

МИНОБРНОУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждения
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
СУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»
Кафедра биохимии и биофизики

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ
BACILLUS SUBTILIS EG5QL12 ПО ВЫХОДУ
ПОЛИ-У-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

АВТОРЕФЕРАТ

Бакалаврской работы

Студентки 4 курса 421 группы

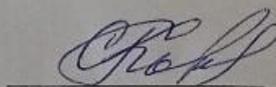
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Крячковой Надежды Вадимовны

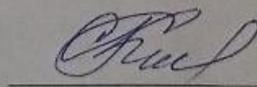
Научный руководитель:

д.б.н., профессор



С.А. Коннова

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор



С.А. Коннова

30.05.2022

Саратов 2022

Введение. В современном мире огромное количество биополимеров, производимых микроорганизмами, играют очень важную роль в повседневной жизни. В основном они находят свое применение в пищевой, медицинской, и фармацевтической промышленности.

Поли- γ -глутаминовая кислота (γ -ПГК) представляет собой природный биоразлагаемый, водорастворимый нетоксичный биополимер глутаминовой кислоты, в которой амидные связи образованы между γ -карбоксильной группой и α -аминогруппой. Существует несколько способов получения γ -ПГК: химический синтез, пептидный синтез, биотрансформация и микробиологическая ферментация. Использование последнего способа, по сравнению с другими, отличается простотой и более экономически эффективным методом. Внеклеточное производство путем культивирования продуцентов в среде, способствует получению биополимера в больших количествах без этапов химической модификации. Такое микробиологическое получение в основном происходит благодаря видам-продуцентам рода *Bacillus*, а также некоторым археям и эукариотам.

γ -ПГК обладает широким биотехнологическим потенциалом, безопасно используется в пищевой промышленности, медицине, косметологии, биоремедиации, сельском хозяйстве и прочих отраслях, однако стоимость его масштабного производства довольно высока, что негативно влияет на рыночную цену и конкурентоспособность полимера. Для решения данной проблемы выполняются исследования по оптимизации условий культивирования продуцентов для снижения себестоимости производства и увеличения выхода ПГК при сохранении уникальных ценных свойств полимера.

Объект исследования – γ -ПГК граммотрицательных галотолерантных бактерий *Bacillus subtilis* EG5QL12, выделенных из соленого озера Карун, Египет и любезно предоставленными Коллекцией ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и

микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН) (<http://collection.ibppm.ru>).

Цель работы: выявить оптимальные условия культивирования галотолерантных бактерий *Bacillus subtilis* EG5QL12 по выходу и свойствам γ -ПГК.

Для реализации цели исследования были сформулированы следующие задачи:

1. Выделить анионный экзополимер, продуцируемый галотолерантными бактериями *B. subtilis* EG5QL12 при росте в выбранных экспериментальных средах.

2. Исследовать влияние состава среды на молекулярную массу, мономерный состав, наличие примесей углеводов, а также соотношение элементов вторичной структуры в полученных препаратах γ -ПГК.

3. Выявить оптимальный состав среды для увеличения продукции γ -ПГК.

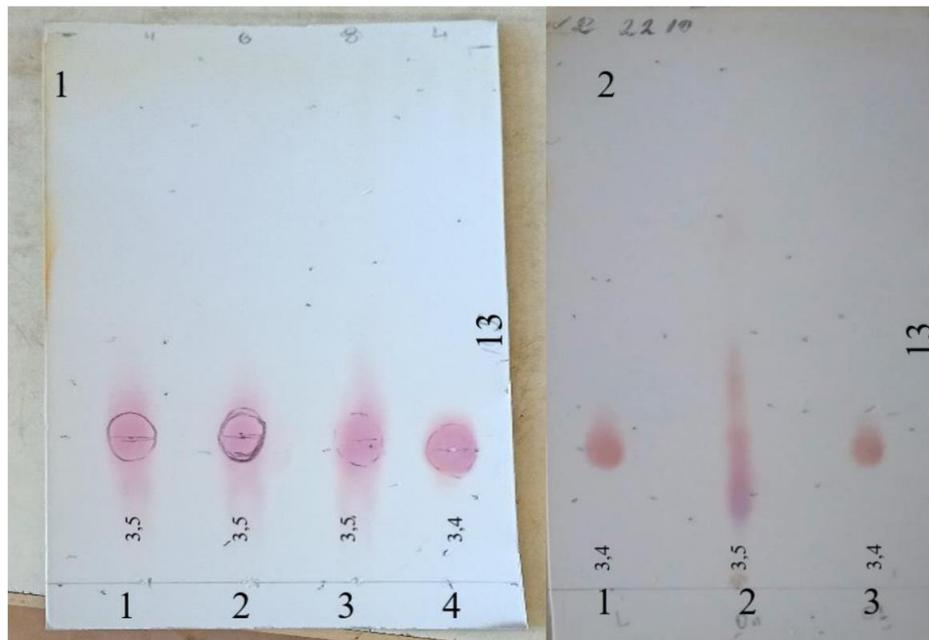
Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 50 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: физико-химические свойства поли- γ -глутаминовой кислоты, биопродукция полимера, *Bacillus subtilis* как продуцента γ -ПГК, методы получения и биотехнологический потенциал бактерий этого вида.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

На первом этапе исследования продукции γ -ПГК бактериями *B. subtilis* EG5QL12 было проведено их выращивание на заранее выбранной среде Е, затем проводили выделение и очистку γ -ПГК из культуральной жидкости по схеме на рисунке 1.

Учитывая, что γ -ПГК выделяли осаждением охлаждённым спиртом, который может осаждать другие биополимеры, были выполнены анализы, для проверки чистоты полученного продукта. Для характеристики выделенного полимера его подвергали кислотному гидролизу 2М

трифторуксусной кислотой. разделение продуктов деградации и стереоизомеров глутаминовой кислоты проводили с помощью ТСХ с последующим нингидриновым окрашиванием. Результаты ТСХ приведены на рисунке 2.



Пластинка 1: 1, 2, 3 – образец в разной концентрации, 4 – стандартный раствор L-глутаминовой кислоты; Пластинка 2: 1 - стандартный раствор L-глутаминовой кислоты, 2 – образец, 3 – стандартный образец D-глутаминовой кислоты

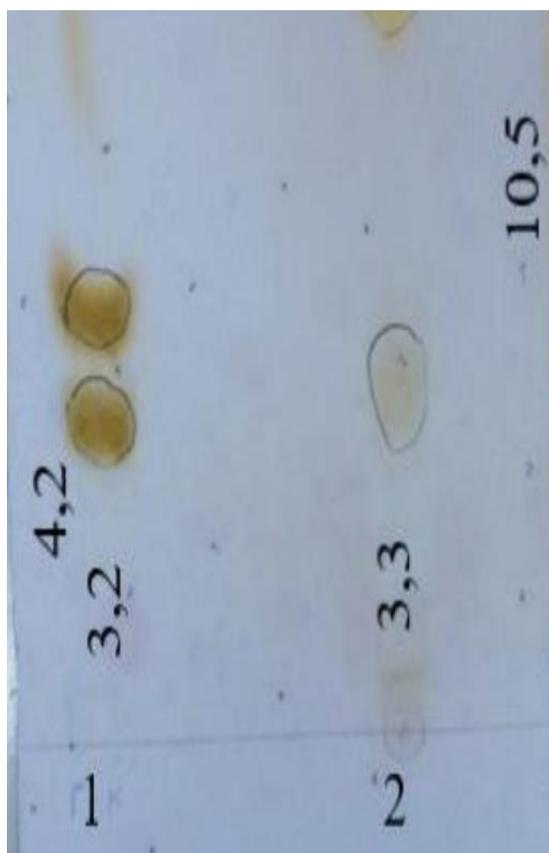
Рисунок 2 – Определение аминокислотного состава γ -ПГК методом ТСХ

Для анализа были использованы пластинки силуфола «Silufol», на которых проводили линию старта примерно 1,5 см от края пластинки. На линию старта с помощью капилляра наносили по две капли L- и D-глутаминовой кислоты – стандартные растворы (10 мг/мл) и несколько капель образца, полученного после гидролиза полимера.

Анализы показали, что по Rf не выявлено различий между D или L-изомерами глутаминовой кислоты при разгонке стандартных растворов аминокислот (рисунок 2 (2)). Данные, полученные в результате хроматографического разделения гидролизованного полимера, позволяют

сделать вывод, что в составе исследованного препарата содержится только глутаминовая кислота.

При проявлении аналогичной хроматограммы реактивом на углеводы выявлено присутствие в гидролизате небольшого количества углеводного компонента. Для подтверждения предположения о наличии веществ углеводной природы проводили ТСХ со стандартными образцами некоторых сахаров с последующим окрашиванием раствором фталата анизидина в бутаноле, результат приведен на рисунке 3.



1 – раствор сахаров ксилозы и глюкозы, 2 – исследуемый образец

Рисунок 3 – Определение состава сахаров в гидролизате анионного полимера, продуцируемого *B. subtilis* EG5QL12

Rf образца составил 0,3. Нанесенные стандарты глюкозы и ксилозы имели Rf 0,3 и 0,4 соответственно. По полученным в ходе исследования результатам можно заключить, что в составе анализируемого полимера имеются углеводные компоненты, в частности глюкоза.

Чтобы количественно характеризовать примесь углеводов в полученных биополимерах проводили колориметрический анализ методом Дюбуа – реакции с фенолом и серной кислотой. Исследование показали, что содержание углеводов в биополимере не превышало $2,3 \pm 0,1$ %, что позволяет говорить о достаточно высокой гомогенности препарата, полученного по схеме на рисунке 1.

Дальнейшие эксперименты проводили на модифицированных по основным параметрам средах Е, с целью выявления наиболее значимых для продукции γ -ППК. Для этого в средах варьировали соотношения цитрата и глицерина как источников углерода, а также содержание источника азота и концентрации хлорида натрия. Используемые варианты среды приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Различные варианты среды Е, используемые для выращивания бактерий *B. subtilis* EG5QL12

№ среды	Количество компонентов среды			
	Глицерин, мл	Цитрат, г	Хлорид аммония, г	Хлорид натрия, г
1	9,6	1,8	1	5
2	9,6	1,8	0,5	5
3	9,6	0,6	1	10
4	3,2	1,8	0,5	10
5	9,6	0,6	0,5	10
6	3,2	0,6	1	5
7	3,2	1,8	1	10
8	3,2	0,6	0,5	5
9	10,2	1,2	0,8	7,5
10	11,7	1,2	0,8	7,5
11	6,4	0,2	0,8	7,5
12	6,4	2,2	0,8	7,5
13	6,4	1,2	0,3	7,5
14	6,4	1,2	1,1	7,5
15	6,4	1,2	0,8	3,3
16	6,4	1,2	0,8	11,7
17	6,4	1,2	0,8	7,5
18	6,4	1,2	0,8	7,5

Для каждого варианта среды было произведено выращивание микроорганизмов *B. subtilis* EG5QL12 и выделение из культуральной жидкости препаратов γ -ПГК этанолом, и дальнейшей обработки по схеме (см. выше). Препараты далее были охарактеризованы по содержанию примесей углеводов по методу Дюбуа. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Содержание углеводов в выделенных γ -ПГК

№ образца	Доля содержания углеводов, %
1	*
2	**
3	4,7±0,2
4	4,0±0,2
5	3,1±0,2
6	2,1±0,1
7	2,4±0,1
8	**
9	**
10	2,3±0,1
11	7,2±0,4
12	*
13	*
14	7,0±0,3
15	7,3±0,4
16	2,7±0,1
17	**
18	3,7±0,2

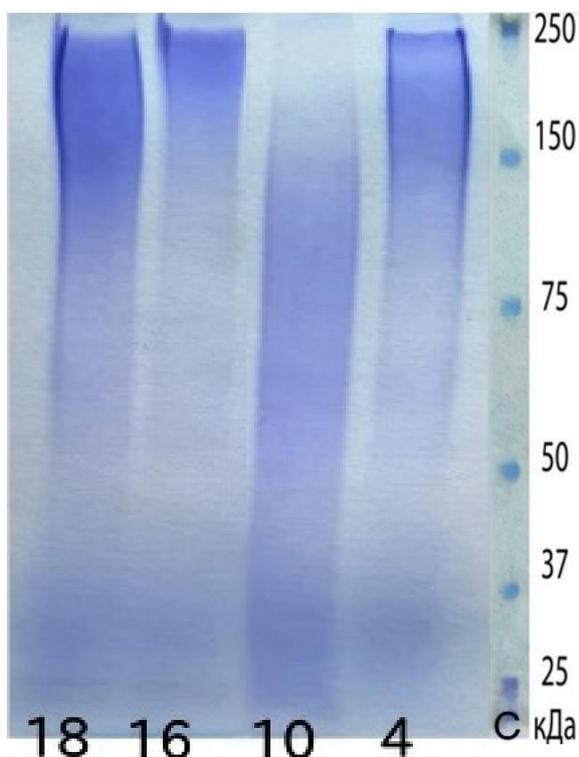
Примечания:

- 1) * - следовые количества углеводов, менее 2%;
- 2) ** - высокие концентрации углеводов больше 7,5%;
- 3) доверительный интервал приведен для надежности 95%.

По полученным данным видно, что в образцах ПГК № 1, 12 и 13 было выявлено следовое количество сахаров, что говорит о высокой чистоте

выделенных препаратов. В образце 9 выявлена большая концентрация углеводов. В целом содержание углеводов не превышает 7%.

Для определения молекулярной массы был применен метод неступенчатого электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием метиленовым синим. Для анализа было выбрано четыре образца, содержание углеводов в которых было невысоким и выход биополимера позволил произвести анализы полученных препаратов методом электрофореза. Результат электрофоретического анализа представлен на рисунке 3.



С- стандарт молекулярных масс;

Рисунок 4 – Результат неступенчатого электрофореза γ -ПГК со сред 18, 16, 10 и 4

Анализ выявил слабую гетерогенность исследуемых полиамидов по молекулярной массе. Так в образце 16 кажущая масса составляет примерно 250 кДа, в дорожках с препаратами 18 и 4 масса находится в пределах 150 кДа и выше, тогда как в образце №10 она составила менее 150 кДа.

. Для этого проводили построение усредненных спектров из трех повторностей анализа (рисунок 5). Наиболее информативной была область амида 1 1720-1580 см^{-1} .

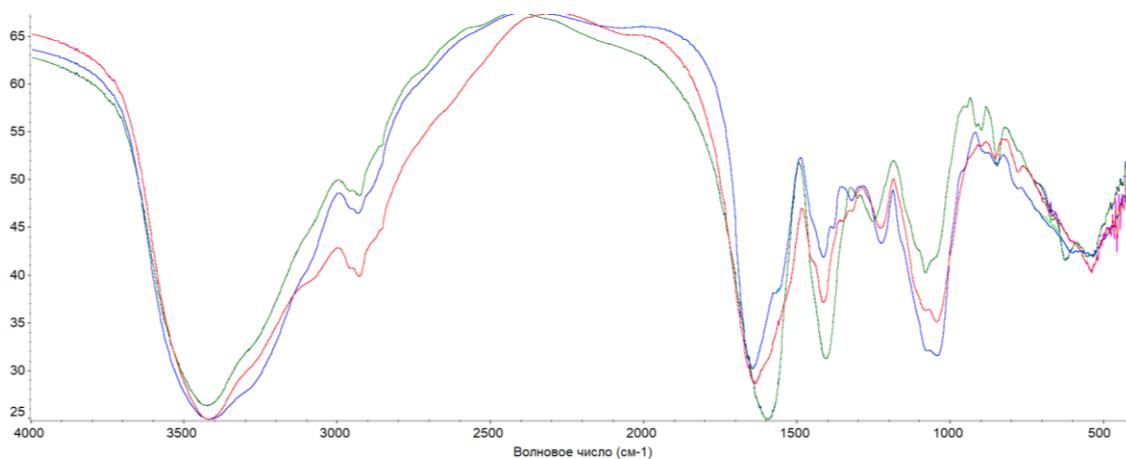


Рисунок 7 – Инфракрасные спектры препарата γ -ПГК со среды 5 в трех повторностях

Доли вторичных структур были рассчитаны по формуле 2 и представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Доли вторичных структур γ -ПГК.

№ среды	Антипараллельные β -листы	Параллельные β -лист	α -спираль	Нерегулярная структура	β -повороты
1	4,5	39,3	25,2	17	14
2	4,4	39,6	25,4	18	12,6
3	4,1	39,6	25,1	18,3	12,9
1	2	3	4	5	6
4	22,9	38	21,9	9,2	8,1
5	13,4	43,7	20,5	12,1	10,3
6	7,9	37,4	24,6	12,4	17,7
7	20	39,2	19,1	9,2	12,6
8	13,8	47	18	11,1	10,1
9	6,5	37,3	25,7	13,4	17,1
10	16,6	40,2	18,2	10,5	14,5
11	11,7	44	18,2	10	16
12	23,4	37,5	22	9,3	7,8
13	12,6	45,1	18,3	10,3	13,6
14	27,3	32,7	24,6	8,5	6,9
15	11,4	41,8	20,9	11	14,9
16	20,6	38,9	20	9,4	11,2
17	14,3	38,3	21,5	11,6	14,3
18	16,8	43,9	17,8	11,1	10,3

По результатам проведенного анализа видно, что во всех исследуемых препаратах наибольшую долю составляют параллельные β -листы, содержание которых варьировало в диапазоне от 32,7 до 47%. В меньших количествах были выявлены α -спирали и антипараллельные β -листы, их содержание не превышало 25-27%. В тоже время доля нерегулярных структур и β -поворотов ниже, относительно остальных представленных структур.

Взаимосвязь между компонентами используемой среды и элементами вторичных структур не является статистически значимой, что говорит об отсутствии какого-либо влияния среды на вторичную структуру. Однако не следует исключать условия культивирования, так как используемый pH в области 6,5-7 формирует случайный клубок.

После проведенных этапов выделения, отчистки и анализа гравиметрическим методом исследовали выход полиамида на массу бактерий. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Расчет выхода биополимера

№ среды	Масса полимера, г	Выход, %	Бактериальная масса, г
1	0,08	2,5	3,08
2	0,26	8,93	2,95
3	0,13	6,59	2,01
4	0,20	16,4	1,19
5	0,08	10,57	0,76
6	0,10	3,16	3,08
7	0,46	28,19	1,62
8	0,06	12,42	0,45
10	0,17	15,24	1,12
11	0,06	1,75	3,20
12	0,33	10,69	3,10
13	0,08	4,42	1,81
14	0,31	22,09	1,60
15	0,09	4,62	2,00
16	0,30	37,41	0,81
17	0,17	8,68	1,95
18	0,09	5,68	1,60

Исходя из полученных результатов оптимальными оказались среды № 16, 14, 10, 7, 4, в них доля анионного полимера составляла более 15%, в то время как самый низкий выход наблюдали в средах №1, 6, 11, 13, 15, 18, доля полимера составляла 5% и менее. В оставшихся средах выход колебался от 5 до 15%. Соотношение компонентов в среде 16, судя по полученным данным, является оптимальным для получения γ -ППК. Для выявления совместного влияния компонентов среды на выход γ -ППК был проведен линейный многофакторный регрессионный анализ, с использованием в качестве отклика выход. По результатам анализа видно, что статистически значимое влияние на биопродукцию оказывает глицерин, цитрат и хлорид натрия, уравнение регрессии имеет следующий вид:

$$y = -0,149 - 0,021A + 0,163B + 0,036C$$

где y – зависимая переменная, выход; A – глицерин, мл; B – цитрат, г; C – NaCl, г.

Коэффициент детерминации составляет 0,76, что указывает на пригодность данной модели, таким образом модель может объяснить 76% вариаций отклика, что говорит о большом влиянии этих веществ на выход.

Влияние хлорида натрия можно объяснить способностью бактерий *B. subtilis* EG5QL12 продуцировать экзогенные полимеры для защиты от повышенных концентраций соли в среде. Подобный эффект скорее всего, вызван приостановкой роста, и активации процессов мобилизации энергии и пластических веществ на синтез γ -ППК для защиты от стрессовых факторов среды. Таким образом, предполагается прямая зависимость между концентрацией NaCl и выходом полиамида.

Влияние глицерина и цитрата объясняется их ценностью в качестве промежуточных метаболитов, а также источников энергии, необходимой для жизнедеятельности. Так цитрат является непосредственным участником цикла трикарбоновых кислот, за счет которого происходит синтез биополимера и энергия, тогда как глицерин являясь простым источником

углерода, он быстро окисляется до пирувата и включается в глюконеогенез, а также участвует в процессах анаболизма жирных кислот и фосфолипидов, которые являются основными структурными компонентами плазматических мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам качественного анализа было установлено, что выделенные препараты биополимеров состоят из остатков глутаминовой кислоты. Последующий анализ методом Дюбуа показал присутствие незначительного количества углеводов, на долю которых приходилось не более 7%. Электрофоретическое исследование показало слабую гетерогенность изученных препаратов γ -ПГК, их молекулярная масса достигала 150-250 кДа. Структурный анализ методом ИК-Фурье спектроскопии показал преобладание в их вторичной структуре параллельных β -листов.

Результаты, полученные в ходе анализа влияния компонентов сред, позволяют рассчитать необходимый количественный состав среды для получения наибольшего выхода γ -ПГК с помощью галотолерантных бактерий *B. subtilis* EG5QL12. При этом важными факторами будут являться содержание NaCl, так как его присутствие положительно влияет на увеличение синтеза и молекулярную массу биополимера, а также глицерина и цитрата, которые необходимы для непосредственного обеспечения роста и жизнедеятельности микроорганизмов.

На основании проведенного исследования можно подвести следующие выводы:

- 1) Показано, что галотолерантный микроорганизм *B. subtilis* EG5QL12 при выращивании во всех исследованных средах с цитратом и глицерином в качестве источника углерода и хлоридом аммония в качестве источника азота продуцирует экзогенные полимеры, состоящие из остатков глутаминовой кислоты.

2) Было подтверждено, что выделенный биополимером, состоит из остатков только глутаминовой кислоты и содержит небольшие примеси углеводов, состоящих из глюкозы. Молекулярная масса полимеров варьирует в пределах 250 и ниже. Вторичная структура γ -ПГК в основном представлен параллельными β -слоями.

3) Оптимальным вариантом среды для увеличения продукции γ -ПГК, из рассмотренных нами, является среда №16, содержащая повышенные концентрации глицерина и соли в своем составе. По результатам исследования показано, что концентрация источника азота не влияет на выход биополимера.

