

BACILLUS SPP. ШТАММДАРЫН ТОПЫРАҚ БИОЦЕНОЗДАРЫНАН БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ФИТАЗАЛЫҚ АКТИВТІЛІККЕ СКРИНИНГТЕУАстраханов М.¹ , Балтин К.¹ , Бижанова Б.² , МаксUTOва К.² , Хасенов Б.^{1,3} ¹ «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС. Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана қ., 010000.² «Еуразия Ұлттық университеті» КеАҚ. Сәтбаев к-сі, 2, Астана қ., 010000.³ «GenLab» ЖШС. М.Габдуллина к., 19/1. Қазақстан, Астана, 010000.

*khassenov@biocenter.kz

ТҮЙІН

Фосфор жоғары және төмен энергетикалық фосфаттардың, нуклеин қышқылдарының құрамына кіреді, ақуыз, фосфолипидтер, метаболитикалық ферменттер және жасушаішілік буферлер синтезі үшін қажет. Сондықтан барлық азықтарда фосфор сіңімді түрде болуы керек. Өсімдік жемінде шамамен 60-90% фосфор фитин қышқылы және оның тұздары - фитаттар түрінде болады, олар антикоректік қасиеттерге ие, бұл қарапайым асқазанды жануарларды: құстарды, шошқаларды, балықтарды ұстауға әсер етеді. Құс фабрикаларының, шошқа фермаларының және тоған шаруашылықтарының құрамында фосфор бар қалдықтары болып табылатын фитаттар экологиялық жағдайға теріс әсер етеді. Мио-инозитол фосфогидролазалар болып табылатын фитазалар фитин қышқылының монофосфатқа және аралық мио-инозитолфосфатқа гидролизін катализдейді, бұл бірден үш мәселені шешуге мүмкіндік береді: жемшөп фосфорына деген қажеттілікті жою, жемшөптің антикоректілігін азайту және экологиялық жағдайды жақсарту. Ақмола, Түркістан, Қызылорда және Жамбыл облыстарының аумағынан жиналған топырақ үлгілерінен *Cytobacter oceaansediminis*, *Peribacillus simplex*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus paralicheniformis* түрлеріне жататын микроорганизмдердің 10 изоляты бөлінді. Зерттеулер көрсеткендей, олардың ішінен 9 штамм фитин қышқылын гидролиздеуге қабілетті, бұл олардың фитазалық активтілігінің болуын көрсетеді. Олардың ішінен зерттеуге *Bacillus mojavensis* SH1 және *Bacillus megaterium* IPOЛ штаммдары таңдап алынды. Биохимиялық қасиеттерін зерттеу көрсеткендей, *B. mojavensis* SH1 фитазасы 30-37°C температура диапазонында және рН 8,0 активті, ал *B. megaterium* IPOЛ фитазасы 60°C және рН 4,0-7,0 активті. Фитазалық активтілік *B. mojavensis* SH1, *B. megaterium* IPOЛ штаммдары үшін тиісінше $0,34 \pm 0,03$ және $0,34 \pm 0,02$ Бір/мл құрады. Алынған нәтижелер *B. mojavensis* SH1 және *B. megaterium* IPOЛ штаммдарын фитаза продуценті ретінде пайдаланудың перспективтілігін көрсетеді.

Кілтті сөздер: Фитазалар, *Bacillus*, Активтілік, Бактерия, Фосфор, Штамм.**КІРІСПЕ**

Фосфор әртүрлі метаболитикалық процестерде маңызды рөл атқарады. Ол жоғары энергетикалық және төмен энергетикалық фосфаттардың, нуклеин қышқылдарының құрамына кіреді, ақуыз, фосфолипидтер, метаболитикалық ферменттер және қышқыл-негіздік тепе-теңдікті қамтамасыз ететін және қаңқаның минералдануын қолдайтын жасушаішілік буферлердің синтезіне қатысады [1]. Көбінесе ауыл шаруашылығы жануарлары үшін ақуыз, дәрумендер мен минералдардың негізгі көзі болып табылатын өсімдік тектес азықтарда шамамен 60-90% фосфор фитин қышқылы (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат) немесе оның тұздары - фитаттар түрінде болады [2]. Құстар, шошқалар, балықтар сияқты моногастрийлік жануарлар өсімдік фитаттарынан фосфат иондарын босататын фермент - фитазаны өндіруге қабілетсіз. Құстар мен шошқаларда фосфор тапшылығын болдырмау үшін фермерлер құрамында фосфор бар азықтық қоспаларды пайдалана алады, алайда бұл азық құнын айтарлықтай арттырады. Сонымен қатар, бейорганикалық фосфордың әлемдік қоры шектеулі және тауық етін өндіру көлемінің ұлғаюын ескере отырып, оларды жемдік қоспа ретінде шамадан тыс пайдалану фосфор дағдарысының пайда болуына ықпал етуі мүмкін [3]. Фитин қышқылының экскрециясы қоршаған ортаның ластануына, атап айтқанда эвтрофикацияға себеп болады [4-6], бұл экологиялық проблеманы да тудырады.

Фитин қышқылы мен фитаттар антикоректік қасиетке ие екені белгілі теріс зарядталған фитаттар кальций, темір, марганец, мырыш, калий және магний катиондарын байланыстырып олардың биожетімділігін төмендетеді [3]. Фитин қышқылы оң зарядталған ақуыздармен, соның ішінде ас қорыту ферменттерімен ерімейтін қосылыстар жасайтыны анықталды, бұл соңғысының активтілігін төмендетеді және олардың секрециясының жоғарылауына әкеледі. Фитат-ақуыздардың өзара әрекеттесуі жануарлардың аминқышқылдарын сіңіруінің төмендеуінің себептерінің біріне айналады [3]. Өсімдік рационында фитин қышқылының мөлшерін азайту бейорганикалық фосфорды қосуға қарағанда антикоректік қасиеттердің болу проблемасын тиімдірек шешуге мүмкіндік береді. Осы мақсатта жібіту, өсіру, пісіру сияқты әртүрлі стратегиялар қолданылуы мүмкін. Алайда, олардың барлығының бірқатар кемшіліктері бар, олардың ішінде минералдар мен басқа да қоректік заттардың жоғалуы. Жемшөпті экзогенді ферменттермен дефитиндеу өнімді жинап алғаннан кейінгі өңдеу тәсілдерінің ішіндегі ең тиімдісі екенін көрсетті. Бұл фитазаларды ең көп қолданылатын азықтық ферменттерге айналдырды.

Фитазалар (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфатфосфогидролазалар: ФК 3.1.3.8 және ФК 3.1.3.26) фитин қышқылының монофосфатқа және аралық мио-инозитолфосфатқа гидролизін катализдейді. Ферментативті реакция барысында фитаттың сатылы дефосфор-

лануы жүреді [7]. Фитазалардың көзі бактериялар [8, 9], саңырауқұлақтар [10, 11], өсімдіктер [12, 13] және жануарлар [14, 15] болуы мүмкін. 1991 жылы нарыққа азықтық қоспа ретінде ұсынылған алғашқы коммерциялық фитаза *Aspergillus niger* өндіретін Natuphos саңырауқұлақ фитазасы болды [16]. Содан кейін 1999 жылы *Escherichia coli*-ден алынған AppA бактериялық фитазасының сипаттамалары зерттелді [17]. Ферменттің бұл нұсқасы жоғары ерекшелік пен активтілікке ие болып шықты, қышқыл рН мәндерінде оптимумға ие, бірақ бұл ферменттердің екеуі де бейтарап және/немесе сілтілік жағдайларда активті емес. Сонымен қатар, *Bacillus* туысының өкілдері арасында көптеген штаммдардың сілтілі екендігі белгілі [18]. Бұл жұмыстың мақсаты *Bacillus* туысының өкілдері арасында бактериялық фитазалардың жаңа көздерін іздеу болды. Бациллярлық штаммдарды бөліп алу және идентификациялау, фитазалық активтілікке скрининг жүргізу жұмыстары жүргізілді. Экстрацеллюлярлы бациллярлық фитазалардың негізгі биохимиялық көрсеткіштері анықталды.

2. МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР

2.1 Қоректік орталар

Жұмыста келесі қоректік орталар қолданылды: Миллер ортасы (1% триптон, 0,5% ашытқы сығындысы, 0,5% NaCl, pH 7,0), қоректік сорпа (0,5% ет пептоны, 0,3% ашытқы сығындысы, 0,5% NaCl, pH 7,0). Қатты қоректік орталарды дайындау үшін агар-агар (Himedia, Индия) 1 литр ортаға 15 грамм есебінен қосылды.

2.2 Бактериялық штаммдарды бөліп алу және идентификациялау

Изоляттарды бөліп алу Қазақстанның 4 облысынан жиналған топырақ үлгілерінен жүргізілді. Ол үшін 1 г топырақты 9 мл 0,9% (м/айн) NaCl-да суспензиялап, суспензияны 10 есе сұйылтқан. Үшінші 10 еселенген сұйылту 100 мкл көлемінде қоректік агар құйылған Петри табақшаларына егілді және 37°C температурада 48 сағат бойы инкубацияланды. Колониялардың тазалығын Грамм әдісі бойынша бояу және жарық микроскопиясы арқылы тексерді (Primo star, Carl Zeiss, Германия). Штаммдар культуралды-морфологиялық белгілер, протеомдық талдау және геномдық ДНҚ-ның консервативті локусының фрагментін талдау негізінде анықталды. Морфологиялық белгілер бойынша сәйкестендіру Бергидің сәйкестендіру нұсқаулығына сәйкес жүргізілді [19]. Штаммның протеомдық талдауы Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics, Бремен, Германия) құрылғысында матрицалық-ассистирленген лазерлік десорбция және иондау (MALDI-TOF) бар уақыт аралық масс-спектрометрия әдісімен жүргізілді. Секвенирлеу үшін штаммның геномдық ДНҚ-сын өндірушінің хаттамасына сәйкес Genomic Wizard Purification Kit (Promega, АҚШ) жиынтығының көмегімен бөліп алды. 16S рРНҚ генінің фрагменті 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') және 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3') эмбебап праймерлерін қолдана отырып ПТР әдісімен амплификацияланды. Амплифицирленген ДНҚ фрагменті BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) көмегімен өндіруші хаттамасына сәйкес Сенгер әдісімен [20] секвенирленді. ДНҚ фрагменттері ABI 3730xl (Applied

Biosystems, АҚШ) автоматты секвенаторының көмегімен бөлінді. Нуклеотидтік тізбектер NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) дерекқорындағы эталондық тізбекпен салыстырылды.

2.3 Фитазалық активтілік скринингі

Штаммдар 2% глюкоза, 1% NH₄NO₃, 0,1% KCl, 0,1% MgSO₄, 0,02% FeSO₄·7H₂O, 0,0017% MnCl₂·4H₂O, 0,2% CaCl₂ және жалғыз фосфор көзі ретінде 0,4% натрий фитаты бар агарланған қоректік ортаға себу арқылы фитаздық активтілікке тексерілді. Фитазалық активтілікті фитат-кальций кешенінің гидролизі салдарынан колониялар айналасында жарықтану аймақтарының түзілуі бойынша бағалады.

2.4 Фитазалық активтілікті анықтау

Штаммдардың өсінділері IKA 4000i control (IKA-Werke, Германия) шейкер-инкубаторында 18 сағат бойы 37°C температурада және 160 айн/мин шайқау кезінде 1 мл қоректік сорпада өсірілді. Жасушалар 4°C, 6000×г, центрифугалау арқылы 7 минут бойы жиналды. Тұнба үсті сұйықтығын алып тастап, жасуша тұнбасын 1 мл 0,9% NaCl-мен жуды. Жуылғаннан кейін жасушалар 500 мкл 0,9% NaCl суспензияланды және 10 мл қоректік сорпаға 50 мкл дақыл енгізілді. Үлгілер 37°C, 160 айн/мин температурада 24 сағат бойы өсті. Дақылдар 4°C, 10000×г 5 минут центрифугаланды, тұнба алынып тасталды. Шөгінді үсті сұйықтығының фитазалық активтілігі [21] бойынша өлшенді. Фитазаның активтілігі 100 мкл мөлдірленген культураны 900 мкл 2 мМ натрий фитаты ерітіндісімен 100 мМ Трис-НCl буферінде (pH 7,0) инкубациялау арқылы өлшенді. Ферментативті реакцияны 37°C-та 10 мин бойы жүргізді, реакцияны 750 мкл 5%-дық үшхлорсірке қышқылын қосу арқылы тоқтатты. Бөлінген фосфаттың мөлшері 700 нм-де 1,5 мл түсті реагент қосылғаннан кейін өлшенді, ол тікелей пайдалану алдында аммоний молибдатының 5,5%-дық күкірт қышқылындағы 2,5%-дық ерітіндісінің төрт көлемін және темір (II) сульфатының 2,5%-дық ерітіндісінің бір көлемін араластыру арқылы дайындалды. Фитазаның активтілік бірлігі ретінде минутына 1 мкмоль фосфаттың бөлінуі алынды.

2.5 Штаммдардың фитазалық активтілігіне рН және температураның әсері

Ферменттің активтілігі рН 4,0 ден 10,0 аралығында 1 қадаммен өлшенді. Келесі буферлік жүйелер қолданылды: ацетатты буфер (рН 4,0-5,0), Tris-HCl (рН 6,0-9,0) және глицин-NaOH буфері (рН 10,0). Алынған мәндер салыстырмалы бірліктерге ауыстырылды, максималды мән 100% деп алынды. Температураның фитазалық активтілігіне әсері 30 - 80°C аралығында 10°C интервалмен бағаланды. Алынған мәндер салыстырмалы бірліктерге ауыстырылып, максималды мән 100% деп алынды.

2.6 Бағдарламалық құралдар, биоинформатикалық және статистикалық талдау

Капиллярлық секвенирлеу хроматограммалары Vector NTI Advance 11 (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) бағдарламалық жасақтамасының көмегімен талданды. Секреторлық пептидтің болуына ақуыздық реттілікті талдау үшін SignalP 5.0 онлайн платформасы қолданылды (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Фитазалардың аминқышқылдық тізбектері арасындағы гомологияны талдау Clone

Manager software7, version 7.11 (Sci-Ed Software, АҚШ) көмегімен жүргізілді. Активтілікті анықтау бойынша барлық эксперименттер үш қайталауда жүргізілді. Ферменттердің активтілігі туралы деректер тәуелсіз талдаулардан алынды, ал орташа мәндер, стандартты ауытқулар (SD) және р мәндері GraphPad Prism нұсқасының 8.0.1 (GraphPad Software, АҚШ) көмегімен есептелді. Барлық деректер \pm SD (n = 3) орташа мәні ретінде ұсынылған.

3. НӘТИЖЕЛЕР

3.1 *Bacillus* туысының штамдарын бөліп алу және идентификациялау

Ақмола, Түркістан, Қызылорда және Жамбыл облыстарының топырағынан изоляттар бөлініп алынды, оларда бактерия жасушалары жеке-жеке де, тізбектеліп те табылды. Агарланған Миллер ортасында 37°C температурада 16 сағат бойы өсіргенде штамдар колониялар түзеді, олардың микроскопиясы барлық изоляттардың

грам-оң екенін көрсетті. Аэробты жағдайда қоректік сорпада өсіргенде изоляттар тәулік бойы орташа өсуді көрсетті. Осы уақыт ішінде орта лайланып өзіне тән иіске ие болды, ал культуральды ортада бактериялық үлпектер пайда болды сұйықтық-ауа бөліну шекарасында қиын бұзылатын пленка пайда болды. Морфологиялық талдау мәліметтері бөлініп алынған изоляттардың *Bacillus* туысына жататындығын көрсетті. Biotyper көмегімен рибосомалық ақуыздардың протеомдық профилін талдау және 16S рРНҚ генінің фрагментін секвенирлеуді және GenBank деректерімен нуклеотидтер тізбегін салыстыруды қамтитын қосымша зерттеулер бөлінген штамдардың түрлік тиесілігін нақтылауға мүмкіндік берді: *Cytobacillus oceanisediminis* H3, *Peribacillus simplex* H4, *Bacillus mojavensis* SH1, *Bacillus cereus* SH4, *Bacillus pumilus* 1MR, *Bacillus cereus* 3MR, *Bacillus thuringiensis* 5MR, *Bacillus licheniformis* T055, *Bacillus megaterium* 1POL, *Bacillus paralicheniformis* T7 (1-кесте).

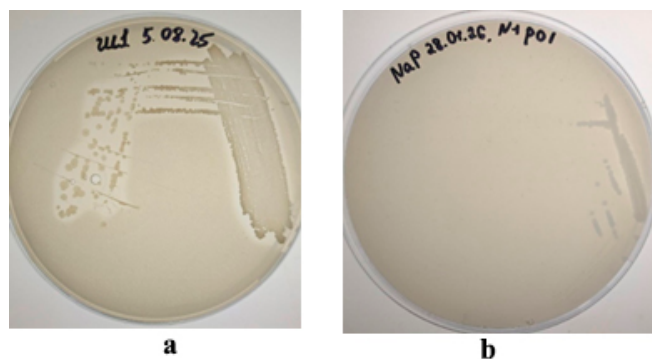
Кесте 1 - Бөлінген штамдарды сәйкестендіру және оларды фитазды активтілікке бастапқы скрининг нәтижелері

Штамм	Көзі	Морфологиялық белгілері	MALDI-TOF Biotyper бойынша идентификациялау (Scor)	16S рРНҚ идентификациялау (сәйкестендіру)	Фитазалық активтілік
H3	Ақмола облысы, топырақ	Колониялар ірі және орташа, дөңгелек пішінді, шеттері тегіс, беті тегіс және ылғалды, S типті, сүт тәрізді ақ түсті, дөңес	<i>Cytobacillus oceanisediminis</i> (2,13)	<i>Cytobacillus oceanisediminis</i> (100%)	+
H4	Ақмола облысы, топырақ	Грам оң бактериялар. Колониялар негізінен ірі және орташа, дөңгелек дұрыс пішінді, шеттері тегіс, беті тегіс және ылғалды, S типті, сүт-ақ түсті, дөңес.	<i>Peribacillus simplex</i> (1,788)	99,12%	++
SH1	Түркістан облысы, топырақ	Грам оң бактериялар. Колониялар ірі және орташа, дөңгелек дұрыс пішінді, шеттері тегіс, тегіс ылғалды беті бар, S типті, сүт-ақ түсті, дөңес.	(NI)	<i>Bacillus mojavensis</i> 100%	++
SH4	Ақмола облысы, топырақ	Грам оң бактериялар. Колониялар негізінен ірі, дөңгелек дұрыс пішінді, шеттері тегіс, беті тегіс, ылғалды және жылтыр, S типті, сүт-ақ түсті, дөңес.	<i>Bacillus cereus</i> (2,098)	98,72%	+
1MR	Қызылорда облысы, топырақ	Грам оң бактериялар. Колониялар ірі, дұрыс емес пішінді, шеттері тегіс емес (ирек-ирек), беті күңгірт және құрғақ, S пішінді, сүт-күңгірт түсті.	<i>Bacillus pumilus</i> (2,023)	97,86%	+
3MR	Қызылорда облысы, топырақ	Грам оң бактериялар. Колониялар ірі, дұрыс пішінді, шеттері тегіс, беті күңгірт және құрғақ, S-пішінді, сүт түсті лайлы.	<i>Bacillus cereus</i> (1,937)	95,27%	+
5MR	Қызылорда облысы, топырақ	Колониялар орташа мөлшерде, дұрыс емес пішінді, шеттері тегіс емес, беті күңгірт және құрғақ, R-пішінді, сүт-бұлдыр түсті.	<i>Bacillus thuringiensis</i> (1,95)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (95,93%)	+
T055	Ақмола облысы, топырақ	Колониялар орташа, сопақша пішінді, шеттері тегіс, беті тегіс және ылғалды, R типті, сүт-ақ түсті, дөңес.	<i>Bacillus licheniformis</i> (1,912)	<i>Bacillus licheniformis</i> (98,82%)	-
1POL	Ақмола облысы, топырақ	Колониялар орташа және ірі, дөңгелек пішінді, шеттері тегіс, беті тегіс және ылғалды, S типті, сүт-ақ түсті, дөңес, колониялар жақсы оқшауланған.	<i>Bacillus megaterium</i> (2,09)	<i>Bacillus megaterium</i> (96,55%)	++
T7	Жамбыл облысы, топырақ	Колониялар негізінен орташа және ірі, дұрыс емес пішінді, шеттері тегіс емес фестонды, құрғақ, кедір-бұдырлы, әжімді, жалпақ, R типті, бозғылт-кремді, сұрғылт реңді. Себу аймағында - мол біріккен өсу, штрихтан тыс өсу іс жүзінде жоқ.	(NI)	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (100%)	+

Ескерту: NI - анықталмаған

Штаммдарды құрамында фосфор көзі ретінде фитин қышқылы бар қоректік ортаға себу арқылы *Bacillus licheniformis* T055-тен басқа барлық штаммдардың фитазальық активтілікке ие екендігі анықталды (1-кесте). Айқын жарықтану аймақтары *Bacillus mojavensis* SH1 және *Bacillus megaterium* 1POL штамдарында байқалды (1-сурет).

Cytobacillus oceaaniseditinis H3, *Peribacillus simplex* H4, *Bacillus mojavensis* SH1, *Bacillus cereus* SH4, *Bacillus pumilus* 1MR, *Bacillus cereus* 3MR, *Bacillus thuringiensis* 5MR, *Bacillus megaterium* 1POL, *Bacillus paralicheniformis*

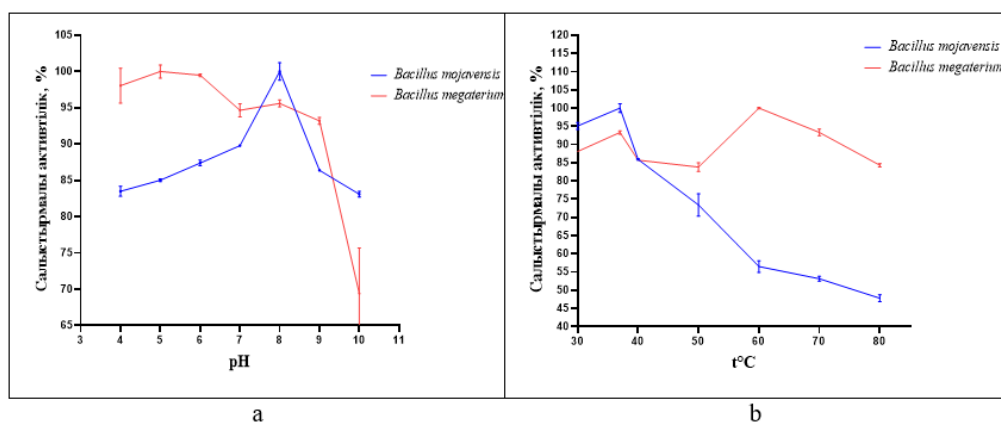


1-сурет. Фитазальық активтілік скринингі

T7 штаммдарының фитазальық активтілігін анықтау мақсатында оларды қоректік сорпада өсіру жүргізілді. Алынған культуралды сұйықтықты фитазальық активтілікті өлшеу үшін қолдандық. 2-кестеде зерттелген үлгілердің фитаза-

Кесте 2. Штаммдардың фитазальық активтілігі

Штамм	Активтілік, Бір/мл
<i>Cytobacillus oceaaniseditinis</i> H3	0,28 ± 0,04
<i>Peribacillus simplex</i> H4	0,29 ± 0,05
<i>Bacillus mojavensis</i> SH1	0,34 ± 0,03
<i>Bacillus cereus</i> SH4	0,38 ± 0,02
<i>Bacillus pumilus</i> 1MR	0,33 ± 0,12
<i>Bacillus cereus</i> 3MR	0,41 ± 0,01
<i>Bacillus thuringiensis</i> 5MR	0,31 ± 0,11
<i>Bacillus megaterium</i> 1POL	0,34 ± 0,02
<i>Bacillus paralicheniformis</i> T7	0,29 ± 0,04



2-сурет. *B. mojavensis* SH1 (а) және *B. megaterium* 1POL (б) штаммдарының экстрацеллюлярлы сығындысының фитазальық активтілігінің рН мен температураға тәуелділігі

лық активтілігін анықтау нәтижелері келтірілген

2-кестеден көрініп тұрғандай, штаммдардың фитазальық активтілігі *Cytobacillus oceaaniseditinis* H3 үшін $0,28 \pm 0,04$ -ден *Bacillus cereus* 3MR үшін $0,41 \pm 0,01$ -ге дейін өзгереді. *B. mojavensis* SH1 және *B. megaterium* 1POL екі штаммының экстрацеллюлярлы сығындысының фитазальық активтілігінің рН 3-10 диапазонында және температура 30-80 С диапазонында тәуелділігін зерттеу жүргізілді.

B. mojavensis SH1 штаммы үшін ең жоғары фитазальық активтілік рН 8,0 және 37°C температурада байқалды. *B. megaterium* 1POL штаммы үшін фитазальық активтіліктің максимумы рН 5,0 және 60°C температурада анықталды.

ТАЛҚЫЛАУ

Азықтық ферменттердің әлемдік нарығы 1,3 млрд АҚШ долларына бағаланып, жыл сайынғы өсім 5,0%-ды құрайды деп болжанған [22] және бұл нарықта фитазалардың үлесі 40%-ға жетеді [23]. Қолданыстағы коммерциялық препараттардың ассортиментіне қарамастан, фитазалардың жаңа көздерін іздеу әлі де жалғасуда [24]. *Aspergillus* spp. саңырауқұлақ фитазаларымен және *Escherichia coli* фитазасымен қатар зерттеушілердің назарын сілтілік табиғатымен және жиі жоғары термотұрақтылығымен ерекшеленетін *Bacillus* фитазалары аударды [8]. Бациллярлық фитазалар [25] саңырауқұлақтарға және ішек таяқшасынан алынғандарға қарағанда жоғары температураның әсеріне төзімдірек, ал оларды өндіретін штаммдар жоғары биотехнологиялық қасиеттерге ие, өйткені олар қоректік орталардың құрамына талап қоймайды және арзан субстраттарда: қауырсындарда, тамақ және өңдеу өнеркәсібінің қалдықтарында өсе алады [26, 27].

Фитазалар фитин қышқылын (мио-инозитол-гексафосфат, IP6) және дән мен өсімдік шикізатындағы қор фосфоры бар фитазаларды гидролиздейтін экзоферменттер болып табылады [28]. Бұл ферменттер әсіресе жем-шөп, тамақ және биотехнология өнеркәсібінде маңызды, өйткені олар «байланысқан» фосфорды сінімді түрге айналдырады. Фитин қышқылы 6 фосфат тобы бар циклді мио-инозитол болып табылады. Гидролиз процесінде фитаза кезекпен фосфаттарды жояды: IP6 → IP5 → IP4 → IP3 → IP2 → IP1 → инозитол + Pi. Реакцияның әрбір актісі бір фосфоэфирлік байланыстың гидролизімен жүреді. Бациллярлық фитазалардың көпшілігі β-пропел-

лерлік типтегі фитазаларға жатады [29]. Бациллярлық фитазалардың негізгі ерекшеліктері: рН 6,5-9,0 активтілігі, термотұрақтылықтың жоғарылауы және жануарлардың АІЖ ферменттеріне төзімділігі [18]. Бациллярлық фитазаның көмегімен фитаттардың гидролизі келесі кезеңдерді қамтиды: субстраттың байланысуы, оның барысында субстраттың бекітілуі және кальций кластерінің көмегімен теріс зарядтың бейтараптануы жүреді; тригональды-бипирамидальды фосфор түріндегі интермедиаттың түзілуімен фитаттың серинмен, треонинмен немесе аспарагин қышқылымен нуклеофильді шабуылы; фосфор-ферментті кешеннің түзілуі, оның барысында фосфат ферментке тасымалданады; интермедиаттың гидролизі, нәтижесінде фосфордың (Pi) босатылуы жүреді; соңғы кезеңде ферменттің регенерациясы жүреді [30]. Бұл процесте Р-О байланысын поляризациялайтын, өтпелі күй энергиясын төмендететін, кететін фосфор тобын тұрақтандыратын және гидролиз өнімдерінің реакцияны тежеуіне жол бермейтін Ca^{2+} иондары маңызды рөл атқарады [8].

Бұл зерттеуде Қазақстанның 4 облысының топырағынан бөлініп алынған және *Cytobacter oceanisediminis*, *Peribacillus simplex*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus paralicheniformis* түрлеріне жататын 10 бациллалық штаммның фитазалық активтілігі зерттелді. Активтілік бойынша талдау (2-кесте) *Bacillus cereus* түріне жататын 3MR және SH4 штаммдары ең жоғары активтілікке ие екенін көрсетеді. Дегенмен, *Bacillus cereus* *Bacillus cereus sensu lato* тобына жататынын және кең таралған спора түзуші бактерия екенін атап өткен жөн. *Bacillus* туысының өкілдерінде өнеркәсіптік маңызды ферментативті активтіліктердің болуына қарамастан, *B. cereus* штаммдарын жем-шөп өнеркәсібінде қолдану олардың әлеуетті токсигендігімен және санитарлық-эпидемиологиялық тәуекелдерімен шектеледі [31]. Атап айтқанда, *B. cereus* цереулид додекадепсипептидті токсинін және диареялық энтеротоксиндерді өндіруге қабілетті: Hbl, Nhe, CytK [32]. Бұл токсиндер цитотоксикалық әсерге ие және адамдар мен жануарларда гастроэнтериттер тудырады. Сонымен қатар, *B. cereus* қыздыруға, кептіруге және ұзақ сақтауға төзімді, термотұрақты споралар түзеді. Қолайлы жағдайларда споралар өсіп, кейіннен токсиндер шығарады, бұл азық өнімдерінің ластану қаупін тудырады [33]. Осы себепті *Bacillus cereus* QPS (Qualified Presumption of Safety) мәртебесіне ие емес, бұл әр штаммның қауіпсіздігін жеке токсикологиялық негіздеуді талап етеді және оның өнеркәсіптік қолданылуын ай-

тарлықтай шектейді [34]. Осы жағдайларды ескере отырып келесі зерттеулер үшін *Bacillus mojavensis* SH1 және *Bacillus megaterium* IPOL штаммдары таңдап алынды олар фитин қышқылы бар ортада өсіру кезінде айқын жарықтану аймақтарын (1-сурет) және жеткілікті жоғары фитаза активтілігін көрсетті (2-кесте).

NCBI базасын *Bacillus mojavensis* (WP_326227184) фитазасы мысалында талдау *Bacillus mojavensis* фитазасы 382 аминқышқыл қалдықтарынан тұратын ақуыз екенін көрсетті. SignalP-5.0 көмегімен тізбекті талдау көрсеткендей, алғашқы 26 амин қышқыл қалдықтары (МКСРКТІЛФСАААССЛЛСЛСАНСВСА) ақуыз секрециясын қамтамасыз ететін сигналдық пептид болып табылады. Жетілген ақуыздың молекулалық массасы 39,2 кДа. Осыған ұқсас *Bacillus megaterium* (WP_338789658) фитазасы үшін жүргізілген талдау осы штамм ферментінің амин қышқылдық реттілігі 406 амин қышқылдық қалдықтардан, сигналдық пептид 30 қалдықтардан (МККQP LRNYFKVLSITALSSFLAIISSANA) және жетілген ақуыздың молекулалық массасы 41,9 кДа құрайтынын көрсетті. *B. mojavensis* және *B. megaterium* фитазаларының тізбектерін салыстыру олардың арасында қандай да бір гомологияны анықтаған жоқ.

Активтілік бойынша белгілі штаммдармен салыстырмалы талдау көрсеткендей, бациллярлық фитазалардың көпшілігі үшін температуралық оптимум 50-60°C құрайды (3-кесте) [18, 29, 35-37] [38]. *B. megaterium* IPOL осындай көрсеткіштерді көрсетеді, бұл фермент 80°C температурада максимумның 80% -дан астам салыстырмалы активтілікті көрсетеді және осылайша термотұрақты фермент болып табылады. Керісінше, *B. mojavensis* SH1 - 37°C физиологиялық температурада активтірек және 80°C температурада салыстырмалы фитазалық активтілік максималды мәннің 50% -дан аспайды. рН оптимумы бойынша салыстырмалы талдау көрсеткендей, *B. mojavensis* SH1 фитазасы сілтілі фермент болып табылады, ал *B. megaterium* IPOL фитазасы қышқылдау жағдайларда активті. Алайда, екі фитаза да рН кең диапазонында активті екенін атап өткен жөн, олардың активтілігі барлық зерттелген диапазонда максимумнан 60% -дан төмен түспейді.

Осылайша, Қазақстанның 4 облысынан бөлініп алынған бациллалық изоляттарды зерттеу жүргізілді және олардың фитазалық активтілігіне скрининг жүргізілді, фитазалық активтілігі бар штаммдардың түрлік құрамы жеткілікті түрде жоғары әртүрлілікті көрсетеді, бұл үлгілерді жинау орындарындағы топырақ пен климаттық ерекшеліктердің айырмашылығымен байланы-

Кесте 3. Бактериялық фитазалардың биохимиялық параметрлері

Штамм	Температура, °C	рН	Сілтеме
<i>B. mojavensis</i> SH1	37	8,0	Осы мақала
<i>B. megaterium</i> IPOL	60	5,0	Осы мақала
<i>Bacillus</i> sp. YCJS	50	6,0	[18]
<i>B. subtilis</i> ARRMK33	55	7,0	[35]
<i>B. subtilis</i> US417	55	7,0	[36]
<i>Bacillus</i> sp. WYQ02	55	7,5	[37]
<i>B. licheniformis</i> PB-13	60	6,0-6,5	[29]
<i>B. licheniformis</i> ZJ-6	60	7,5	[38]

сты. 10 штаммның тек 1-і ғана қандай да бір фитазалық активтіліктің жоқтығын көрсетті, бұл осы топтың бактериялары үшін мио-инозитол-гексакисфосфатфосфоидролазалық активтіліктің маңыздылығын көрсетеді. Түркістан және Ақмола облыстарының топырағынан бөлініп алынған *Bacillus mojavensis* SH1 және *Bacillus megaterium* IPOЛ тиісінше биохимиялық сипаттамалары зерттелді. Талдау көрсеткендей, ферменттер β-пропеллерлік типтегі фитазаларға жатады, бір-бірімен айтарлықтай гомологиясы жоқ және рН пен температура көрсеткіштері бойынша ерекшеленеді. Активтілік және биохимиялық көрсеткіштер бойынша алынған нәтижелер жемдік фитазалардың продуценттері ретінде екі штаммның да перспективтілігін көрсетеді және көрсетілген ферменттерді одан әрі зерттеуді талап етеді.

Bacillus mojavensis SH1 және *Bacillus megaterium* IPOЛ штаммдарының алынған фитазалық белсенділігі 0,34 бірлік/мл құрады, бұл ортаның құрамы мен өсіру жағдайларын оңтайландырусыз табиғи бактериялық изоляттарды бастапқы скринингтеу үшін фермент өнімінің орташа деңгейіне сәйкес келеді. Бұл көрсеткіш экспрессияның ерте кезеңдеріндегі кейбір рекомбинантты бациллярлық фитазалардың белсенділігімен салыстырылады немесе одан асып түседі, мысалы, *B. licheniformis* ZJ-6 фитазасы үшін культуральды сұйықтықтың белсенділігі 0,23 бірлік/мл болды [38]. Сонымен қатар, ол оңтайландырылған продуценттер мен экспрессияның гетерологиялық жүйелері үшін алынған мәндерден айтарлықтай төмен, онда белсенділік *Pichia pastoris* ашытқысындағы *B. subtilis* B.S.46 [39] үшін 4,627 Бірлік/мл-ге және *B. subtilis* US417 рекомбинантты фитазасы үшін 227 Бірлік/мл-ге жетуі мүмкін [40]. *Bacillus mojavensis* SH1 және *Bacillus megaterium* IPOЛ штаммдары коректік орта құрамын, өсіру уақытын, рН, температураны және фермент секрециясының жағдайын одан әрі оңтайландыруды қажет етеді.

ҚОРЫТЫНДЫ

Ақмола, Түркістан, Қызылорда және Жамбыл облыстарының аумағынан жиналған топырақ үлгілерінен фитазалық активтілікке ие 10 бактериялық изоляттар бөлініп алынды және олар культуралдық-морфологиялық, протеомдық және молекулалық-генетикалық деректер негізінде *Cytobacillus oceaenisediminis* H3, *Peribacillus simplex* H4, *Bacillus mojavensis* SH1, *Bacillus cereus* SH4, *Bacillus pumilus* 1MR, *Bacillus cereus* 3MR, *Bacillus thuringiensis* 5MR, *Bacillus megaterium* IPOЛ, *Bacillus paralicheniformis* T7 болып анықталды. Бөлінген штаммдардың ішінен фитазалық активтілікке скрининг негізінде *B. mojavensis* SH1 және *B. megaterium* IPOЛ штаммдары таңдап алынды. Биохимиялық қасиеттерін зерттеу көрсеткендей *B. mojavensis* SH1 фитазасы 30-37°C температура диапазонында және рН 8,0 активті, *B. megaterium* IPOЛ фитазасы 60°C және рН 4,0-7,0 ең активті. Екі фермент те бірдей фитазалық активтілікке ие - $0,34 \pm 0,02$ Бір/мл. Алынған нәтижелер бұл фитазалардың фитин қышқылы мен өсімдік фитаттарын гидролиздеу және деградациялау үшін азықтық фермент ретінде перспективтілігін көрсетеді.

ҚАРЖЫЛАНДЫРУ

Зерттеу жұмыстары ҚР Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым комитетімен қаржыландырылды (грант № AP23488823).

АВТОРЛАРДЫҢ ҮЛЕСІ

Тұжырымдама жасау, Х.Б.; методология, Х.Б., Б.К.; статистикалық талдау, Б.Б., М.К.; зерттеу дизайны, Х.Б.; деректерді интерпретациялау, Х.Б., Б.К.; мәтіннің алғашқы нұсқасын дайындау, Х.Б., А.М.; мәтінді рецензиялау және редакциялау, Б.К., А.М.; ғылыми жетекшілік, Х.Б. Барлық авторлар қолжазбаның жарияланған нұсқасымен танысып, оны мақұлдады.

ҚЫЗЫҒУШЫЛЫҚТАРДЫҢ ҚАҚТЫҒЫСЫ

Барлық авторлардың атынан жауапты автор мүдделер қажығысының жоқ екенін ресми түрде мәлімдейді.

ҚОЛДАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Cromwell G.L. Phosphorus and Swine Nutrition // Phosphorus: Agriculture and the Environment / J.T. Sims, A.N. Sharpley, J.M. Powel (eds.). — 2005. — P. 607–634.
2. Farhat-Khemakhem A., Ben Farhat M., Boukhris I., Bejar W., Bouchaala K., Kammoun R., Maguin E., Bejar S., Chouayekh H. Heterologous expression and optimization using experimental designs allowed highly efficient production of the PHY US417 phytase in *Bacillus subtilis* 168 // *AMB Express*. — 2012. — Vol. 2, No. 1. — P. 10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-10>
3. Selle P.H., Macelline S.P., Chrystal P.V., Liu S.Y. The Contribution of Phytate-Degrading Enzymes to Chicken-Meat Production // *Animals*. — 2023. — Vol. 13, No. 4. — P. 603. <https://doi.org/10.3390/ani13040603>
4. Balaban N.P., Suleimanova A.D., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Rudakova N.L., Sharipova M.R., Shakirov E.V. Microbial phytases and phytate: exploring opportunities for sustainable phosphorus management in agriculture // *American Journal of Molecular Biology*. — 2017. — Vol. 7, No. 1. — P. 11–29. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2017.71002>
5. Kumar V., Sinha A.K. General aspects of phytases // *Enzymes in Human and Animal Nutrition* / C.S. Nunes, V. Kumar (eds.). — Academic Press, 2018. — P. 53–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811863-8.00003-8>
6. Singh N., Kumari A., Agrawal N., Manhas S., Gahlawat S.K. Phytase: the feed enzyme, an overview // *Advances in Animal Biotechnology and its Applications* / S.K. Gahlawat, B. Duhan, R. Salar, S. Siwach, P.K. Kumar (eds.). — Singapore: Springer, 2018. — P. 269–327. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4702-9_11
7. Filippovich S.Y., Bachina A.K., Afanasyev I.I., Rudakova N.L., Sharipova M.R. Advances in immobilization of phytases and their application // *Bioresource Technology*. — 2023. — Vol. 379. — P. 129030. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129030>
8. Zhao T., Wang Y., Liu J., Ma A., Huang X., Li J. Research status of *Bacillus* phytase // *3 Biotech*. — 2021. — Vol. 11, No. 9. — P. 415. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02963-9>

9. Mei C., Chrétien R.L., Amaradasa B.S., He Y., Turner A., Lowman S. Characterization of phosphate solubilizing bacterial endophytes and plant growth promotion in vitro and in greenhouse // *Microorganisms*. — 2021. — Vol. 9, No. 9. — P. 1935. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091935>
10. Saxena A., Yadav A.N., Rajput V.D., Minkina T., Kumar V. Characteristics of an Acidic Phytase from *Aspergillus aculeatus* APF1 for Dephytinization of Biofortified Wheat Genotypes // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. — 2020. — Vol. 191, No. 2. — P. 679–694. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03172-5>
11. Corrêa T.L.R., de Araújo E.F. Fungal phytases: from genes to applications // *Brazilian Journal of Microbiology*. — 2020. — Vol. 51, No. 3. — P. 1009–1020. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00169-8>
12. Liu X., Xu H., Zhang J., Liang C. Enhancing Phytate Availability in Soils and Phytate-P Acquisition by Plants: A Review // *Environmental Science & Technology*. — 2022. — Vol. 56, No. 13. — P. 9196–9219. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07669>
13. Faba-Rodriguez R., O'Neill E.C., Narsai R., Harvey Millar A., Baidoo E.E.K., Plaxton W.C. Structure of a cereal purple acid phytase provides new insights to phytate degradation in plants // *Plant Communications*. — 2022. — Vol. 3, No. 2. — P. 100305. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100305>
14. Ellestad L.E., Angel R., Soares J.H. Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies // *Fish Physiology and Biochemistry*. — 2002. — Vol. 26, No. 3. — P. 259–273. <https://doi.org/10.1023/A:1026278019637>
15. Morgan N.K., Walk C.L., Bedford M.R., Burton E.J. Contribution of intestinal- and cereal-derived phytase activity on phytate degradation in young broilers // *Poultry Science*. — 2015. — Vol. 94, No. 7. — P. 1577–1583. <https://doi.org/10.3382/ps/pev094>
16. Hussain S.M., Ahmad N., Khan M.Z., Javed M.T., Manzoor S., Ali M., Abbas R.Z. Unrevealing the Sources and Catalytic Functions of Phytase with Multipurpose Characteristics // *Catalysis Letters*. — 2022. — Vol. 152, No. 5. — P. 1358–1371. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03757-7>
17. Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oesterheld G., Lehmann M., van Loon A.P.G.M. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1999. — Vol. 65, No. 2. — P. 367–373. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.367-373.1999>
18. Yao M.-Z., Zhang X., Wang W., Zhang J., Xie J., Zhang Z. Effect of metals ions on thermostable alkaline phytase from *Bacillus subtilis* YCJS isolated from soybean rhizosphere soil // *Annals of Microbiology*. — 2014. — Vol. 64, No. 3. — P. 1123–1131. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0741-6>
19. Bergey D.H., Holt J.G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. — 9th ed. — Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1977. — Vol. 74, No. 12. — P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
21. Choi Y.M., Suh H.J., Kim J.M. Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus* sp. KHU-10 // *Journal of Protein Chemistry*. — 2001. — Vol. 20, No. 4. — P. 287–292. <https://doi.org/10.1023/A:1010959011145>
22. Liang Q., Yuan M., Xu L., Lio E., Zhang F., Mou H., Secundo F. Application of enzymes as a feed additive in aquaculture // *Marine Life Science & Technology*. — 2022. — Vol. 4, No. 2. — P. 208–221. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00128-z>
23. Speight R.E., Smart K.A., Hort J., van der Merwe G.K., Davy M. Platforms to accelerate biomanufacturing of enzyme and probiotic animal feed supplements: discovery considerations and manufacturing implications // *Animal Production Science*. — 2022. — Vol. 62, No. 12. — P. 1113–1128. <https://doi.org/10.1071/AN21408>
24. Lei X.G., Weaver J.D., Mullaney E., Ullah A.H.J., Azain M.J. Phytase, a New Life for an “Old” Enzyme // *Annual Review of Animal Biosciences*. — 2013. — Vol. 1, No. 1. — P. 283–309. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103717>
25. Elkhail E.A.I., Manner K., Borriss R., Simon O. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens // *British Poultry Science*. — 2007. — Vol. 48, No. 1. — P. 64–70. <https://doi.org/10.1080/00071660601148278>
26. Aktayeva S., Baltin K., Kiribayeva A., Akishev Z., Silayev D., Ramankulov Y., Khassenov B. Isolation of *Bacillus* sp. A5.3 Strain with Keratinolytic Activity // *Biology (Basel)*. — 2022. — Vol. 11, No. 2. — P. 244. <https://doi.org/10.3390/biology11020244>
27. Contesini F.J., Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // *Critical Reviews in Biotechnology*. — 2018. — Vol. 38, No. 3. — P. 321–334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
28. Gallardo C., Dadalt J.C., Trindade Neto M.A., Nitikanchana S., Kim S.W. Effects of multi-carbohydrase and phytase on standardized ileal digestibility of amino acids and apparent metabolizable energy in canola meal fed to broiler chicks // *Poultry Science*. — 2017. — Vol. 96, No. 9. — P. 3305–3313. <https://doi.org/10.3382/ps/pex142>
29. Kumar V., Singh G., Sangwan P., Verma A.K., Agrawal S. Cloning, Sequencing, and In Silico Analysis of β -Propeller Phytase *Bacillus licheniformis* Strain PB-13 // *Biotechnology Research International*. — 2014. — Vol. 2014. — P. 841353. <https://doi.org/10.1155/2014/841353>
30. Sanni D.M., Lawal A.K., Akinyele B.J., Fasimoye F.O., Kolawole O.M. Purification and biochemical characterization of phytase from *Bacillus cereus* isolated from gastrointestinal tract of African giant snail (*Achatina fulica*) // *International Microbiology*. — 2023. — Vol. 26, No. 4. — P. 961–972. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00369-4>
31. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic

Potential // *Microbiology Spectrum*. — 2019. — Vol. 7, No. 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>

32. Stenfors Arnesen L.P., Fagerlund A., Granum P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2008. — Vol. 32, No. 4. — P. 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>

33. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs // *EFSA Journal*. — 2016. — Vol. 14, No. 7. — P. e04524. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>

34. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), et al. Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microorganisms intentionally added to food or feed as notified to EFSA // *EFSA Journal*. — 2023. — Vol. 21, No. 1. — P. e07747. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7747>

35. Reddy C.S., Achary V.M.M., Manna M., Singh J., Kaul T., Reddy M.K. Isolation and Molecular Characterization of Thermostable Phytase from *Bacillus subtilis* (BSPHyARRMK33) // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. — 2015. — Vol. 175, No. 6. — P. 3058–3067. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1483-0>

36. Hmida-Sayari A., Gargouri-Bouzi R., Bejar S., Jaoua S. Overexpression and Biochemical Characterization of a Thermostable Phytase from *Bacillus subtilis* US417 in *Pichia pastoris* // *Molecular Biotechnology*. — 2014. — Vol. 56, No. 9. — P. 839–848. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9765-3>

37. Li Z., Bai A., Wang Y., Li B., Jin B., Zhang C. Cloning, overexpression, and functional characterization of a phytase from the genus *Bacillus* // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. — 2013. — Vol. 23, No. 3. — P. 193–202. <https://doi.org/10.1159/000346318>

38. Wang Q., Fu S.J., Sun J.Y., Weng X.Y. Characterization of a thermostable alkaline phytase from *Bacillus licheniformis* ZJ-6 in *Pichia pastoris* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. — 2011. — Vol. 27, No. 5. — P. 1247–1253. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0577-9>

39. Rocky-Salimi K., Hashemi M., Safari M., Mousivand M.A. A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46 // *Journal of Advanced Research*. — 2016. — Vol. 7, No. 3. — P. 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.02.003>

40. Hmida-Sayari A., Elgharbi F., Farhat A., Rekik H., Blondeau K., Bejar S. Overexpression and biochemical characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 in *Pichia pastoris* // *Molecular Biotechnology*. — 2014. — Vol. 56, No. 9. — P. 839–848. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9764-y>

REFERENCES

1. Cromwell G.L. Phosphorus and Swine Nutrition // *Phosphorus: Agriculture and the Environment* / J.T. Sims, A.N. Sharpley, J.M. Powel (eds.). — 2005. — P. 607–634.

2. Farhat-Khemakhem A., Ben Farhat M., Boukhris I., Bejar W., Bouchaala K., Kammoun R., Maguin E., Bejar

S., Chouayekh H. Heterologous expression and optimization using experimental designs allowed highly efficient production of the PHY US417 phytase in *Bacillus subtilis* 168 // *AMB Express*. — 2012. — Vol. 2, No. 1. — P. 10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-10>

3. Selle P.H., Macelline S.P., Chrystal P.V., Liu S.Y. The Contribution of Phytate-Degrading Enzymes to Chicken-Meat Production // *Animals*. — 2023. — Vol. 13, No. 4. — P. 603. <https://doi.org/10.3390/ani13040603>

4. Balaban N.P., Suleimanova A.D., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Rudakova N.L., Sharipova M.R., Shakirov E.V. Microbial phytases and phytate: exploring opportunities for sustainable phosphorus management in agriculture // *American Journal of Molecular Biology*. — 2017. — Vol. 7, No. 1. — P. 11–29. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2017.71002>

5. Kumar V., Sinha A.K. General aspects of phytases // *Enzymes in Human and Animal Nutrition* / C.S. Nunes, V. Kumar (eds.). — Academic Press, 2018. — P. 53–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811863-8.00003-8>

6. Singh N., Kumari A., Agrawal N., Manhas S., Gahlawat S.K. Phytase: the feed enzyme, an overview // *Advances in Animal Biotechnology and its Applications* / S.K. Gahlawat, B. Duhan, R. Salar, S. Siwach, P.K. Kumar (eds.). — Singapore: Springer, 2018. — P. 269–327. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4702-9_11

7. Filippovich S.Y., Bachina A.K., Afanasyev I.I., Rudakova N.L., Sharipova M.R. Advances in immobilization of phytases and their application // *Bioresource Technology*. — 2023. — Vol. 379. — P. 129030. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129030>

8. Zhao T., Wang Y., Liu J., Ma A., Huang X., Li J. Research status of *Bacillus* phytase // *3 Biotech*. — 2021. — Vol. 11, No. 9. — P. 415. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02963-9>

9. Mei C., Chrétien R.L., Amaradasa B.S., He Y., Turner A., Lowman S. Characterization of phosphate solubilizing bacterial endophytes and plant growth promotion in vitro and in greenhouse // *Microorganisms*. — 2021. — Vol. 9, No. 9. — P. 1935. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091935>

10. Saxena A., Yadav A.N., Rajput V.D., Minkina T., Kumar V. Characteristics of an Acidic Phytase from *Aspergillus aculeatus* APF1 for Dephosphorylation of Biofortified Wheat Genotypes // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. — 2020. — Vol. 191, No. 2. — P. 679–694. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03172-5>

11. Corrêa T.L.R., de Araújo E.F. Fungal phytases: from genes to applications // *Brazilian Journal of Microbiology*. — 2020. — Vol. 51, No. 3. — P. 1009–1020. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00169-8>

12. Liu X., Xu H., Zhang J., Liang C. Enhancing Phytate Availability in Soils and Phytate-P Acquisition by Plants: A Review // *Environmental Science & Technology*. — 2022. — Vol. 56, No. 13. — P. 9196–9219. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07669>

13. Faba-Rodríguez R., O'Neill E.C., Narsai R., Harvey Millar A., Baidoo E.E.K., Plaxton W.C. Structure of a cereal purple acid phytase provides new insights to phytate

- degradation in plants // *Plant Communications*. — 2022. — Vol. 3, No. 2. — P. 100305. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100305>
14. Ellestad L.E., Angel R., Soares J.H. Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies // *Fish Physiology and Biochemistry*. — 2002. — Vol. 26, No. 3. — P. 259–273. <https://doi.org/10.1023/A:1026278019637>
15. Morgan N.K., Walk C.L., Bedford M.R., Burton E.J. Contribution of intestinal- and cereal-derived phytase activity on phytate degradation in young broilers // *Poultry Science*. — 2015. — Vol. 94, No. 7. — P. 1577–1583. <https://doi.org/10.3382/ps/pev094>
16. Hussain S.M., Ahmad N., Khan M.Z., Javed M.T., Manzoor S., Ali M., Abbas R.Z. Unrevealing the Sources and Catalytic Functions of Phytase with Multipurpose Characteristics // *Catalysis Letters*. — 2022. — Vol. 152, No. 5. — P. 1358–1371. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03757-7>
17. Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M., van Loon A.P.G.M. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1999. — Vol. 65, No. 2. — P. 367–373. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.367-373.1999>
18. Yao M.-Z., Zhang X., Wang W., Zhang J., Xie J., Zhang Z. Effect of metals ions on thermostable alkaline phytase from *Bacillus subtilis* YCJS isolated from soybean rhizosphere soil // *Annals of Microbiology*. — 2014. — Vol. 64, No. 3. — P. 1123–1131. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0741-6>
19. Bergey D.H., Holt J.G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. — 9th ed. — Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1977. — Vol. 74, No. 12. — P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
21. Choi Y.M., Suh H.J., Kim J.M. Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus* sp. KHU-10 // *Journal of Protein Chemistry*. — 2001. — Vol. 20, No. 4. — P. 287–292. <https://doi.org/10.1023/A:1010959011145>
22. Liang Q., Yuan M., Xu L., Lio E., Zhang F., Mou H., Secundo F. Application of enzymes as a feed additive in aquaculture // *Marine Life Science & Technology*. — 2022. — Vol. 4, No. 2. — P. 208–221. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00128-z>
23. Speight R.E., Smart K.A., Hort J., van der Merwe G.K., Davy M. Platforms to accelerate biomanufacturing of enzyme and probiotic animal feed supplements: discovery considerations and manufacturing implications // *Animal Production Science*. — 2022. — Vol. 62, No. 12. — P. 1113–1128. <https://doi.org/10.1071/AN21408>
24. Lei X.G., Weaver J.D., Mullaney E., Ullah A.H.J., Azain M.J. Phytase, a New Life for an “Old” Enzyme // *Annual Review of Animal Biosciences*. — 2013. — Vol. 1, No. 1. — P. 283–309. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103717>
25. Elkhail E.A.I., Manner K., Borriss R., Simon O. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens // *British Poultry Science*. — 2007. — Vol. 48, No. 1. — P. 64–70. <https://doi.org/10.1080/00071660601148278>
26. Aktayeva S., Baltin K., Kiribayeva A., Akishev Z., Silayev D., Ramankulov Y., Khassenov B. Isolation of *Bacillus* sp. A5.3 Strain with Keratinolytic Activity // *Biology (Basel)*. — 2022. — Vol. 11, No. 2. — P. 244. <https://doi.org/10.3390/biology11020244>
27. Contesini F.J., Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // *Critical Reviews in Biotechnology*. — 2018. — Vol. 38, No. 3. — P. 321–334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
28. Gallardo C., Dadalt J.C., Trindade Neto M.A., Nitikanchana S., Kim S.W. Effects of multi-carbohydrase and phytase on standardized ileal digestibility of amino acids and apparent metabolizable energy in canola meal fed to broiler chicks // *Poultry Science*. — 2017. — Vol. 96, No. 9. — P. 3305–3313. <https://doi.org/10.3382/ps/pex142>
29. Kumar V., Singh G., Sangwan P., Verma A.K., Agrawal S. Cloning, Sequencing, and In Silico Analysis of β -Propeller Phytase *Bacillus licheniformis* Strain PB-13 // *Biotechnology Research International*. — 2014. — Vol. 2014. — P. 841353. <https://doi.org/10.1155/2014/841353>
30. Sanni D.M., Lawal A.K., Akinyele B.J., Fasimoye F.O., Kolawole O.M. Purification and biochemical characterization of phytase from *Bacillus cereus* isolated from gastrointestinal tract of African giant snail (*Achatina fulica*) // *International Microbiology*. — 2023. — Vol. 26, No. 4. — P. 961–972. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00369-4>
31. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential // *Microbiology Spectrum*. — 2019. — Vol. 7, No. 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
32. Stenfors Arnesen L.P., Fagerlund A., Granum P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2008. — Vol. 32, No. 4. — P. 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
33. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs // *EFSA Journal*. — 2016. — Vol. 14, No. 7. — P. e04524. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>
34. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), et al. Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microorganisms intentionally added to food or feed as notified to EFSA // *EFSA Journal*. — 2023. — Vol. 21, No. 1. — P. e07747. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7747>
35. Reddy C.S., Achary V.M.M., Manna M., Singh J., Kaul T., Reddy M.K. Isolation and Molecular Characterization of Thermostable Phytase from *Bacillus subtilis* (BSPHyARRMK33) // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. — 2015. — Vol. 175, No. 6. — P. 3058–3067. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1483-0>
36. Hmida-Sayari A., Gargouri-Bouزيد R., Bejar S.,

- Jaoua S. Overexpression and Biochemical Characterization of a Thermostable Phytase from *Bacillus subtilis* US417 in *Pichia pastoris* // *Molecular Biotechnology*. — 2014. — Vol. 56, No. 9. — P. 839–848. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9765-3>
37. Li Z., Bai A., Wang Y., Li B., Jin B., Zhang C. Cloning, overexpression, and functional characterization of a phytase from the genus *Bacillus* // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. — 2013. — Vol. 23, No. 3. — P. 193–202. <https://doi.org/10.1159/000346318>
38. Wang Q., Fu S.J., Sun J.Y., Weng X.Y. Characterization of a thermostable alkaline phytase from *Bacillus licheniformis* ZJ-6 in *Pichia pastoris* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. — 2011. — Vol. 27, No. 5. — P. 1247–1253. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0577-9>
39. Rocky-Salimi K., Hashemi M., Safari M., Mousivand M. A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46 // *Journal of Advanced Research*. — 2016. — Vol. 7, No. 3. — P. 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.02.003>
40. Hmida-Sayari A., Elgharbi F., Farhat A., Rekik H., Blondeau K., Bejar S. Overexpression and biochemical characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 in *Pichia pastoris* // *Molecular Biotechnology*. — 2014. — Vol. 56, No. 9. — P. 839–848. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9764-y>

УДК 577.15

ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ *BACILLUS* SPP. ИЗ ПОЧВЕННЫХ БИОЦЕНОЗОВ И ИХ СКРИНИНГ НА ФИТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬАстраханов М.¹, Балтин К.¹, Бижанова Б.², МаксUTOва К.², Хасенов Б.^{1,3}¹ ТОО «Национальный центр биотехнологии. Коргалжынское шоссе 13/5, Астана, 010000.² НАО «Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева». ул. Сатпаева, 2, Астана, 010000.³ ТОО «GenLab». ул. М.Габдуллина, 19/1, Астана, 010000.

*khasenov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Фосфор является компонентом фосфатов, нуклеиновых кислот, необходим для синтеза белка, фосфолипидов, метаболических ферментов и внутриклеточных буферов. Поэтому все корма должны содержать фосфор в усваиваемой форме. В растительных кормах около 60-90% фосфора содержится в виде фитиновой кислоты и ее солей - фитатов, которые обладают антипитательными свойствами, что влияет на содержания животных с простым желудком: птицы, свиньи, рыбы. Фитаты, являющиеся фосфорсодержащими отходами птицефабрик, свиноферм и прудовых хозяйств негативным образом влияют на экологическую обстановку. Фитазы, являющиеся мио-инозитол фосфогидролазами катализируют гидролиз фитиновой кислоты до монофосфата и промежуточного мио-инозитолфосфата, что позволяет решить сразу три проблемы: устранить потребность в кормовом фосфоре, снизить антипитательность кормов и улучшить экологическую ситуацию близ птицефабрик, ферм и прудовых хозяйств. Из образцов почвы, собранной на территории Акмолинской, Туркестанской, Кызылординской и Жамбылской областей было выделено 10 изолятов микроорганизмов, принадлежащие видам *Cytobacter oceaenisediminis*, *Peribacillus simplex*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus paralicheniformis*. Скрининг показал, что из них 9 штаммов способны к гидролизу фитиновой кислоты, что свидетельствует о наличии у них фитазной активности. Из них для исследования были отобраны штаммы *Bacillus mojavensis* SH1 и *Bacillus megaterium* IPOЛ как наиболее активные штаммы. Изучение биохимических свойств показало, что фитаза из *B. mojavensis* SH1 активна в диапазоне температур 30-37°C и pH 8,0, а фитаза из *B. megaterium* IPOЛ при 60°C и pH 4,0-7,0. Фитазная активность составила 0,34 Ед/мл для штаммов *B. mojavensis* SH1 и *B. megaterium* IPOЛ. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования штаммов *B. mojavensis* SH1 и *B. megaterium* IPOЛ в качестве продуцентов бактериальных фитаз.

Ключевые слова: Фитазы, *Bacillus*, активность, бактерия, фосфор, штамм.

UDC 577.15

ISOLATION OF *BACILLUS* SPP. STRAINS FROM SOIL BIOCENOSSES AND THEIR SCREENING FOR PHYTASE ACTIVITYAstrakhanov M.¹, Baltin K.¹, Bizhanova B.², Maksutova.², Khasenov B.^{1,3}¹ «National Center for Biotechnology» LLP, 13/5 Korgalzhyn Road, Astana, 010000.² «L.N. Gumilyov Eurasian National University» NJSC. 2 Satbaev st., Astana 010000.³ «GenLab» LLP, 19/1 M. Gabdullin Street, Astana 010000.

*khasenov@biocenter.kz

ABSTRACT

Phosphorus is a component of phosphates, nucleic acids, necessary for the synthesis of proteins, phospholipids, metabolic enzymes, and intracellular buffers. Therefore, all feeds must contain phosphorus in digestible form. In plant-based feeds, about 60-90% of phosphorus is found in the form of phytinic acid and its salts - phytates, which have anti-nutritive properties, which affects the maintenance of animals with a simple stomach: poultry, pigs, fish. Phytate, which is a phosphorus-containing waste from poultry farms, pig farms, and pond farms, negatively impacts the environmental situation. Phytases, which are myo-inositol phosphohydrolases, catalyze the hydrolysis of phytin acid to monophosphate and intermediate myo-inositol phosphate, which allows for the simultaneous solution of three problems: eliminating the need for feed phosphorus, reducing the anti-nutritional value of feed, and improving the ecological situation near poultry farms, farms, and pond facilities. From soil samples collected from the territories of the Akmola, Turkestan, Kyzylorda, and Zhambyl regions, 10 isolates of microorganisms belonging to the species *Cytobacter oceaenisediminis*, *Peribacillus simplex*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus paralicheniformis* were isolated. Screening showed that 9 of these strains are capable of hydrolyzing phytinic acid, indicating their phytase activity. Of these, *Bacillus mojavensis* SH1 and *Bacillus megaterium* IPOЛ strains were selected as the most active strains for research. The study of biochemical properties showed that the phytase from *B. mojavensis* SH1 is active in the temperature range of 30-37°C and pH 8.0, while the phytase from *B. megaterium* IPOЛ is active at 60°C and pH 4.0-7.0. Phytase activity was 0.34 U/ml for the *B. mojavensis* SH1 and *B. megaterium* IPOЛ strains. The obtained results indicate the prospects of using *B. mojavensis* SH1 and *B. megaterium* IPOЛ strains as bacterial phytase producers.

Keywords: Phytases, *Bacillus*, Activity, Bacteria, Phosphorus, Strain.