

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Кафедра биохимии и биофизики

BACILLUS SUBTILIS EGP5QL12 КАК ПРОДУЦЕНТ ПОЛИ-
ГАММА-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Черных Марины Владимировны

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

Научный консультант:

доцент, канд. биол. наук



Ю.П. Федоненко

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Обитание бактерий в гиперсоленых средах привело к формированию у них высокого адаптационного потенциала. Одним из факторов, способствующих выживанию галофильных бактерий при неблагоприятных условиях, является синтез поли-гамма-глутаминовой кислоты (ПГК). ПГК связывает воду и катионы металлов, что делает ее продуцента перспективным объектом исследования для дальнейшего использования в биотехнологиях. Полимер уже нашел широкое применение в медицине, пищевой промышленности, биоремедиации – но для каждой области целесообразно применение ПГК с разными молекулярными массами и соотношениями энантиомеров. Таким образом, актуальными являются проблемы поиска продуцентов ПГК, оптимизация условий культивирования для максимизации выхода полимера с заданными характеристиками для наиболее эффективного применения в конкретной области.

В настоящей работе приводятся результаты исследования ПГК, продуцируемой штаммом *Bacillus subtilis* EGP5QL12, изолированным из образца соли озера Карун (Египет) и любезно предоставленным сотрудниками лаборатории биохимии ИБФРМ РАН.

Цель данной работы – охарактеризовать биотехнологический потенциал штамма *B. subtilis* EGP5QL12 как продуцента ПГК и определить параметры ПГК, наиболее значимые для дальнейшего использования полимера в биотехнологии. Для чего необходимо выполнить ряд **задач**:

- 1) изучить способность культуры *B. subtilis* EGP5QL12 к продукции ПГК;
- 2) охарактеризовать чистоту препарата и выход ПГК при культивировании продуцента на безглутаматной среде;
- 3) установить молекулярную массу, энантиомерный состав и вторичную структуру ПГК.

Научная новизна, научная значимость работы. Показана способность штамма *B. subtilis* EGP5QL12 к синтезу ПГК и исследованы физико-химические

свойства этого биополимера. Охарактеризована вторичная структура ПГК с применением двух взаимодополняющих методов.

Структура и объем работы. Бакалаврская работа состоит из введения, обзора литературы, разделов с изложением сведений о материалах и методологии исследования, результатах работы и с их обсуждением, заключения, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 52 страницах, содержит 11 таблиц и иллюстрирована 12 рисунками. В списке литературы представлены ссылки на 100 цитируемых работ.

Материалы и методы

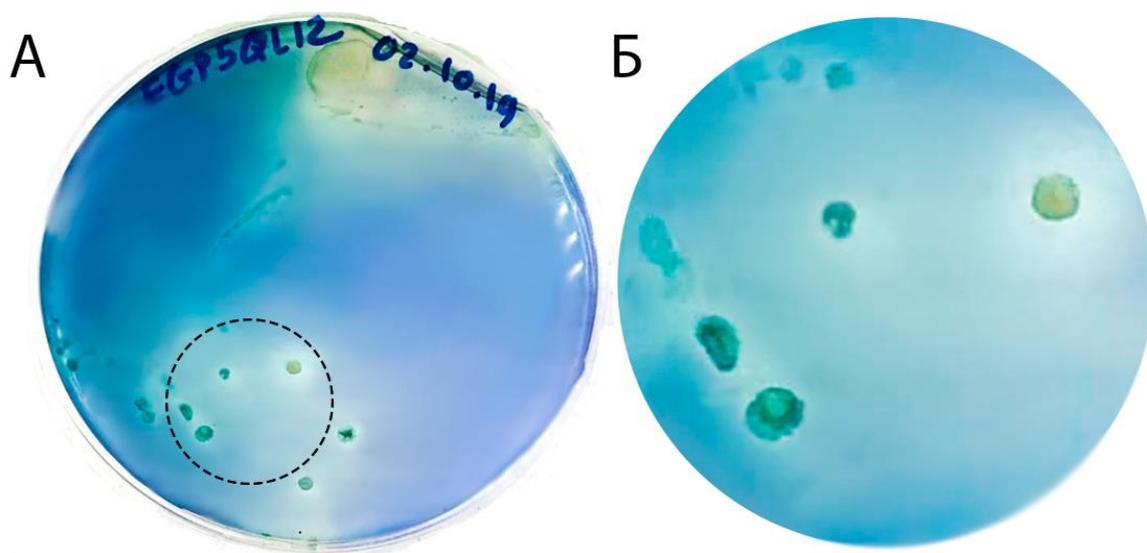
Культивирование бактерий для получения целевого продукта осуществлялось при оптимальных условиях для роста клеточной биомассы и накопления экстраклеточных полимеров (ЭКП) на среде S-G. После 48 часов культивирования клетки отделяли центрифугированием от культуральной жидкости, которую далее концентрировали, диализовали против дистиллированной воды, снова концентрировали, а затем проводили дробное осаждение трехкратными объемами холодного этанола. В результате были получены три фракции ЭКП.

Проводили высоко-эффективную жидкостную хроматографию и электрофорез трех фракций в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Кумасси бриллиантовым голубым R-250, толуидиновым синим, нитратом серебра после периодатного окисления для установления химической природы ЭКП. Методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса однозначно подтверждали структуру исследуемого полимера.

Методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) дериватизированных фенилизотиоционатом мономеров, полученных после полного кислотного гидролиза первой и второй фракции ЭКП, устанавливали энантиомерный состав ПГК. Вторичную структуру ПГК изучали методами спектроскопии КД и инфракрасного излучения (ИК) с использованием софта CDNN 2.1 (Германия) в первом случае и с анализом второй производной спектра во втором случае.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В результате скрининга продуцентов ЭКП на твердой питательной среде «liquid basal» был отобран штамм *B. subtilis* EGP5QL12 на основании образования вокруг колоний светлого ареола с диаметром до 12 мм, свидетельствующего об окислительно-восстановительной реакции между метиленовым синим в составе питательной среды и бактериальными экстраклеточными анионными соединениями, выступающими в качестве доноров электронов.



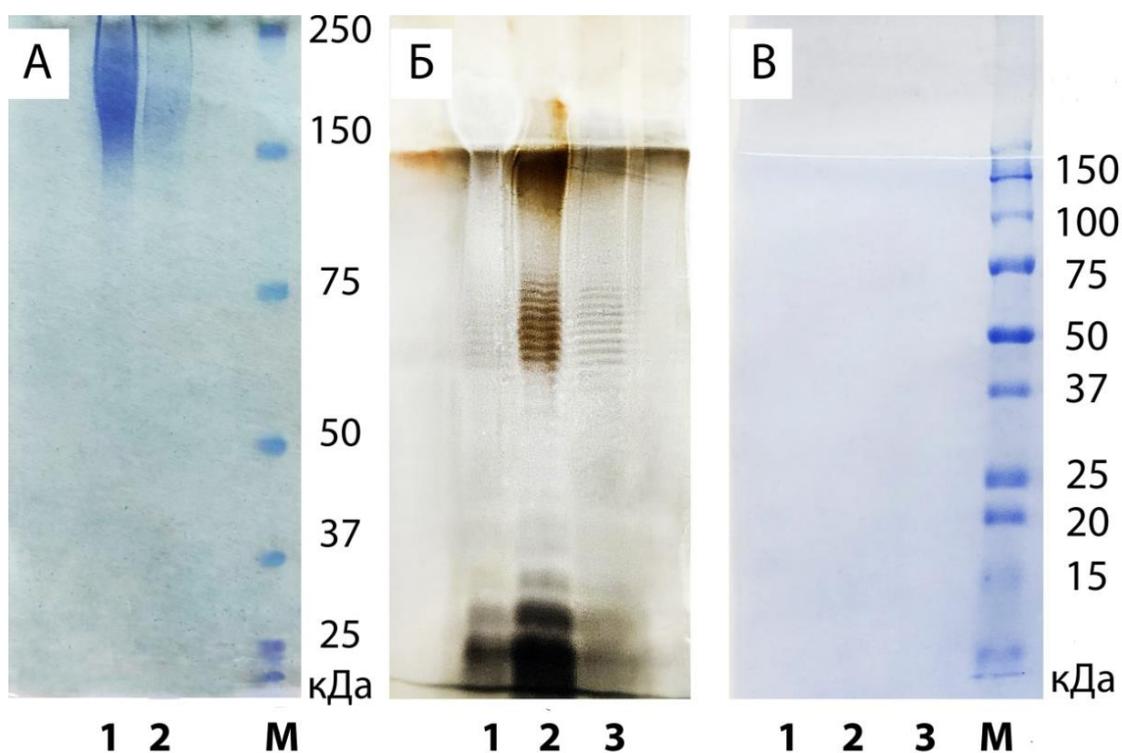
А – колонии на чашке Петри с метиленовым синим (масштаб 1:2), пунктиром обозначена область масштабирования;

Б – колонии с ареолом выделенной пунктиром области (масштаб 1:1).

Рисунок 6 – Колонии культуры *B.subtilis* EGP5QL12 на питательной среде «liquid basal»

Дифференцированное окрашивание полиакриламидного геля после электрофореза позволило охарактеризовать химическую природу препарата ЭКП. Окрашивание толуидиновым синим, в соответствии с рисунком 1А, позволило установить наличие в первых двух фракциях высокомолекулярных (100-250 кДа) полимеров с отрицательно заряженными функциональными группами. Более насыщенный цвет в первой фракции свидетельствует о

большей концентрации анионов, что соотносится с результатами окрашивания нитратом серебра. Окрашивание нитратом серебра выявило наличие углеводов, по большей части относительно низкомолекулярных, во всех трех фракциях (см. рисунок 1Б). В разделяющий гель не вошел полимер с молекулярной массой более 150 кДа. Отсутствие окрашивания Кумасси R-250 в зоне высоких молекулярных масс позволяет сделать заключение о небелковой природе высокомолекулярного анионного полимера (см. рисунок 1В).



1-3 – номера фракций;

М – стандарт молекулярных масс.

Рисунок 1 – Электрофорез фракций 1-3, визуализация окрашиванием толуидиновым синим (А), нитратом серебра (Б), и Кумасси R-250 (В)

Анализ первой преобладающей фракции методом обратно-фазовой ВЭЖХ выявил присутствие единственного типа аминокислоты – глутаминовой. Ее содержание составило $84,1 \pm 2,8$ г на 100 г массы образца.

Исходя из высокой доли глутаминовой кислоты в образце можно предположить наличие ПГК, связь мономеров которой осуществляется между

γ -карбоксылными и λ -аминогруппами, так как окрашивание Кумасси R-250 не выявило никаких высокомолекулярных белков.

На основе спектров ^1H и ^{13}C были определены химические сдвиги, характерные для различных ядер ПГК. В соответствии с результатами спектроскопии по методам Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) и Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) – корреляции ядер, сообщающихся посредством одной или через две-три связи соответственно – однозначно подтверждается структура исследуемого полимера. В образце содержится именно ПГК, а кроме того в меньшем количестве представлен полимер фруктозы – леван. Это следует учитывать при очистке препарата и оптимизации состава питательной среды.

По результатам анализа спектров КД установлено, что первая и вторая фракции не отличаются по соотношению оптических изомеров, поэтому сепарация волокон ПГК дробным осаждением не показала эффективности в условиях эксперимента. Доля D-глутаминовой кислоты составила 60%.

По спектрам КД негидролизированных образцов преобладающей фракции можно судить о значительном изменении вторичной структуры с изменением pH. С увеличением pH наблюдаются гиперхромный и батохромный сдвиги интенсивности меры кругового дихроизма, что свидетельствует об увеличении доли различных β -структур при уменьшении доли α -спиралей.

По результатам деконволюции спектров КД изменения доли той или иной структуры минимальны, что может быть объяснено особенностями алгоритмов обработки в программе CDNN 2.1, поскольку в ее базе данных представлены по большей части белки, состоящие из L-энантиомеров, а профили спектров ПГК, состоящие только из одного типа энантиомеров, противоположны. Еще одной проблемой обработки спектров является несовершенство алгоритмов: не может быть одной уникальной неупорядоченной полипептидной структуры, и, следовательно, может не быть одного уникального характерного паттерна КД. Также некоторые структуры могут быть распознаны некорректно, что зависит от полноценности используемой базы спектров. Несмотря на проблемы

интерпретации результатов спектроскопии, данный метод и программа используются в практике.

По результатам деконволюции второй производной ИК спектра в области амида I можно заключить, что наибольшую долю в ПГК составляют β -листы, в том числе межмолекулярные. Доля α -спиралей минимальна, как и нерегулярных структур. Вероятнее всего, нерегулярные структуры, доля которых достигает четверти от всех структур в условиях водного раствора, преобразуются в межмолекулярные листы.

Различия в результатах по методам ИК и КД спектроскопии отчасти объясняются еще использованием в первом случае твердого раствора. С насыщением водой концентрация ПГК понижается и до половины всех β -антипараллельных листов (агрегатов) преобразуются в нерегулярные структуры, а 2/5 – в β -антипараллельные листы и β -изгибы. Таким образом, порядка 65% структуры полимера способно к формированию стабильного гидрогеля, что отличает данного продуцента от широко используемого штамма *B. licheniformis* ATCC 9945A, для которого этот показатель не достигает и 50%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы был проведен анализ экстраклеточных полимеров нового штамма *Bacillus subtilis* EGP5QL12, выделенного из соленого озера Карун (Египет).

Наличие биохимической способности к синтезу ПГК без наличия ее мономеров в питательной среде значительно уменьшает себестоимость конечного продукта. Кроме того, в сравнении с литературными данными, представленная вторичная структура в большей степени способствует связыванию воды и катионов металлов, образованию гидрогелей. Полимер с такими характеристиками может быть использован в пищевой промышленности и косметологии. В частности, для криопротекции пробиотических бактерий и увлажняющих агентов [100].

В исследованиях по выделению ПГК чистота препарата в пределах 79-95%, что соотносится с результатами данной работы, хотя и ставит ограничение применения в медицинских целях. Стоит отметить, что экзополисахариды синтезируются в меньшем количестве при данных условиях культивирования, однако при оптимизации состава питательной среды стоит учитывать возможность повышения выхода не только целевого полимера – ПГК – но и экзополисахаридов. Хотя для применения в пищевой промышленности и в качестве биодобавки в еду и корма нецелесообразно повышать чистоту препарата, кроме того экзополисахариды могут дополнительно наделять продукт пищевой ценностью.

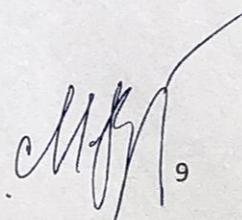
Учитывая отсутствие (или крайне малое использование) на российском рынке данного полимера и широкие возможности его применения, имеют смысл дальнейшая оптимизация условий культивирования по ряду факторов, повышение чистоты препарата. С изменением состава питательной среды можно ожидать изменений во вторичной структуре и степени полимерности ПГК, что будет определять и конкурентоспособность штамма. Необходимо создание модели, иллюстрирующей выход ПГК и экзополисахаридов при

разных условиях культивирования для прогнозирования и проверки наилучшей комбинации факторов.

Кроме того, необходимо обучение нейронных сетей для обработки спектров ИК и КД.

По результатам исследования сделаны следующие выводы:

1. Показано, что культура галофильного штамма *Bacillus subtilis* EGP5QL12 при выращивании на богатой питательной среде S-G продуцирует ПГК глутамат-независимым путем.
2. Дробное осаждение этанолом полимеров из культуральной жидкости позволяет увеличить выход ПГК. Итоговый выход в данных условиях культивирования составляет $5,6 \pm 0,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ при чистоте препарата $84,1 \pm 2,8\%$.
3. Соотношение D:L оптических изомеров составило 60:40. Молекулярная масса ПГК 75-250 кДа.
4. ПГК формирует преимущественно различные β -структуры при различных значениях pH. Наибольшая доля у β -антипараллельных листов при несколько меньшей доле нерегулярных структур и низкой доле α -спиралей.



9

Результаты работы представлены в следующих публикациях:

1. Черных, М. В. *Bacillus subtilis* EGP5QL12 как продуцент поли-гамма-глутаминовой кислоты // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020». Второе издание: переработанное и дополненное / Отв. ред. И.А. Алешковский. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2020. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. – 3000 экз. ISBN 978-5-317-06519-5
2. Черных, М. В. Оценка биотехнологической значимости *Bacillus subtilis* EGP5QL12 как продуцента поли-γ-глутаминовой кислоты // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021» / Отв. ред. И. А. Алешковский, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов, Е. И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2021. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. – 2000 экз. ISBN 978-5-317-06593-5 Режим доступа: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2021/data/21884/124116_uid483511_report.pdf
3. Черных М. В. Оценка способности штамма *Bacillus subtilis* EGP5QL12 к синтезу поли-гамма-глутаминовой кислоты / М. В. Черных [и др.] // Исследования молодых ученых в биологии и экологии – 2021: сборник научных статей. – Саратов: Амирит, 2021. – 165 с. ISBN 978-5-00140-757-7.