительным сырьем наблюдалась активность более крупных протеаз и белок массой 24,7 кДа.

Секреция внеклеточных протеаз также варьируется в зависимости от фазы роста культуры. Более крупные предшественники в ходе роста культуры могут подвергаться ограниченному протеолизу с образованием активных белков с более низкой молекулярной массой [50]. Можно предположить, что состав среды оказывает влияние на созревание внеклеточных протеаз, т. к. при изменении состава питательной среды может изменяться как уровень экспрессии отдельных генов, так и продолжительность фаз роста продуцента. Поскольку в среде с растительным сырьем содержатся полисахариды, пролонгирование экспоненциальной фазы роста и наличие трудноутилизуемых по сравнению с триптоном белков могло привести к образованию разнообразных активных предшественников и зрелых протеаз, обладающих максимальной активностью в разные промежутки времени.

Наибольший вклад в протеолитическую активность, по-видимому, вносят ферменты с массой 24,7–28,2 кДа, а также протеазы с массой 62,7–75,0 кДа, поскольку их активность ярко представлена в варианте с использованием растительного сырья, в отличие от среды LB. Секреция протеазы массой 15,1 кДа на растительном сырье по сравнению со стандартной средой отличалась незначительно.

Выводы

Термофильный штамм *Bacillus subtilis* Кб.12.Гл.35, продуцирующий комплекс гидролитических ферментов (протеаз, амилаз, галактоманназ, арабиногалактаназ, ксиланаз), идентифицирован и охарактеризован с биохимической точки зрения. Изучены особенности синтеза гидролитических ферментов (протеаз, амилаз и гемицеллюлаз) на средах, содержащих комплексное растительное сырье. Подобраны перспективные источники углерода для синтеза протеаз и амилаз – амарантовая, гороховая, нутовая, овсяная и рисовая мука; для синтеза маннаназ, ксиланаз и арабиногалактаназ – амарантовая, гороховая и нутовая мука. Показано повышение синтеза внеклеточных гидролаз при использовании в качестве источника азота кукурузного экстракта по сравнению с дрожжевым. Рассмотрен профиль внеклеточных протеаз при культивировании штамма *B. subtilis* Кб.12.Гл.35 на растительном сырье – комплекс протеаз включал семь отдельных ферментов с массами от 15,1 до 75,0 кДа.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшей оптимизации условий культивирования и питательной среды с целью получения термостабильных гидролаз как в виде индивидуальных ферментов, так и мультиэнзимных композиций с широким потенциалом применения в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, а также при производстве детергентов.

Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Идея и анализ – М. В. Романова. Руководство работой – А. В. Белодед.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

The authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for the information published in this article. M.V. Romanova designed the research and analysis. A.V. Beloded supervised the research.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы / References

1. Mokrani S, Nabti EH. Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*. 2024;10(1):006–020. <https://doi.org/10.17352/2455-815x.000202>
2. Tripathi P, Sinha S. Industrial biocatalysis: An insight into trends and future directions. *Current Sustainable/Renewable Energy Reports*. 2020;7:66–72. <https://doi.org/10.1007/s40518-020-00150-8>
3. Meghwanshi GK, Kaur N, Verma S, Dabi NK, Vashishtha A, et al. Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2020;67(4):586–601. <https://doi.org/10.1002/bab.1919>
4. Shukla P. Synthetic biology perspectives of microbial enzymes and their innovative applications. *Indian Journal of Microbiology*. 2019;59(4):401–409. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00819-9>
5. Singh RS, Singh T, Pandey A. Microbial enzymes—An overview. In: Singh RS, Singhania RR, Pandey A, Larroche C, editors. *Advances in Enzyme Technology*. MA: Elsevier; 2019. pp. 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7>
6. Zhang Y, Geary T, Simpson BK. Genetically modified food enzymes: A review. *Current Opinion in Food Science*. 2019;25:14–18. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.01.002>
7. Burkhardt C, Baruth L, Meyer-Heydecke N, Klippel B, Margaryan A, et al. Mining thermophiles for biotechnologically relevant enzymes: Evaluating the potential of European and Caucasian hot springs. *Extremophiles*. 2023;28:5. <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01321-3>
8. Thapa S, Li H, OHair J, Bhatti S, Chen F-C, et al. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*. 2019;61:579–601. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>
9. Atalah J, Cáceres-Moreno P, Espina G, Blamey JM. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*. 2019;280:478–488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
10. Kumar S, Dangi AK, Shukla P, Baishya D, Khare SK. Thermozymes: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresource Technology*. 2019;278:372–382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.088>
11. Han H, Ling Z, Khan A, Virk AK, Kulshrestha S, et al. Improvements of thermophilic enzymes: From genetic modifications to applications. *Bioresource Technology*. 2019;279:350–361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.087>
12. Ajeje SB, Hu Y, Song G, Peter SB, Afful RG, et al. Thermostable cellulases / xylanases from thermophilic and hyperthermophilic microorganisms: Current perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:794304. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794304>
13. Verma J, Sourirajan A, Dev K. Bacterial diversity in 110 thermal hot springs of Indian Himalayan Region (IHR). *3 Biotech*. 2022;12:238. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03270-8>
14. Finore I, Feola A, Russo L, Cattaneo A, di Donato P, et al. Thermophilic bacteria and their thermozymes in composting processes: A review. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2023;10:7. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00381-z>
15. Romanova MV, Dolbunova AN, Epishkina YuM, Evdokimova SA, Kozlovskiy MR, et al. A thermophilic L-lactic acid producer of high optical purity: Isolation and identification. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(1):101–109. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-1-591>
16. Kambourova M. Thermostable enzymes and polysaccharides produced by thermophilic bacteria isolated from Bulgarian hot springs. *Engineering in Life Sciences*. 2018;18(11):758–767. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800022>
17. Liang Q, Zhan Y, Yuan M, Cao L, Zhu C, et al. Improvement of the catalytic ability of a thermostable and acidophilic β -mannanase using a consensus sequence design strategy. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:722347. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722347>
18. Tan S, Tao X, Zheng P, Chen P, Yu X, et al. Thermostability modification of β -mannanase from *Aspergillus niger* via flexibility modification engineering. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14:1119232. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1119232>
19. Solanki P, Putatunda C, Kumar A, Bhatia R, Walia A. Microbial proteases: Ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*. 2021;11:428. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>
20. Herrera-Márquez O, Fernández-Serrano M, Pilamala M, Jácome MB, Luzón G. Stability studies of an amylase and a protease for cleaning processes in the food industry. *Food and Bioproducts Processing*. 2019;117:64–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.06.015>
21. Velázquez-De Lucio BS, Hernández-Domínguez E, Villa-García M, Díaz-Godínez G, Mandujano-González V, et al. Exogenous enzymes as zootechnical additives in animal feed: A review. *Catalysts*. 2021;11(7):851. <https://doi.org/10.3390/catal11070851>
22. Nagarajan DR, Krishnan C. Use of a new catabolite repression resistant promoter isolated from *Bacillus subtilis* KCC103 for hyper-production of recombinant enzymes. *Protein Expression and Purification*. 2010;70(1):122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.09.020>

23. Xiao F, Li Y, Zhang Y, Wang H, Zhang L, *et al.* A new CcpA binding site plays a bidirectional role in carbon catabolism in *Bacillus licheniformis*. *iScience*. 2021;24(5):102400. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102400>
24. Sun B, Zou K, Zhao Y, Tang Y, Zhang F, *et al.* The fermentation optimization for alkaline protease production by *Bacillus subtilis* BS-QR-052. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14:1301065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1301065>
25. Naik B, Kumar V, Rizwanuddin S, Chauhan M, Gupta AK, *et al.* Agro-industrial waste: A cost-effective and eco-friendly substrate to produce amylase. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2023;5:30. <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00143-2>
26. Bhangе K, Chaturvedi V, Bhatt R. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnology Reports*. 2016;10:94–104. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.007>
27. Su Y, Liu C, Fang H, Zhang D. *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*. 2020;19:173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
28. Baweja M, Tiwari R, Singh PK, Nain L, Shukla P. An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: Functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:01195. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01195>
29. Abd-Elhalim BT, Gamal RF, El-Sayed SM, Abu-Hussien SH. Optimizing alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* on bread waste for effective industrial wastewater treatment and textile desizing through response surface methodology. *Scientific Reports*. 2023;13:19216. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46384-6>
30. Devi S, Dwivedi D, Bhatt AK. Utilization of agroresidues for the production of xylanase by *Bacillus safensis* XPS7 and optimization of production parameters. *Fermentation*. 2022;8(5):221. <https://doi.org/10.3390/fermentation8050221>
31. Srivastava PK, Kapoor M. Cost-effective endo-mannanase from *Bacillus* sp. CFR1601 and its application in generation of oligosaccharides from guar gum and as detergent additive. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2014;44(4):392–417. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.833108>
32. Романова М. В., Кузнецов А. Е., Белодед А. В. Молекулярно-биологическая и биохимическая характеристика внеклеточных протеаз термофильных бактериальных штаммов. *Бутлеровские сообщения*. 2021. Т. 68. № 12. С. 103–111. [Romanova MV, Kuznetsov AYe, Beloded AV. Molecular biological and biochemical characteristics of extracellular proteases of thermophilic bacterial strains. *Butlerov Communications*. 2021;68(12):103–111. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/LBSMNK>
33. de Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Vol. 3. NY: Springer; 2009. pp. 21–128. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_3
34. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021;38(7):3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
35. Oliver GW, Stetler-Stevenson WG, Kleiner DE. Zymography, casein zymography, and reverse zymography: Activity assays for proteases and their inhibitors. In: Sterchi EE, Stöcker W, editors. *Proteolytic enzymes*. Berlin: Springer Lab Manual; 1999. pp. 63–76. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59816-6_5
36. Гольдштейн В., Лукин Н., Радин О. Кукурузный экстракт в кормах. *Комбикорма*. 2022. № 3. С. 45–46. [Goldshstein V, Lukin N, Radin O. Corn extract in feeds. *Compound Feeds*. 2022;(3):45–46. (In Russ.)] <https://doi.org/10.25741/2413-287X-2022-03-3-170>
37. Harwood CR, Kikuchi Y. The ins and outs of *Bacillus* proteases: Activities, functions and commercial significance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2022;46(1):fuab046. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab046>
38. Al-Attar H, Ahmed J, Thomas L. Rheological, pasting and textural properties of corn flour as influenced by the addition of rice and lentil flour. *LWT*. 2022;160:113231. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113231>
39. Filipović J, Ivkov M, Košutić M, Filipović V. Ratio of omega-6/omega-3 fatty acids of spelt and flaxseed pasta and consumer acceptability. *Czech Journal of Food Sciences*. 2016;34(6):522–529. <https://doi.org/10.17221/384/2015-CJFS>
40. Agume ASN, Njintang NY, Mbofung CMF. Effect of soaking and roasting on the physicochemical and pasting properties of soybean flour. *Foods*. 2017;6(2):12. <https://doi.org/10.3390/foods6020012>
41. Malik M, Sindhu R, Dhull SB, Bou-Mitri C, Singh Y, *et al.* Nutritional composition, functionality, and processing technologies for amaranth. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2023;2023(1):1753029. <https://doi.org/10.1155/2023/1753029>
42. Noguchi M, Hasegawa Y, Suzuki S, Nakazawa M, Ueda M, *et al.* Determination of chemical structure of pea pectin by using pectinolytic enzymes. *Carbohydrate Polymers*. 2020;231:115738. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115738>
43. Karki B, Maurer D, Kim TH, Jung S. Comparison and optimization of enzymatic saccharification of soybean fibers recovered from aqueous extractions. *Bioresource Technology*. 2011;102(2):1228–1233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.004>
44. Hsiao H-Y, Anderson DM, Dale NM. Levels of β -mannan in soybean meal. *Poultry Science*. 2006;85(8):1430–1432. <https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1430>

45. Ray S, Paynel F, Morvan C, Lerouge P, Driouich A, et al. Characterization of mucilage polysaccharides, arabinogalactanproteins and cell-wall hemicellulosic polysaccharides isolated from flax seed meal: A wealth of structural moieties. *Carbohydrate Polymers*. 2013;93(2):651–660. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.034>
46. Yan F, Tian S, Chen H, Gao S, Dong X, et al. Advances in xylooligosaccharides from grain byproducts: Extraction and prebiotic effects. *Grain & Oil Science and Technology*. 2022;5(2):98–106. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.02.002>
47. Xie F, Feng F, Liu D, Quan S, Liu L, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* 35M can exclusively produce and secrete proteases when cultured in soybean-meal-based medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022;209(Part 2):112188. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112188>
48. Wu XC, Nathoo S, Pang A, Carne T, Wong S. Cloning, genetic organization, and characterization of a structural gene encoding bacillopeptidase F from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(12):6845–6850. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)39225-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)39225-7)
49. Ning Y, Yang H, Weng P, Wu Z. Analysis and identification of the extracellular proteases from *Bacillus velezensis* SW5. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2021;57:S27–S37 <https://doi.org/10.1134/S0003683821100082>
50. Yoo JY, Yao Z, Lee SJ, Jeon HS, Kim JH. Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme gene, aprECJ1, from *Bacillus velezensis* CJ1 isolated from *Myeolchi Jeotgal*. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2021;49(3):289–297. <https://doi.org/10.48022/mbl.2104.04012>