

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ
ПОЛИСАХАРИДОВ *PAENIBACILLUS POLYMUХА* 92 ПРИ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМИ
ИСТОЧНИКАМИ УГЛЕРОДА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы

направления обучения 06.03.01 «Биология»

биологического факультета

Кравченя Полины Александровны

Научный руководитель

доцент кафедры биохимии и биофизики

к.б.н., доцент



Ю.П. Федоненко

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор



С.А. Коннова

08.06.2018

Саратов, 2018

Введение. Бактерии рода *Paenibacillus* привлекли к себе внимание ученых благодаря повсеместному распространению, устойчивости к условиям внешней среды, в том числе за счет спорообразования, а также широкому спектру производимых ими биологически активных веществ. К их числу относятся полисахариды, гидролитические ферменты, антибиотики и фитогормоны, составляющие основу многих биотехнологических процессов, что позволяет их активно использовать в медицине (Щетинин, 2000), сельском хозяйстве, нефтедобывающей и пищевой промышленности (Sutherland, 1998). Производимые ими экстраклеточные полисахариды являются биodeградируемыми и не наносят вреда окружающей среде, что обуславливает их использование в качестве биоудобрений, а также для биосорбции тяжёлых металлов и очистки сточных вод (Lal et al., 2009).

Актуальность и практический аспект данной работы обусловлен тем, что экстраклеточные полисахариды (ЭПС) бактерий обладают рядом уникальных свойств, что объясняет их использование во многих сферах жизнедеятельности человека. Экстраклеточные полисахариды, синтезируемые *P. polymyxa* 92, представляют собой биологически активные вещества, которые обладают гемагглютинирующими свойствами, комплиментсвязывающей способностью, антивирусными свойствами, усиливают лечебное действие антибиотиков, стимулируя факторы неспецифического иммунитета растений. Экзополисахариды обеспечивают вязкость и дают бактериям возможность агрегироваться с другими почвенными микроорганизмами, образуя микробно-растительные ассоциации. Способствуют прилипанию к почвенным и растительным тканям, защищая клетку от негативных воздействий окружающей среды. Было продемонстрировано вовлечение ЭПС *P. polymyxa* в процессы образования биопленок на абиотических поверхностях, колонизации корней проростков пшеницы и индукции морфологических изменений корневых волосков (Yegorenkova et al., 2011).

При культивировании бактерий *P. polymyxa* 92 на средах с различными источниками углерода возможно получить различные по составу и свойствам экстраклеточные полисахариды. При выборе объекта исследования мы остановили свой выбор на штамме *P. polymyxa* 92. Этот штамм был получен из ризосферы пшеницы и предположительно обладает высоким биотехнологическим потенциалом, как продуцент кислых и нейтральных ЭПС.

Цель дипломной работы: выявить индивидуальные структурные особенности ЭПС бактерий *P. polymyxa* 92, продуцируемые ими на жидкой среде с сахарозой, фруктозой и глюкозой в качестве источника углерода.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выделить экстраклеточные полисахариды *P. polymyxa* 92, продуцируемые при культивировании на средах с глюкозой, сахарозой или фруктозой, в качестве источника углерода.
2. Охарактеризовать вязкость полученных препаратов экзополисахаридов.
3. Определить структурные особенности исследуемых экзополисахаридов *P. polymyxa* 92.

Объект и методы исследования: в качестве объекта исследования в работе использовали бактерии *P. polymyxa* 92 (VNIISHM 92) (ранее *Bacillus polymyxa*), выделенный Ю.М. Возняковской (ВНИИСХМ, г. Пушкин) из корней пшеницы. В результате комплексного исследования, включающего биохимические и физико-химические методики, была обнаружена неоднородность экзогликанов по молекулярной массе и структурные различия биополимеров.

Структура бакалаврской работы. Бакалаврская работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов, списка используемой литературы. Основная часть включает в себя три главы: обзор литературы, материалы и методы исследования, а также результаты собственных исследований и их обсуждения. В обзоре литературы приведены данные об

общей характеристике бактерий *Paenibacillus polymyxa*, их использовании в биотехнологии при стимуляции роста и развития растений, роли экстраклеточных полисахаридов *P. polymyxa* в формировании ассоциаций с растениями, значении экзополисахаридов бактерий в экологии, применении *P. polymyxa* в медицине и фармацевтической промышленности, а также в нефтедобывающей и пищевой промышленности, структурных особенностях ЭПС бактерий и методах исследования их химической структуры.

Основное содержание работы. Экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.

Постановка эксперимента. Бактерии *P. polymyxa* 92 культивировали в течение 5 суток на вибростенде (220 об/мин) при 30°C в колбах, вместимостью 500 мл, содержащих 200 мл жидкой минеральной среды с различными источниками углерода (сахароза, глюкоза и фруктоза) до поздней стационарной фазы роста (от трёх до пяти суток). Для выделения ЭПС мы использовали предложенную ранее схему (Егоренкова и др., 2008). Бактериальные клетки осаждали центрифугированием (4400 об/мин, 40 мин). Отбирали супернатанты и использовали для осаждения ЭПС трёхкратным объёмом холодного ацетона. Осадок ЭПС несколько раз промывали холодным ацетоном для освобождения от воды и высушивали на воздухе, после чего измельчали и взвешивали. Выход ЭПС оценивали весовым методом на объём среды культивирования. Лиофильно высушенные образцы ЭПС представляли собой белые волокнистые вещества, плохо растворимые в холодной воде.

Препараты ЭПС характеризовали по суммарному содержанию углеводов, белка, сульфатов.

Определение моносахаридного состава ЭПС осуществляли методами ТСХ и ГЖХ. В первом случае образцы ЭПС (2 мг) гидролизovali в 2 мл 4 N трифторуксусной кислоты (ТФУ) (100°C, 2 ч). После удаления остатков ТФУ гидролат перерастворяли в минимальном объёме воды (3-5 мкл). В качестве

стандартов использовали растворы моносахаридов: глюкозы, маннозы, рамнозы, галактозы, а также глюкуроновой и галактуроновой кислот (5 мг/мл), а в качестве элюента – смесь растворителей пиридин:этилацетат:вода:уксусная кислота в соотношении 5:5:3:1. Проявление нейтральных сахаров и уроновых кислот проводили путём обработки хроматограмм раствором анизидинфталата в бутаноле с последующим нагревом до 115°C в течение 5 мин. Идентификацию моносахаридов в гидролизатах ЭПС осуществляли по рассчитанным значениям для стандартов сахаров Rf. Количественное определение моносахаридного состава проводили методом ГЖХ ацетатов полиолов после полного гидролиза ЭПС, восстановления NaBH₄ и ацетилирования. Образцы анализировали на хроматографе GC 2010 Shimadzu, снабженном капиллярной колонкой со стационарной фазой DB-5, в градиенте температуры от 180°C (1 мин) до 290°C со скоростью нагрева 7°C /мин.

Содержание жирных кислот в образцах ЭПС оценивали методом ГЖХ метиловых эфиров, полученных метанолизом. Результаты экспериментов обрабатывались статистически.

Метилирование ЭПС проводили CH₃I в присутствии порошкообразного NaOH (Ciucanu et al., 1984), затем образцы гидролизовали, восстанавливали и ацетилировали. Частично метилированные ацетаты полиолов анализировали ГЖХ–МС на хроматографе Hewlett–Packard HP 5989 с капиллярной колонкой HP-5ms в градиенте температуры от 150°C (3 мин) до 320°C со скоростью нагрева 5°C /мин.

Спектры ЯМР записывали на спектрометрах DRX-500 и Avance II 600 в растворе 99,96% D₂O при 30°C (внутренний стандарт – ацетон, δ_C 31,45 и 3-триметилсилилпропаноат-d₄, δ_H 0,0). Образцы предварительно лиофилизировали дважды из 99,9% D₂O. Двумерные спектры записывали с использованием стандартного математического обеспечения компании “Bruker” (Германия). Для сбора и обработки данных использовали программу XWINNMR 2.1. В

экспериментах TOCSY и NOESY время смешивания составляло 150 и 200 мс соответственно. Установление структуры полисахаридов проводили в совместных исследованиях с сотрудниками лаборатории химии углеводов ИОХ РАН имени Н.Д.Зелинского (г. Москва).

ИК-спектры регистрировали с использованием спектрометра Nicolet 6700 (“Thermo Scientific”, США), снабженном поглотителями H₂O и CO₂. Спектры сухого воздуха использовали в качестве контроля. Образцы ЭПС размещали на золотых зеркальных подложках. Спектры записывали в режиме диффузного отражения в интервале 4000–400 см⁻¹, спектральное разрешение 4 см⁻¹. Оборудование было предоставлено Центром коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Измерения реологических свойств растворов ЭПС проводились с использованием вращательного вискозиметра Brookfield DV2T RVT (Brookfield Engineering Labs Inc.), оснащенного шпинделем SC4-21. Измерения проводили при 20,0, 25,0, 30,0, 35,0 ± 0,4°C, изменяя скорость сдвига с 186,00 до 9,30 с⁻¹ с приращением 9,30 с⁻¹ и при 4,65 с⁻¹ с интервалом в 1 мин между срезами для уравнивания раствора. Эксперимент проводился в трёх повторностях. Результаты обрабатывались в программе Rheocalc T, версия 1.2.19. Кажущуюся вязкость определяли, как функцию напряжения сдвига от скорости сдвига.

Стандартный анализ эмульгирующей активности проводили, смешивая гексадекан, *o*-ксилол или подсолнечное масло (3 мл) с 2 мл 1 % раствора ЭПС в пробирке на вортексе в течение 5 мин.

Обсуждение результатов исследования. Бактерии демонстрировали сходную динамику роста на выбранных нами средах. Однако по продукции ЭПС используемые нами варианты достаточно сильно различались. На жидкой питательной среде с глюкозой и фруктозой бактерии *P. polytuxa* 92 продуцировали приблизительно равное количество экзогликанов, в то время

как при замене в среде выращивания источника углерода на сахарозу выход биополимера существенно возрастал ~ на порядок (таблица 1). Таким образом, использование сахарозы в качестве источника культивирования *P. polytuxa* 92 с целью получения максимальной продукции ЭПС представляется наиболее перспективным.

Таблица 1 – Характеристика ЭПС *P. polytuxa* 92, культивируемых на средах с различными источниками углерода

Источник углерода	Выход (г/л)	Белки (%)	Сульфаты (%)	Моносахариды*		
				Glc	Man	Gal
Glc	1,9 ± 0,1	сл.	2,5 ± 0,6	1,5	3,0	0,5
Fru	1,1 ± 0,2	сл.	н.о.	1,5	3,0	сл.
Suc	14,9 ± 0,5	сл.	4,8 ± 0,4	1,2	1,0	сл.

Примечания: «*» – молярное соотношение по данным ГЖХ ацетатов полиолов; «сл.» – содержание менее 1 %; «н.о.» – не определяли.

Сравнительный анализ образцов ЭПС продемонстрировал наличие низкого содержания белка, которое составило менее 1%, свидетельствующее о незначительном количестве белковых примесей во всех исследуемых образцах. Наличие липидных фракций в составе ЭПС было подтверждено анализом метиловых эфиров жирных кислот ГЖХ. Выявлены небольшие отличия в составе и соотношении жирных кислот. Однако липидные фракции в обоих ЭПС присутствовали в незначительном количестве, о чем свидетельствовала достаточно низкая интенсивность пиков метиловых эфиров жирных кислот.

Общее содержание сульфатов для изучаемых препаратов ЭПС отличалось примерно в два раза (таблица 1), причем большее содержание сульфатов было отмечено для ЭПС бактерий, культивирование которых осуществлялось в среде с сахарозой в качестве источника углерода. Согласно литературным данным и полученным нами результатам (см. ниже), увеличение

содержания сульфатов в ЭПС коррелирует с менее выраженной вязкостью его водного раствора.

Методом ГЖХ после гидролиза препаратов ЭПС с последующим восстановлением и ацелированием, было показано присутствие в качестве преобладающих моносахаридов глюкозы и маннозы, но в несколько отличном соотношении: для ЭПС_{SUC} оно было примерно равным, а для ЭПС_{FRU} и ЭПС_{GLC} – составило 1:2. Методом ГЖХ-МС в составе ЭПС был выявлен преобладающий компонент 6-замещенная фруктоза.

Поскольку уруновые кислоты, часто присутствующие в составе бактериальных ЭПС, этим методом не идентифицируются, мы использовали метод ТСХ, с последующим проявлением хроматограмм анизидинфталатом. Идентификацию моносахаридов в гидролизатах ЭПС осуществляли по рассчитанным значениям для стандартов сахаров Rf.

Следует отметить, что вопреки ожидаемому выявлению в гидролизате ЭПС маннозы и глюкозы, было показано наличие одного моносахарида в области нейтральных гексоз, Rf которого не совпадал по своим значениям с таковыми для стандартных маннозы и глюкозы. По литературным данным в этой области при используемых нами условиях также локализуется фруктоза. Однако малые различия в Rf не позволяют обычно четко идентифицировать эти три моносахарида. Если принять во внимание, что при гидролизе и последующем восстановлении фруктозы (которые являются этапами подготовки ацетатов полиолов) образуются два ее энантиомера – манноза и глюкоза, то можно предположить, что преобладающим сахаром в составе ЭПС является именно фруктоза. В верхней части хроматограммы присутствовало ярко окрашенное пятно, совпадающее по цвету с пятнами уруновых кислот. Однако пятна соответствующих кислот были локализованы в нижней части хроматограммы. Мы предположили, что в процессе гидролиза произошло образование лактонной формы, что и вызвало резкое изменение хроматографической подвижности образца.

Следует отметить, что ИК-спектры исследуемых ЭПС демонстрировали достаточно большое сходство. В спектрах обоих ЭПС присутствовали широкие полосы при 3300-3342 см^{-1} , отвечающие валентным колебаниям ОН групп, а также полосы деформационных колебаний ОН при 1629-1631 см^{-1} . Наличие полос при 1657 см^{-1} («Амид-I») и 1531-1536 см^{-1} («Амид-II»), очевидно, объясняется примесью белков в препарате. Следует отметить, что для ЭПС штамма 92 полоса «Амид-I» проявляется в характерной для α -спиралей белков области ($1655 \pm 5 \text{см}^{-1}$). В спектрах образцов отмечены симметричные и антисимметричные колебания фрагмента О-С-О (диссоциированной карбоксильной группы) при 1406 и 1548-1553 см^{-1} соответственно. Эти данные однозначно свидетельствуют о присутствии остатков уроновых кислот в образцах ЭПС. Кроме того, при 1406 см^{-1} проявляются деформационные колебания фрагментов $\delta(\text{C-OH})$.

Поглощение в области 1240-1250 см^{-1} обусловлено валентными колебаниями S=O и говорит о наличии сульфоновых или сульфатных групп в составе исследуемых ЭПС по аналогии с охарактеризованными каррагинанами и фукоиданами. Очевидно, что поглощение в этой области не может быть связано с проявлением полосы «Амид-III», характерной для пептидов, учитывая свойственную ей слабую интенсивность и низкое содержание белков в препаратах, исследуемых ЭПС. Наиболее сложна для интерпретации в спектрах углеводов область 1150-920 см^{-1} , где проявляются интенсивные колебания простых связей С-О, в том числе в составе гликозидных фрагментов С-О-С. В спектрах, изучаемых ЭПС в этой области наблюдались широкие полосы, очевидно, обусловленные перекрытием отдельных полос. В спектре образца ЭПС_{GLC} *P. polytuxa* 92, рассматриваемая полоса претерпевает сдвиг в низкочастотную область, и максимумы наблюдались при 1143-1147 см^{-1} . Важной для идентификации сахаров является область 1000-1100 см^{-1} . В спектрах ЭПС проявлялись полосы поглощения при 1015-1018 см^{-1} , наблюдаемые в спектрах пектинов, моно и дисахаридов. В ИК-спектрах всех

образцов ЭПС *P. polymuxa* поглощение в области $\sim 844 \text{ см}^{-1}$ отсутствует, в то время как имеются полосы поглощения при $868\text{-}889 \text{ см}^{-1}$, соответствующие полосе типа 2b, что однозначно говорит о β -конфигурации всех аномерных атомов углерода в составе исследуемых полисахаридов. Таким образом, данные ИК спектроскопии хорошо согласуются с данными моносахаридного анализа и анализа методом метилирования исследуемых ЭПС. Сопоставление полос позволило определить β -конфигурацию аномерных атомов углерода.

Достоверные данные по анализу реологических свойств были получены только для растворов двух препаратов ЭПС_{GLC} и ЭПС_{SUC}. Следует отметить, что профили кривых вязкости при изменении скорости сдвига у исследуемых ЭПС *P. polymuxa* 92 были практически идентичны, что свидетельствует об отсутствии существенных различий в структуре биополимеров. Растворы обоих образцов ЭПС при каждом из выбранных значений температуры проявляли псевдопластические свойства, что выражалось в уменьшении кажущейся вязкости при увеличении скорости сдвига. Кроме того, они не демонстрировали значительного уменьшения вязкости при увеличении температуры, что позволяло сделать предварительный вывод о малом вкладе межмолекулярных взаимодействий в реологические свойства растворов ЭПС *P. polymuxa* 92. Одной из причин этого может быть небольшое содержание уоновых кислот в полисахаридах.

Исследуемые ЭПС характеризовались достаточно низкой эмульгирующей активностью (5-6%) в отношении гидрофобных веществ различной природы (гексадекана, *o*-ксилола и подсолнечного масла).

В связи с тем, что полученные образцы характеризовались высокой вязкостью и высокой молекулярной массой, определить их структуру методом ЯМР не представлялось возможным. Для снижения молекулярной массы препаратов мы использовали метод неспецифического расщепления – кислотный гидролиз. Для проведения кислотного гидролиза были экспериментально подобраны условия: $0,05 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ (40°C , 1 ч).

Подвергнутый кислотному гидролизу ЭПС *P. polytuxa* 92 фракционировали методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-50. Высокмолекулярную фракцию анализировали методом ЯМР–спектроскопии.

^{13}C ЯМР спектр ЭПС содержал шесть основных сигналов, в том числе один сигнал аномерного углерода δ 105,3, два сигнала $\text{HOCH}_2 - \text{C}$ при δ 61,7 и 64,6, а также другие сигналы моносахаридного кольца в диапазоне δ 76,1 – 81,4. ^1H ЯМР спектр содержал сигналы шести атомов H в диапазоне δ 3,60–4,19. Таким образом, исследуемый ЭПС представляет собой гомополимер.

Сигналы ^1H и ^{13}C ЯМР спектров были отнесены с помощью 2D ЯМР экспериментов: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и HMBC (таблица 2). Из эксперимента $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC следовало, что аномерный углерод при δ 105,3 является четвертичным, следовательно, ЭПС состоит из остатков кетозы. $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY спектр демонстрировал корреляции протонов H-6a и H-6b с H-5, H-4 и H-3, таким образом, ЭПС представляет собой фруктан.

Таблица 2 – Данные ^1H и ^{13}C ЯМР ЭПС *P. polytuxa* 92

Остаток	H-1(a; b)	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (a; b)
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\rightarrow 6$)- β -D-Fru/(2 \rightarrow	3.70; 3.77 61.7	105.3	4.19 78.0	4.09 76.7	3.95 81.4	3.60; 3.90 64.6

$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC спектр позволил выявить следующие внутризвеньевые корреляции: C-2/H-1a, C-2/H-1b, C-5/H-6a, C-3/H-4 и C-5/H-4, и C-6/H-4, свидетельствующие о том, что фруктоза в составе ЭПС находится в β -конфигурации. Наличие межзвеньевых корреляций C-2/H-6a и C-2/H-6b указывает на наличие 2 \rightarrow 6 связей между остатками фруктозы. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что ЭПС *P. polytuxa* 92 представляет собой регулярный фруктан (леван) с повторяющимся звеном следующей структуры: $\rightarrow 6$)- β -D-Fru (2 \rightarrow).

Заключение. В настоящей работе при культивировании в минеральных средах с различными источниками углерода было показано, что наиболее

перспективным субстратом для получения максимальной продукции ЭПС штаммом *P. polytuxa* 92 является сахароза. Растворы ЭПС, образуемых штаммом 92 при культивировании в средах с различным источником углерода, характеризовались невысокой эмульгирующей активностью и незначительными различиями в вязкости, очевидно обусловленными отличием в содержании уроновых кислот и сульфатов.

Для снижения вязкости и молекулярной массы ЭПС, препятствующих ЯМР исследованию структуры полисахарида, были подобраны условия неспецифического кислотного гидролиза, которые позволили фрагментировать ЭПС и получить модифицированный препарат, сохранивший высокую степень полимерности. Высокомолекулярную фракцию модифицированного ЭПС анализировали методом ЯМР-спектроскопии. Были получены приоритетные данные о структуре ЭПС *P. polytuxa* 92, который представляет собой регулярный фруктан (леван) с повторяющимся звеном следующей структуры: $\rightarrow 6) - \beta - D - Fru (2 \rightarrow$.

На основании данных химического анализа и ИК спектроскопии высказано предположение, что исследуемые ЭПС различались содержанием уроновых кислот и сульфатов, которые, вероятно, декорируют основной полисахарид, либо вступают с ним в межмолекулярные взаимодействия.

Выводы.

1. Выделены экстраклеточные полисахариды бактерий *P. polytuxa* 92, культивируемые на жидких питательных средах с сахарозой, фруктозой или глюкозой. Максимальная продукция ЭПС отмечена при культивировании *P. polytuxa* на среде с сахарозой.
2. В результате исследования была охарактеризована вязкость полученных препаратов экзополисахаридов.
3. Установлено, что продуцируемый *P. polytuxa* 92 ЭПС является линейным гомополимером фруктозы (леваном) с повторяющимся звеном $\rightarrow 6) - \beta - D - Fru (2 \rightarrow$.

