

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

Работа выполнена на базе Учебно-научного центра
физико-химической биологии СГУ и ИБФРМ РАН

**ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ
*PAENIBACILLUS POLYMYXA 88 A***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Аскеровой Севинч Маарифовны

Научный руководитель:

Доцент кафедры биохимии и
биофизики, к.б.н.

А.А. Галицкая

подпись, дата

Научный консультант:

к.б.н., с.н.с. лаборатории
биохимии ИБФРМ РАН

И.В. Егоренкова

подпись, дата

Зав. кафедрой биохимии и

биофизики, д.б.н., профессор

С.А. Коннова

подпись, дата

Саратов, 2020

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Бактерии *Paenibacillus polymyxa*, являясь участниками микробно-растительных ассоциаций, способны положительно влиять на рост и развитие широкого круга растений. Более того, данные микроорганизмы широко используются в качестве компонента комплексных бактериальных удобрений, что приводит к обогащению окружающей среды выделяемыми ими полисахаридами. *P. polymyxa* продуцирует широкий спектр экзополисахаридов с различными физиологическими и биотехнологическими функциями, что способствует их активному использованию в различных промышленных процессах и сельском хозяйстве.

Известно, что экстраклеточные полисахариды (ЭПС) бактерий обладают рядом уникальных свойств, что объясняет их использование во многих сферах жизнедеятельности человека. Многообразие свойств обусловлено особенностями строения, в том числе вызванными условиями культивирования или влиянием внешней среды. Направленное изменение структуры и физико-химических свойств ЭПС в значительной степени позволит расширить круг их применения, в связи с чем получение полисахаридов с заданными свойствами является важной биотехнологической задачей. Это обуславливает актуальность и практический аспект данной работы.

Цели и задачи исследования. Цель работы: охарактеризовать внеклеточные полисахариды бактерий *Paenibacillus polymyxa* 88А, синтезируемые ими на питательной среде с сахарозой.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать процесс накопления экзополисахаридов бактериями *P. polymyxa* 88А;

2. Выделить препараты экзополисахаридов *P. polymyxa* 88A, продуцируемых при культивировании бактерий на среде с сахарозой в качестве источника углерода.

3. Определить состав и структурные особенности экзополисахаридов *P. polymyxa* 88A, синтезируемых на среде с сахарозой.

Структура бакалаврской работы: работа состоит из списка сокращений, введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор написан с использованием 21 источника, в нём рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика бактерий *Paenibacillus polymyxa*, использование этих бактерий в практике, структура экзополисахаридов, влияние внешних условий на строение и свойства экзополисахаридов.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы бактерии *P. polymyxa* 88A (ЦМПМ В-4556), по старой классификации *B. polymyxa*. Штамм получен кратковременным облучением мощным микроволновым излучением с частотой 2375 МГц штамма *P. polymyxa* ССМ 1459^Г.

Бактерии *P. polymyxa* выращивали в течение 7 суток при 30°C в жидкой среде при перемешивании на вибростенде или на плотной питательной среде следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 4,0; Na₂HPO₄ – 1,1; KН₂PO₄ – 0,5; MgSO₄ × 7H₂O – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; СаСО₃ – 0,2; сахароза – 30, вода дистиллированная до 1 л, рН 7,2–7,5. Культуры поддерживались при 4 °С на чашках Петри с твердой средой того же состава с добавлением 2% агар-агара.

Количество бактериальных клеток (КОЕ) в жидкой среде определяли методом посева на твердые питательные среды. Проводили выделение ЭПС, суммарное содержание углеводов в полученных образцах определяли спектрофотометрически по реакции с фенолом и серной кислотой. Моносахаридный состав ЭПС анализировали после гидролиза 0,01 М Н₂SO₄ при 80 °С в течение 2 ч, с последующей нейтрализацией 5 М NaOH. Анализ осуществляли методом высокоэффективной анионообменной хроматографии.

Химическую структуру ЭПС *P. polymyxa* 88А после частичного гидролиза устанавливали методом ЯМР-спектроскопии.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

На первом этапе работы мы провели периодическое культивирование штамма 88А на питательной среде с сахарозой с оценкой динамики роста, выхода ЭПС (ЭПСсах) и изменения рН среды. Пробы были отобраны сразу после посева, затем через 6 часов и далее каждые сутки в течение недели. Методом высева из серийных десятикратных разведений на чашки с агаризованной средой было определено количество жизнеспособных клеток.

Приведенная на рисунке 1 кривая показывает, что максимальное количество жизнеспособных клеток (порядка 10^8 кл/мл) приходилось на 24-48 ч. При дальнейшем их культивировании отмечалось снижение численности клеток, к 7 суткам количество клеток составило порядка 10^6 кл/мл. Активный рост бактерий сопровождался значительным снижением рН (с 7,0 до 5,1) в среде культивирования (рисунок 2), что происходило, вероятно, за счет выделения бактериями органических кислот.

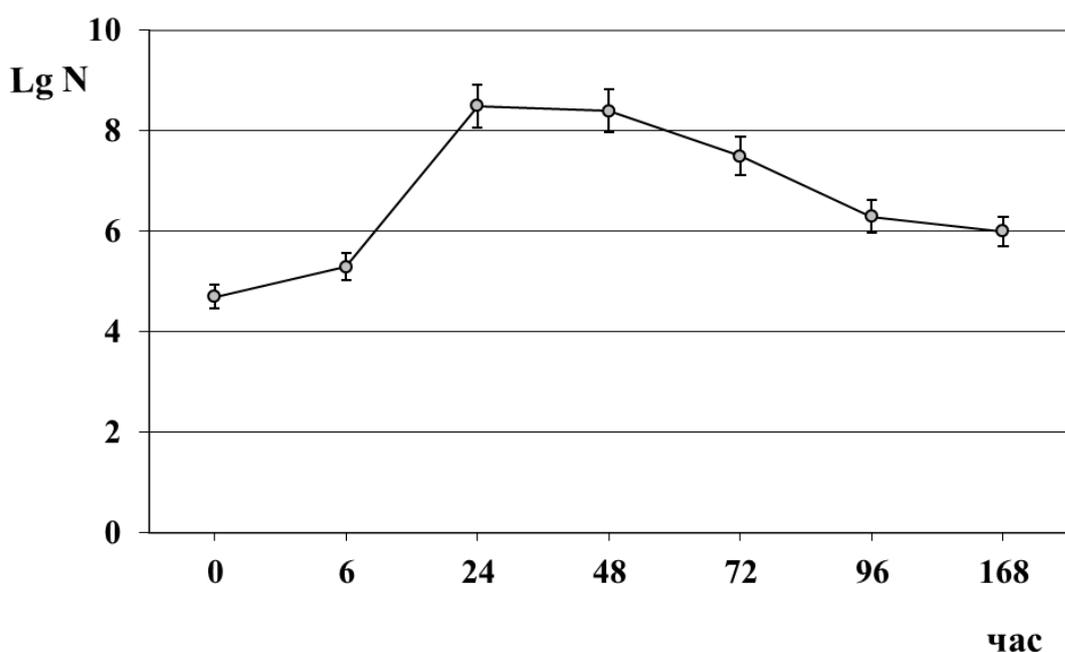


Рисунок 1 – Динамика роста бактерий *P. polytuxa* 88А на жидкой питательной среде с 3% сахарозы. N – количество клеток/мл

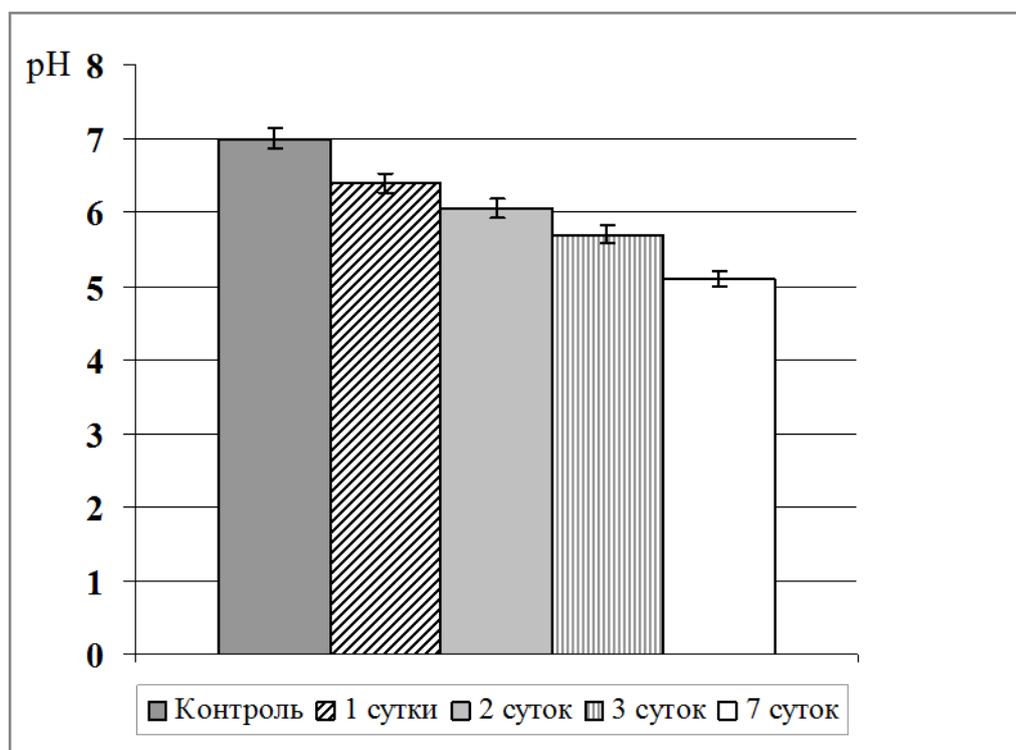


Рисунок 2 – Изменение рН в среде культивирования в течение 7-и суток роста бактерий *P. polytuxa* 88А

Для определения периода максимального накопления ЭПС бактериями *P. polytuxa* 88А исследовали динамику этого процесса (рисунок 3). В результате проведенных экспериментов было показано, что образование внеклеточных полисахаридов наблюдалось на всех фазах роста, начиная с логарифмической, причем концентрация ЭПС в среде к концу ферментации снижалась незначительно. Известно, что максимум накопления ЭПС не всегда совпадает во времени с максимальной плотностью бактерий в среде и часто достигается к поздней стационарной фазе роста. Это подтверждается

нашими данными: максимальный выход ЭПС отмечен в период 72-96 ч (рисунок 3).

В данных условиях культивирования бактерии накапливали до 11,5 г/л ЭПС. Как показано ранее, на среде с глюкозой *P. polytuxa* 88А продуцировали 10-12 г/л ЭПС. Типовой штамм *P. polytuxa* ССМ 1459^Т накапливал 12,9 г/л ЭПС на среде с сахарозой и 7,3 г/л при смене источника углерода на глюкозу. Известно, что на биосинтез, состав и физико-химические свойства ЭПС существенно влияют условия культивирования бактерий.

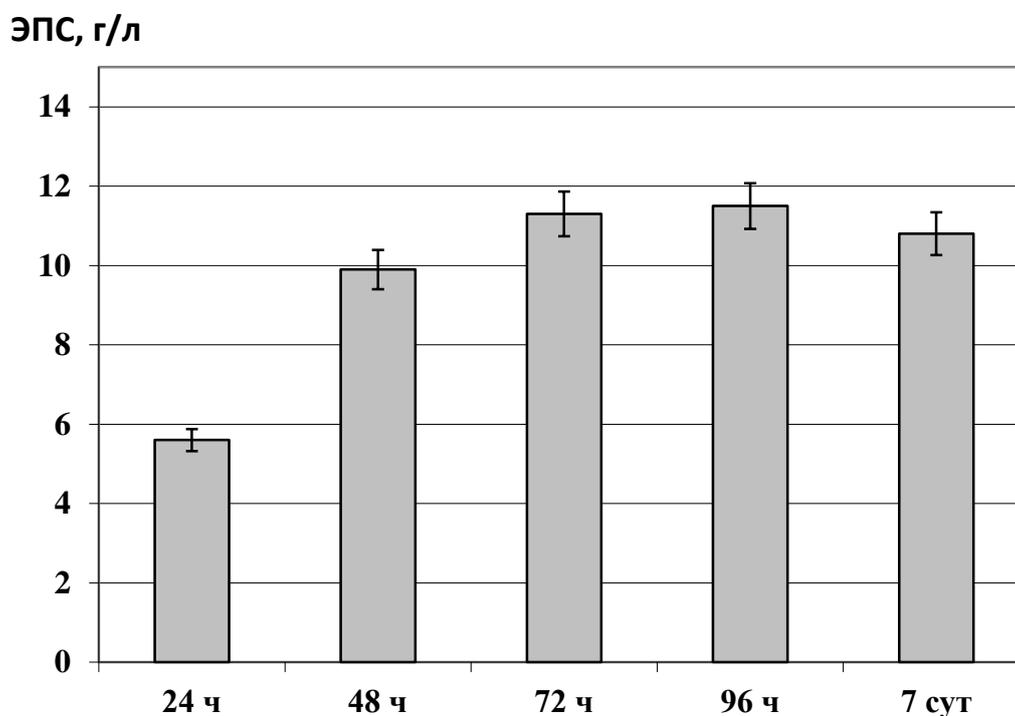


Рисунок 3 – Динамика накопления ЭПС бактериями *P. polytuxa* 88А при 7-и суточном культивировании на среде с 3 % сахарозы

Следующий этап наших исследований был посвящен выделению, очистке и изучению состава экзогликанов бактерий *P. polytuxa* 88А различными физико-химическими методами.

Колориметрическими методами установлено, что на долю углеводов в ЭПС данного штамма *P. polytuxa* приходилось 85-87%, белка – 1,5% от массы препарата, что свидетельствует о незначительном количестве

белковых примесей. Анализ метиловых эфиров жирных кислот ГЖХ выявил наличие липидных фракций в составе ЭПС, которые имелись в незначительном количестве.

В составе исследуемого ЭПС методом НРАЕС–РАD после кислотного гидролиза было показано наличие единственного пика, который по времени удерживания соответствовал фруктозе. Таким образом, ЭПС *P. polymyxa* 88А являлся гомополимером фруктозы. Поскольку многие представители паэнибацилл, в том числе *P. polymyxa*, характеризуются наличием левансахаразной активности и являются продуцентами левана, мы предположили, что исследуемый в нашей работе штамм при росте на среде с сахарозой в качестве источника углерода также продуцирует леван.

Для получения информации о структуре ЭПС мы воспользовались методами ИК и ЯМР спектроскопии. В ИК-спектре ЭПС присутствовала широкая интенсивная полоса при 3405 см^{-1} , отвечающая валентным колебаниям гидроксильных групп моносахаридных остатков. Отмечены антисимметричные при 2965 и 2925 см^{-1} и симметричные валентные колебания при 2890 и 2857 см^{-1} алкильных групп соответственно.

Важной для характеристики сахаров, но в то же время наиболее трудной для интерпретации, является область $1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$. В данной области спектра ЭПС присутствовали полоса валентных колебаний С-ОН групп при 1056 см^{-1} и полоса при 1158 см^{-1} , характеристичная для гликозидного фрагмента С-О-С. В низкочастотной области спектра были выявлены перекрывающиеся полосы при 921 и 811 см^{-1} , свидетельствующие о присутствии в ЭПС моносахаридов в фуранозной форме. В области $760\text{--}940\text{ см}^{-1}$, характеристичной для определения гликозидной связи, наиболее значимые полосы принято обозначать соответственно полосами типа 1 (колебания кольца), типа 2 (деформационные колебания $\delta(\text{C1-H})$ при аномерном атоме углерода) и типа 3 (пульсационные колебания пиранозного кольца). Полосы типа 1 и 3 для определения α - и β -конфигурации мало вариативны. Наиболее чувствительна к конфигурации аномерного атома

углерода полоса типа 2, поскольку атомы водорода в случае α -конфигурации располагаются экваториально, а в случае β -конфигурации – аксиально. Полоса 2a (в случае α -конфигурации) обычно проявляется в диапазоне 837-850 см^{-1} , в то время как полоса 2b (в случае β -конфигурации) смещена гипсохромно относительно 2a, и наблюдается в диапазоне 880-896 см^{-1} .

В ИК спектре ЭПС *P. polymyxa* 88A поглощение в области $\sim 844 \text{ см}^{-1}$ отсутствует, в то время как имеются полосы поглощения при 868-889 см^{-1} , соответствующие полосе типа 2b, что однозначно говорит о β -конфигурации всех аномерных атомов углерода в составе исследуемого полисахарида. Таким образом, данные ИК-спектроскопии подтверждают, что исследуемый ЭПС являлся полимером β -фруктозы.

Выделенные препараты ЭПС *P. polymyxa* 88A имели высокую молекулярную массу и характеризовались высокой вязкостью водных растворов, что существенно затрудняло дальнейшее определение структуры методом ЯМР. В связи с этим, препарат требовал специальной подготовки для последующего анализа. С этой целью ЭПС был подвергнут неспецифическому кислотному гидролизу. Предварительно были подобраны условия, при которых можно было получить препарат ЭПС со сниженной молекулярной массой. ЭПС растворяли в пиридин-ацетатном буфере, используя магнитную мешалку и нагрев 40 °С, обрабатывали ультразвуком и подвергали частичному гидролизу 0,05 N H_2SO_4 (40 °С, 1 ч). Затем, посредством гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-50 препарат фракционировали, отбирали высокомолекулярную фракцию, структуру которой устанавливали методом ЯМР-спектроскопии.

В ^{13}C ЯМР спектре ЭПС присутствовало шесть сигналов атомов углерода гомополимера фруктозы, включающих сигнал аномерного атома углерода при δ 105,3, два сигнала $\text{HOCH}_2\text{—C}$ при δ 61,7 и 64,6 и три сигнала от HOCH—C при δ 76,1, 78,0 и 81,4. В ^1H ЯМР спектре (рисунок 4) было выявлено семь сигналов протонов в области δ 3,54–4,19. Следует отметить, что ЯМР спектры ЭПСсах штамма 88A практически идентичны таковым для

ранее охарактеризованного левана, продуцируемого *P. polytuxa* 92. Дальнейшее отнесение сигналов одномерных ЯМР спектров с помощью двумерных $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC экспериментов подтвердили это предположение. Следовательно, при культивировании на минеральной среде с сахарозой в качестве источника углерода штамм *P. polytuxa* 88А продуцирует в качестве ЭПС β -(2 \rightarrow 6)-связанный фруктан (леван).

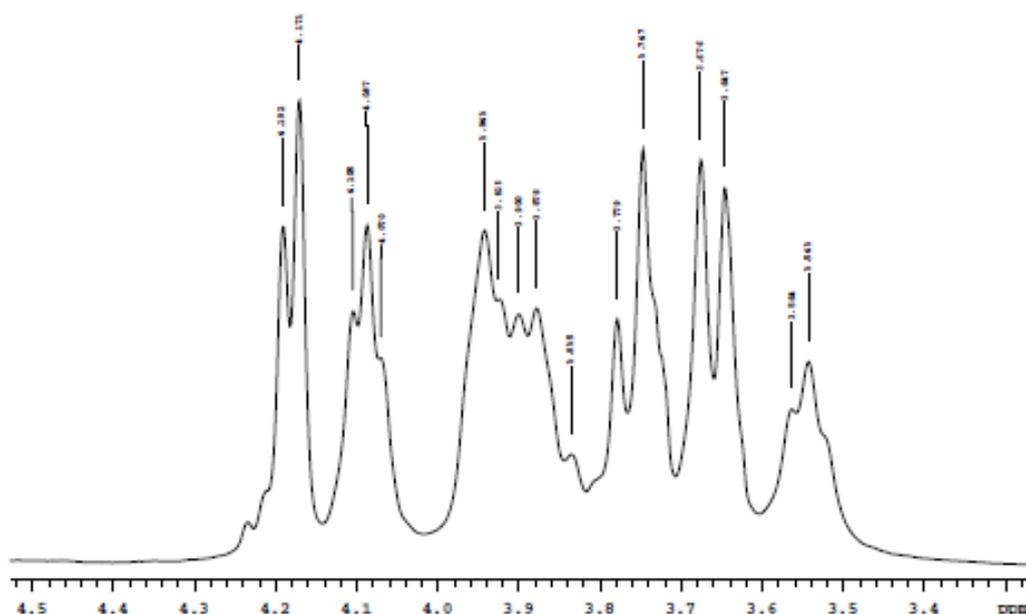


Рисунок 4 – ^1H ЯМР спектр ЭПС *P. polytuxa* 88А

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был изучен процесс накопления ЭПС бактериями *P. polytuxa* 88А при культивировании в минеральной среде с сахарозой, выделен ЭПСсах и исследована структура данного полисахарида. Максимальное количество жизнеспособных клеток составило примерно 10^8 кл/мл к 24-48 ч. Максимальный выход ЭПС 11,5 г/л отмечен в период 72-96 ч, зафиксировано значительное снижение рН в среде культивирования с 7,0 до 5,1 через 7 суток роста.

Для получения информации о структуре ЭПС использовали ИК и ЯМР спектроскопию. Для подготовки препарата ЭПС к ЯМР полисахарид был подвергнут неспецифическому кислотному гидролизу. Предварительно были подобраны условия для получения ЭПС со сниженной вязкостью и молекулярной массой. В результате было установлено, что при культивировании в минеральной среде с сахарозой в качестве источника углерода *P. polymyxa* 88А продуцирует в качестве ЭПС β -(2→6)-связанный фруктан (леван).

ВЫВОДЫ

1. В процессе периодического культивирования бактерий *Paenibacillus polymyxa* 88А в жидкой питательной среде с сахарозой исследованы накопление и состав экзополисахаридов. Максимальный выход ЭПС составил 11,5 г/л.
2. Выделены внеклеточные полисахариды (ЭПСсах) бактерий *P. polymyxa* 88А и изучен их химический состав. В составе ЭПС выявлено 85-87% углеводов и 1,5% белка.
3. Установлено, что ЭПС, продуцируемый *P. polymyxa* 88А в минеральной среде с сахарозой, является β -(2→6)-связанным гомополимером фруктозы (леваном).