

П. А. Шкарлат, аспірант, С. М. Гармаш, канд. с-г. наук, доцент

## ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *BACILLUS SUBTILIS* ЯК ПРОДУЦЕНТА ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Український державний університет науки і технологій  
ННІ «Український державний хіміко-технологічний університет»,  
м. Дніпро, Україна

**Ключові слова:** культивування, *Bacillus subtilis*, ферменти, протеази, середовище для культивування, біосинтез, технології.

**Вступ.** У сучасних умовах розвитку промисловості протеолітичні ферменти (протеази) відіграють ключову роль у багатьох галузях, таких як харчова, текстильна промисловості, виробництво мийних засобів, фармацевтика і медицина, де вони використовуються для гідролізу білків, покращення якості продуктів, екологічно чистої обробки матеріалів та створення лікарських препаратів [1]. Слід зазначити, що у ветеринарній медицині особливу увагу приділяють питанням очищення ран від некротичних тканин, боротьби з інфекційними агентами та стимуляції загоєння. Одним із ключових інструментів у цьому процесі є препарати протеолітичних ферментів, які завдяки своїм специфічним властивостям можуть активно використовуватись для прискорення відтогнення некротичних тканин, зниження мікробного навантаження та стимуляції регенеративних процесів. Їхня дія заснована на здатності гідролізувати білкові субстрати, руйнувати некротизовані тканини та стимулювати процеси регенерації шкіри [2]. Аналіз сучасного стану ринку ветеринарних препаратів в Україні показує, що ферментні засоби, створені на основі мікроорганізмів, майже відсутні. Більшість препаратів, що використовуються в Україні, є імпортними і часто обмежено доступними через високу вартість [3]. Створення вітчизняних засобів є актуальним і буде спонукати до імпортозаміщення, що є досить доцільним як для вітчизняних виробників, так і для медичної ветеринарії в цілому.

У сучасних умовах переважно використовують мікробіологічний (біотехнологічний) метод отримання протеаз через його ефективність, низьку вартість, швидкість та можливість генетичної модифікації продуцентів для підвищення біосинтезу ферментів. Хімічний синтез ферментів є складним і малоефективним методом, оскільки ферменти, зокрема протеази, належать до високомолекулярних білків зі складною просторовою організацією. Хімічне отримання таких білків супроводжується значними труднощами, пов'язаними з багатоетапним синтезом довгих поліпептидних ланцюгів, низьким виходом цільового продукту та складністю забезпечення правильного фолдингу молекули, необхідного для збереження каталітичної активності. У зв'язку з цим хімічний синтез практично не використовується для промислового виробництва ферментів, поступаючись мікробіологічним і рекомбінантним методам, які є більш економічно доцільними та масштабованими [1, 4].

*Bacillus subtilis*, як грам-позитивна спороутворююча бактерія, є одним з найбільш вивчених і безпечних мікроорганізмів для промислового виробництва ферментів, оскільки має статус «загальноновизнано безпечним» (GRAS) за класифікацією Управління продовольства та медикаментів (FDA), що дозволяє її широке застосування без

значних ризиків для здоров'я. Морфологічні особливості роблять *B. subtilis* ідеальним кандидатом для культивування в контрольованих умовах, де оптимізація живильного середовища може значно підвищити продуктивність синтезу протеаз [5, 6].

**Аналіз публікацій.** У сучасних біотехнологічних дослідженнях значну увагу приділено мікробним протеолітичним ферментам, що зумовлено їхнім широким промисловим застосуванням. Серед мікроорганізмів-продуцентів провідне місце посідають бактерії роду *Bacillus*, зокрема *Bacillus subtilis*, які вирізняються високою здатністю до позаклітинної секреції ферментів та біотехнологічною безпечністю. У роботі [7] здійснено узагальнення сучасних підходів до використання *Bacillus subtilis* як клітинної фабрики для синтезу ферментів, де підкреслено їхню перспективність для промислового отримання протеаз.

Контесіні Ф. Дж., Мело Р. Р. та Сато Х. Х. [8] відзначили, що протеази бактерій роду *Bacillus* належать до найбільш широко використовуваних промислових ферментів. Автори наголошують, що *Bacillus subtilis* є непатогенним мікроорганізмом, здатним до ефективної секреції протеолітичних ферментів безпосередньо в культуральне середовище, що суттєво спрощує процеси виділення та очищення ферментних препаратів.

Дослідження, представлені у роботі [9] показали особливості синтезу та практичного застосування мікробних протеаз, а також відзначили ключову роль умов культивування у формуванні рівня ферментативної активності. Доведено, що умови культивування істотно впливають на інтенсивність біосинтезу протеолітичних ферментів.

Для кількісної оцінки протеолітичної активності у біотехнологічних дослідженнях використовуються різні аналітичні підходи. Класичний метод визначення протеолітичної активності був запропонований Ансоном [10] і ґрунтується на визначенні продуктів гідролізу білкового субстрату. Незважаючи на давність розробки, метод Ансона залишається базовим і широко використовується як еталонний у лабораторній практиці та сучасних дослідженнях протеаз.

У роботі [11] здійснено дослідження продукції протеолітичних ферментів *Bacillus subtilis* із застосуванням оптимізації умов культивування. Авторами показано, що використання методів планування експерименту дозволяє вдосконалити проведення досліджень, що призводить до можливості підвищення рівня протеолітичної активності. Оцінку активності ферментів у роботі проведено з використанням модифікованого методу Ансона.

У дослідженні [12] встановлено, що оптимізація фізико-хімічних параметрів культивування, зокрема температури, рН та тривалості ферментації, є визначальним чинником підвищення ефективності біосинтезу позаклітинних протеаз *Bacillus*.

Авторами роботи [13] продемонстровано ефективність застосування методології поверхні відгуку (RSM) для оптимізації продукції протеази *Bacillus subtilis*. Показано, що багатофакторний підхід дозволяє врахувати взаємодію між окремими параметрами процесу та забезпечує істотне зростання ферментативної активності.

Дослідження [14] наводять приклад комплексної оптимізації ферментаційного процесу отримання лужної протеази *Bacillus subtilis*. Автори показали, що використання статистичних моделей дає змогу визначити оптимальні умови культивування та забезпечити високу відтворюваність експериментальних результатів.

Проведений аналіз сучасних наукових публікацій свідчить про актуальність досліджень, спрямованих на використання бактерій роду *Bacillus subtilis* як продуцента протеолітичних ферментів, вивчення умов культивування, а також їх оптимізацію з метою збільшення біосинтезу ферментів в промислових умовах.

**Метою роботи** є вивчення умов культивування культури *Bacillus subtilis* як штама-продуцента протеолітичних ферментів в лабораторних умовах.

**Матеріали та методи.** У дослідженнях використовували штам *Bacillus subtilis* В-7018. Дослідження культурально-морфологічних характеристик штаму-продуцента здійснювали із застосуванням загальноприйнятих мікробіологічних методик. Культивування бактеріальних клітин у лабораторних умовах проводили з використанням живильного середовища LB (Іспанія), що містило (%): триптон – 1,0; дріжджовий екстракт – 0,5; натрію хлорид – 0,5; а також м'ясо-пептонного агару (МПА) та м'ясо-пептонного бульйону (МПБ). Об'єм інокуляту для посіву складав 1,0% від загального об'єму живильного середовища. Ферментаційний процес проводили у колбах на термостатованій орбітальній качалці за температури 37 °С та швидкості перемішування 180 об/хв.

Накопичення біомаси оцінювали нефелометричним методом шляхом вимірювання оптичної щільності суспензії клітин на спектрофотометрі ULAB-101 у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 550 нм (Д550). Визначення концентрації білка та ферментативної активності у культуральній рідині проводили після відокремлення клітин центрифугуванням при 8000 об/хв упродовж 15 хв.

Протеолітичну активність визначали за методом Ансона у модифікованому варіанті з використанням 2,0% розчину казеїну як субстрату. За одну одиницю активності приймали кількість ферменту, що за 15 хв інкубації при температурі 37 °С забезпечує утворення кислоторозчинної фракції, еквівалентної 1 мг тирозину.

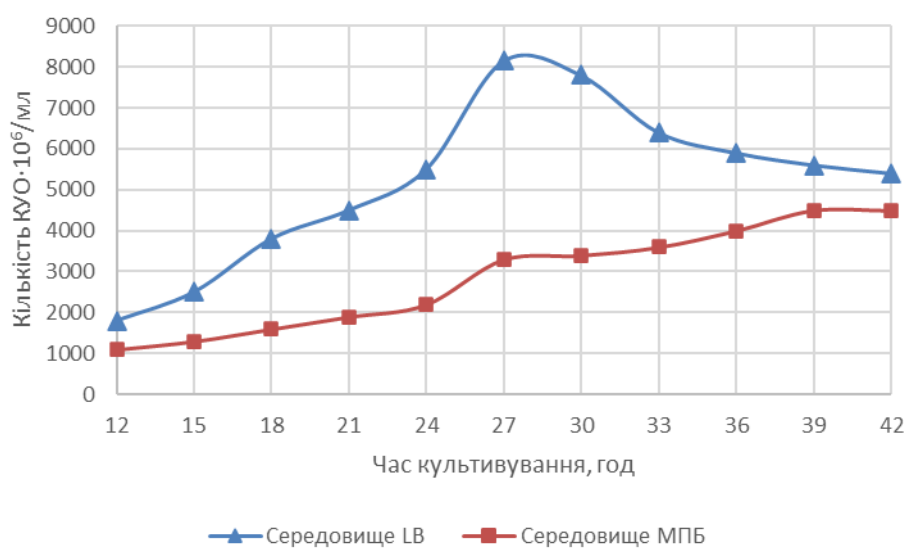
Статистичну обробку експериментальних результатів здійснювали із застосуванням програмного забезпечення Microsoft Excel. Достовірність відмінностей між середніми значеннями оцінювали за критерієм значущості при рівні  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** На початковому етапі досліджень було здійснено вивчення культурально-морфологічних характеристик штаму-продуцента *Bacillus subtilis* В-7018. Встановлено, що бактеріальна культура представлена вегетативними клітинами паличкоподібної форми з заокругленими кінцями, середні розміри яких варіювали в межах  $(5-9) \times (0,3-0,9)$  мкм. Клітини розміщувалися переважно поодинокі або формували короткі ланцюжки та характеризувалися перитрихіальним типом джгутикового апарату.

При вирощуванні на МПА колонії були плоскими, з незначним блиском, білого забарвлення та рівними краями. Культивування у МПБ за температури 37 °С супроводжувалося формуванням рівномірної мутності середовища через 18–24 год, що свідчило про активну проліферацію клітин і високу життєздатність культури.

Як інокулят використовували 24-годинну культуру клітин, яку вносили до живильного середовища з розрахунку досягнення початкової концентрації  $1,0-2,0 \cdot 10^6$  колонієутворюючих одиниць/мл (КУО/мл). Об'єм посівного матеріалу становив 1,0 % від загального об'єму середовища. Процес культивування здійснювали впродовж 48 год з подальшим аналізом ростових показників.

Оцінку ростової активності *B. subtilis* проводили на живильних середовищах LB та МПБ. Отримані результати засвідчили суттєву залежність інтенсивності росту культури від складу живильного середовища. Зокрема, у середовищі LB спостерігалось більш інтенсивне накопичення біомаси порівняно з МПБ, що підтверджувалося динамікою ростових кривих (рис. 1).

Рисунок 1 – Ріст *B. subtilis* на живильних середовищах LB і МПБ

За результатами кількісного обліку життєздатних клітин встановлено, що після 27-годинного вирощування культури показник бактеріального росту у середовищі LB досягав  $(8,15 \pm 1,1) \cdot 10^9$  КУО/мл, що більш ніж удвічі перевищувало аналогічне значення, отримане при культивуванні у МПБ –  $(3,3 \pm 1,1) \cdot 10^9$  КУО/мл. Виявлена різниця у рівні накопичення біомаси підтверджує вищу поживну ефективність середовища LB та обґрунтовує його вибір як базового для подальших експериментів, спрямованих на дослідження параметрів культивування штаму *Bacillus subtilis* В-7018 з метою одержання протеолітичних ферментів.

Біосинтез метаболітів бактеріальних клітин, зокрема синтез протеолітичних ферментів, визначається не лише складом живильного середовища, але й сукупністю фізико-хімічних параметрів культивування продуцента, серед яких ключову роль відіграють величина рН середовища, температурний режим, рівень аерації, а також кількісні та вікові характеристики інокуляту. Аналіз впливу зазначених факторів на інтенсивність біосинтезу протеаз є необхідним для обґрунтування оптимальних умов вирощування бактеріальної культури з метою підвищення виходу цільового ферментного продукту. У зв'язку з цим подальший етап досліджень був спрямований на культивування штаму-продуцента *Bacillus subtilis* за варійованих умов.

Дослідження кінетики росту культури *B. subtilis* у середовищі LB за значення рН 7,5 та швидкості перемішування 180 об/хв показало, що через 27-30 год культивування клітинна популяція досягає стаціонарної фази розвитку (рис. 2). У зазначений період реєструвався максимальний рівень протеолітичної активності у культуральній рідині. Встановлено, що коливання інтенсивності гойдання в межах  $\pm 20$  об/хв не мали істотного впливу ані на ріст біомаси, ані на рівень синтезу ферментів.

Подальші дослідження були спрямовані на оцінку впливу значення рН культурального середовища та поживних субстратів на ріст культури і синтез протеолітичного ферменту. Культивування здійснювали протягом 48 год до досягнення стабілізації показників оптичної щільності, що відповідало виходу на фазу плато.

З метою аналізу залежності рівня продукції протеази від значення рН середовища процес вирощування проводили за варійованих значень рН у діапазоні від 6,0 до 9,0

з кроком 0,5. Отримані експериментальні дані, що відображають вплив кислотно-лужних умов

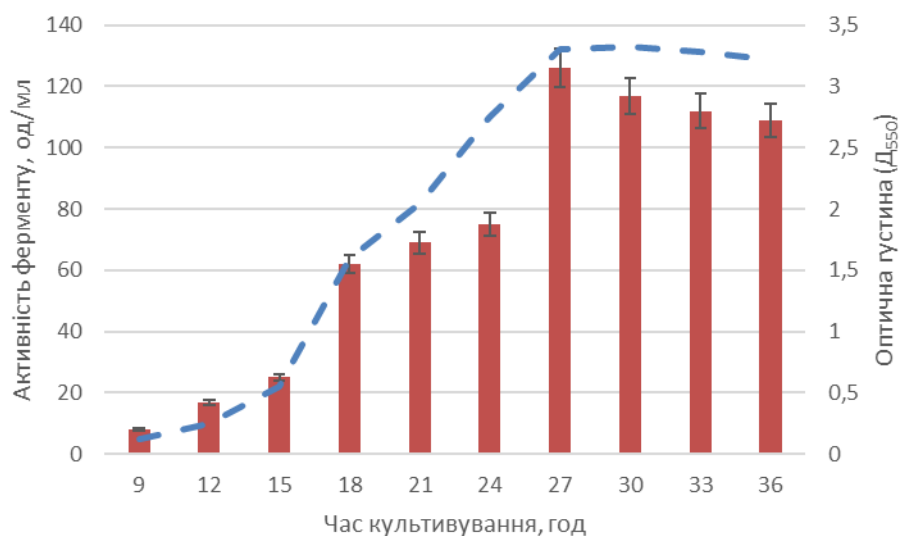


Рисунок 2 – Динаміка зростання культури *B. subtilis* (штрихова лінія) і накопичення протеази в культуральній рідині

на ферментативну активність культуральної рідини, наведено на рисунку 3.

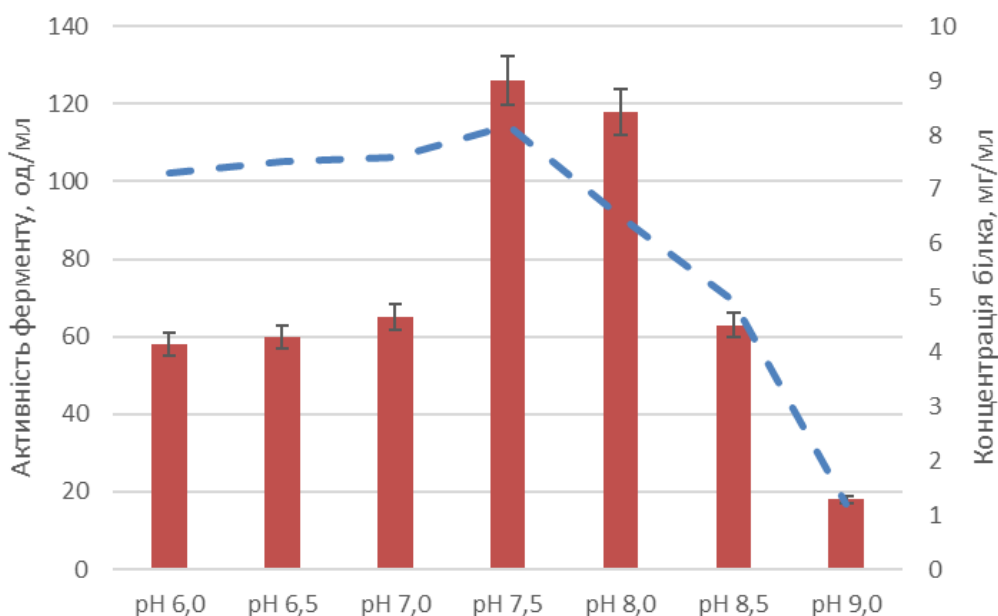


Рисунок 3 – Залежність концентрації білка у культуральній рідині (штрихова лінія) та продукції протеази від значення рН середовища для культивування

Аналіз експериментальних даних, наведених на рисунку 3, показав, що найвищі значення протеолітичної активності реєструвалися за культивування *B. subtilis* у середовищі в інтервалі рН 7,5–8,0. За цих умов також відзначено максимальний вміст білка у культуральній рідині, причому пік накопичення білкових сполук спостерігався при

pH 7,5. Встановлено наявність прямої кореляції між концентрацією білка у супернатанті та кількістю клітин у культурі, що підтверджувалося показниками оптичної щільності при 550 нм. Відповідно до результатів експерименту, була розрахована питома активність протеаз, яка досягала 15,4 од/мг сумарного білка при pH 7,5 та зростала до 18,2 од/мг за умов pH 8,0, тоді як подальше підвищення лужності середовища до pH 8,5 супроводжувалося зниженням цього показника до 12,7 од/мг. Отримані результати свідчать про наявність оптимального інтервалу кислотно-лужних умов для біосинтезу та секреції протеаз досліджуваним штамом.

Оцінку впливу білкових субстратів на синтез протеолітичних ферментів *B. subtilis* проводили шляхом внесення до живильного середовища LB желатину або казеїну у кінцевій концентрації 0,5 %. Культивування здійснювали протягом 48 год за оптимізованого значення pH 7,5 та швидкості гойдання 180 об/хв. Результати дослідження впливу зазначених субстратів на ферментативну активність культуральної рідини наведено на рисунку 4.

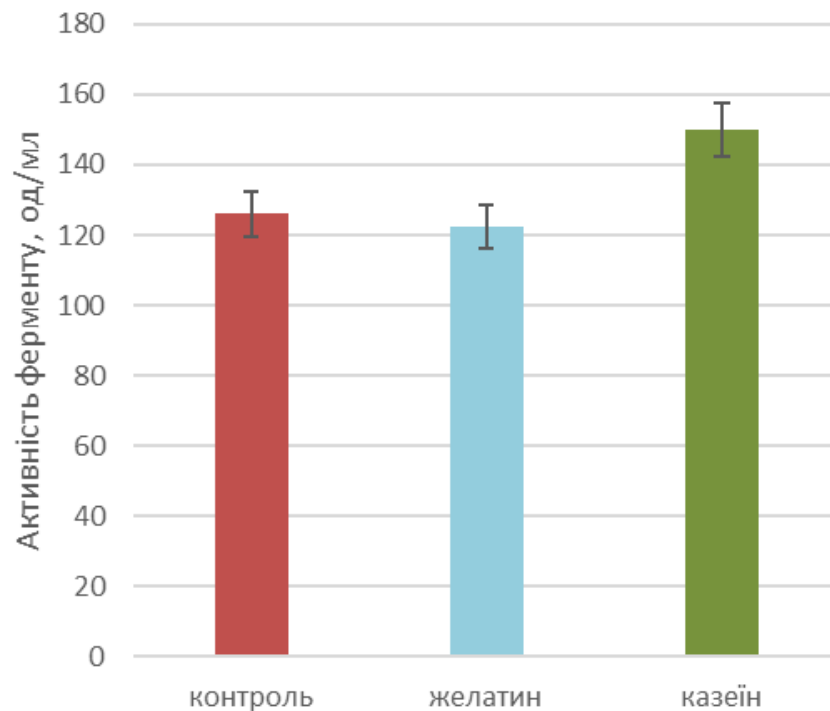


Рисунок 4 – Вплив внесених у культуральне середовище субстратів на продукцію протеази

Як свідчать дані, представлені на рисунку 4, введення желатину до складу живильного середовища супроводжувалося зменшенням рівня продукції протеази до 97 % порівняно з контролем. На відміну від цього, додавання казеїну позитивно впливало на синтез ферменту, забезпечуючи підвищення його виходу до 119 %. Отримані результати вказують на субстратну залежність біосинтезу протеолітичних ферментів *Bacillus subtilis* та підтверджують роль білкових компонентів середовища як регуляторів ферментативної активності.

**Висновки.** У ході досліджень встановлено, що живильне середовище LB є більш ефективним для культивування штаму *Bacillus subtilis* B-7018 як продуцента протеолі-

тичних ферментів. Експериментально обґрунтовано, що максимальний рівень біосинтезу позаклітинних протеаз досягається за умов культивування при значеннях рН 7,5–8,0, температурі 37 °С та інтенсивності перемішування 180 об/хв протягом 27–30 год. Показано, що додаткове збагачення рідкого живильного середовища ЛВ казеїном у концентрації до 0,5 % сприяє зростанню продуктивності протеолітичних ферментів. Сукупність отриманих результатів підтверджує перспективність подальшої оптимізації складу живильного середовища з метою інтенсифікації біосинтезу протеаз бактеріального походження.

### Література

1. Song P. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. P. 1–24.
2. Шкарлат П. А., Гармаш С. М. Мікробні протеолітичні ферменти переваги та перспективи застосування у ветеринарії. Належні рішення для прогалин у фармації: відповідно до європейських пріоритетів: збірник наукових праць II Міжнародної студентської науково-практичної конференції, м. Львів, 14–15 листопада 2024 р. Львів. 2024. С. 53.
3. Державна служба України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів. Реєстри у сферах ветеринарної медицини та безпечності харчових продуктів. URL: <https://dpss.gov.ua/diyalnist/bezpechnist-harchovih-produktiv-ta-veterinarna-medicina/reyestri> (дата звернення: 04.12.2025).
4. Hou W., Zhang X., Liu C.-F. Progress in chemical synthesis of peptides and proteins. *Transactions of Tianjin University*. 2017. Vol. 23. P. 401–419.
5. Liu Z.-Y., Yu X.-Z. Engineering *Bacillus subtilis* for high-value bioproduction: recent advances and applications. *Microbial Cell Factories*. 2025. Vol. 24. Art. 182.
6. Put H. *Bacillus subtilis* as a host for natural product discovery and engineering of biosynthetic gene clusters. *Natural Product Reports*. 2024. Vol. 41, No. 7. P. 1113–1151.
7. van Dijk J. M., Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*. 2013. Vol. 12. Art. 3.
8. Contesini F. J., Melo R. R. d., Sato H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017. Vol. 38, No. 3. P. 321–334.
9. Razzaq A. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019. Vol. 7. Art. 110.
10. Anson M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*. 1938. Vol. 22, No. 1. P. 79–89.
11. Saeed H. Optimization and characterization studies of poultry waste valorization for peptone production using a newly Egyptian *Bacillus subtilis* strain. *AMB Express*. 2025. Vol. 15. Art. 9.
12. Pan I. Exploration of compost soil for the production of thermo-stable *Bacillus* protease to synthesize bioactive compounds through soy protein hydrolysis. *Agronomy*. 2023. Vol. 13, No. 4. Art. 1019.
13. Shad A. A. Production, partial purification and characterization of protease through response surface methodology by *Bacillus subtilis* K-5. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2024. Vol. 67. Art. e24210355.
14. Sun B. The fermentation optimization for alkaline protease production by *Bacillus subtilis* BS-QR-052. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. P. 1–13.

## Bibliography (transliterated)

1. Song P. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. P. 1–24.
2. Shkarlat P. A., Harmash S. M. Mikrobni proteolitychni fermenty perevahy ta perspektyvy zastosuvannya u veterynarii. Nalezhni rishennia dlia prohalyn u farmatsii: vidpovidno do yevropeyskykh prioritytiv: zbirnyk naukovykh prats II Mizhnarodnoi studentskoï naukovopraktychnoi konferentsii, m. Lviv, 14–15 lystopada 2024 r. Lviv. 2024. P. 53.
3. Derzhavna sluzhba Ukrainy z pytan bezpechnosti kharchovykh produktiv ta zakhystu spozhyvachiv. Reiestry u sferakh veterynarnoi medytsyny ta bezpechnosti kharchovykh produktiv. URL: <https://dpss.gov.ua/diyalnist/bezpechnist-harchovih-produktiv-ta-veterinarna-medicina/reiestri> (дата звернення: 04.12.2025).
4. Hou W., Zhang X., Liu C.-F. Progress in chemical synthesis of peptides and proteins. *Transactions of Tianjin University*. 2017. Vol. 23. P. 401–419.
5. Liu Z.-Y., Yu X.-Z. Engineering *Bacillus subtilis* for high-value bioproduction: recent advances and applications. *Microbial Cell Factories*. 2025. Vol. 24. Art. 182.
6. Put H. *Bacillus subtilis* as a host for natural product discovery and engineering of biosynthetic gene clusters. *Natural Product Reports*. 2024. Vol. 41, No. 7. P. 1113–1151.
7. van Dijl J. M., Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*. 2013. Vol. 12. Art. 3.
8. Contesini F. J., Melo R. R. d., Sato H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017. Vol. 38, No. 3. P. 321–334.
9. Razzaq A. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019. Vol. 7. Art. 110.
10. Anson M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*. 1938. Vol. 22, No. 1. P. 79–89.
11. Saeed H. Optimization and characterization studies of poultry waste valorization for peptone production using a newly Egyptian *Bacillus subtilis* strain. *AMB Express*. 2025. Vol. 15. Art. 9.
12. Pan I. Exploration of compost soil for the production of thermo-stable *Bacillus* protease to synthesize bioactive compounds through soy protein hydrolysis. *Agronomy*. 2023. Vol. 13, No. 4. Art. 1019.
13. Shad A. A. Production, partial purification and characterization of protease through response surface methodology by *Bacillus subtilis* K-5. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2024. Vol. 67. Art. e24210355.
14. Sun B. The fermentation optimization for alkaline protease production by *Bacillus subtilis* BS-QR-052. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. P. 1–13.

УДК 663.1.579.6

П. А. Шкарлат, аспірант, С. М. Гармаш, канд. с-г. наук, доцент

**ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *BACILLUS SUBTILIS*  
ЯК ПРОДУЦЕНТА ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ**

У статті наведено результати дослідження, присвяченого вивченню умов культивування штаму *Bacillus subtilis* В-7018 як продуцента протеолітичних ферментів у

лабораторних умовах. Обґрунтовано актуальність використання протеаз бактеріального походження у різних галузях промисловості та ветеринарній медицині, зокрема для розробки препаратів, що сприяють очищенню ран і стимуляції процесів регенерації тканин. Показано доцільність використання *Bacillus subtilis* як безпечного та ефективного мікроорганізму-продуцента ферментів.

У роботі досліджено культурально-морфологічні властивості штаму *B. subtilis* B-7018, а також проаналізовано вплив складу живильного середовища та умов культивування на ріст клітин і біосинтез протеаз. Культивування проводили на живильних середовищах LB та м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) за температури 37 °C та різної тривалості ферментації. Приріст біомаси визначали нефелометричним методом, а протеолітичну активність – за модифікованим методом Ансона з використанням казеїну як субстрату.

Експериментально встановлено, що живильне середовище LB забезпечує більш інтенсивний ріст культури та вищу продуктивність протеолітичних ферментів порівняно з МПБ. Показано, що максимальна протеолітична активність культуральної рідини спостерігається через 27–30 год культивування, що відповідає переходу культури у стаціонарну фазу росту. Визначено оптимальні значення рН середовища для синтезу протеаз, які знаходяться в межах 7,5–8,0. Встановлено кореляцію між концентрацією білка, кількістю клітин та рівнем ферментативної активності.

Досліджено вплив додаткових білкових субстратів на біосинтез протеаз. Показано, що внесення казеїну в концентрації 0,5 % стимулює продукцію протеолітичних ферментів, тоді як желатин чинить слабкий інгібуючий ефект. Отримані результати підтверджують перспективність оптимізації складу живильного середовища та умов культивування для інтенсифікації біосинтезу протеаз штамом *Bacillus subtilis* B-7018.

**Ключові слова:** культивування, *Bacillus subtilis*, ферменти, протеази, середовище для культивування, біосинтез, технології.

P. A. Shkarlat, S. M. Garmash

### **STUDY OF THE CONDITIONS OF CULTIVATION OF *BACILLUS SUBTILIS* AS PROTEOLITIC ENZYMES PRODUCER**

The article presents the results of a study dedicated to investigating the cultivation conditions of the *Bacillus subtilis* B-7018 strain as a producer of proteolytic enzymes under laboratory conditions. The relevance of using bacterial-origin proteases in various industrial sectors and veterinary medicine is substantiated, particularly for the development of preparations that promote wound cleansing and stimulation of tissue regeneration processes. The feasibility of using *Bacillus subtilis* as a safe and effective microorganism-producer of enzymes is demonstrated.

The study examined the cultural and morphological properties of the *B. subtilis* B-7018 strain, as well as analyzed the influence of the nutrient medium composition and cultivation conditions on cell growth and protease biosynthesis. Cultivation was carried out on LB nutrient media and meat-peptone broth (MPB) at a temperature of 37 °C and varying fermentation durations. Biomass growth was determined by the nephelometric method, and proteolytic activity was assessed using the modified Anson method with casein as the substrate.

It was experimentally established that the LB nutrient medium provides more intensive culture growth and higher productivity of proteolytic enzymes compared to MPB. It was shown that the maximum proteolytic activity of the culture liquid is observed after 27-30 hours of cultivation, which corresponds to the culture's transition to the stationary growth phase. The optimal pH values of the medium for protease synthesis were determined to be in the range of 7.5–8.0. A correlation was established between protein concentration, cell count, and the level of enzymatic activity.

The influence of additional protein substrates on protease biosynthesis was investigated. It was shown that the addition of casein at a concentration of 0.5 % stimulates the production of proteolytic enzymes, whereas gelatin exerts a weak inhibitory effect. The obtained results confirm the prospects of optimizing the nutrient medium composition and cultivation conditions for intensifying the biosynthesis of proteases by the *Bacillus subtilis* B-7018 strain.

**Keywords:** cultivation, *Bacillus subtilis*, enzymes, proteases, cultivation medium, biosynthesis, technologies.

Отримано редколегією 22.12.2025

**Шкарлат Павло Анатолійович (Pavlo Shkarlat)**, аспірант кафедри біотехнології та безпеки життєдіяльності Українського державного університету науки і технологій ННІ «Український державний хіміко-технологічний університет», м. Дніпро, Україна, <https://orcid.org/0009-0003-5482-1883>;

**Гармаш Світлана Миколаївна (Svitlana Garmash)**, канд. с-г. наук, доцент кафедри біотехнології та безпеки життєдіяльності Українського державного університету науки і технологій ННІ «Український державний хіміко-технологічний університет», м. Дніпро, Україна, <https://orcid.org/0000-0002-2658-162X>.