

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

Кафедра биохимии и биофизики

СОСТАВ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ
SALINIVIBRIO SP. EG9S8QL и *SALINIVIBRIO* *COSTICOLA* EG6S8QL

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Шевченко Константина Сергеевича

Научный руководитель:
зав. кафедрой биохимии и биофизики,
профессор, док. биол. наук


30.05.2022 С. А. Коннова

Научный консультант:
с.н.с. ИБФРМ РАН, канд.биол.наук


30.05.2022 Е. Н. Сигида

Заведующий кафедрой:
профессор, док. биол. наук


30.05.2022 С. А. Коннова

Саратов 2022

Введение. Грамотрицательные бактерии рода *Salinivibrio* имеют высокий потенциал для применения в биотехнологии в качестве продуцентов различных ферментов. Данные микроорганизмы способны обитать в широком диапазоне температур (5-50 °C) и pH (5-10), в средах, содержащих от 1 до 20% соли. Важную роль в приспособленности данных бактерий к широкому диапазону значений факторов окружающей среды играет клеточная мембрана, преобладающим компонентом которой у грамотрицательных бактерий является липополисахарид (ЛПС). ЛПС – амфифильная молекула с гидрофобным доменом – липидом А, соединенным ковалентной связью с полярным доменом – коровым олигосахаридом и О-специфическим полисахаридом (ОПС).

ЛПС является жизненно важной структурой для бактерий, выполняя строительную, контактную и барьерную функции, защищая бактериальную клетку от неблагоприятных факторов окружающей среды. Помимо этого, ЛПС являются бактериальными эндотоксинами, проявляющими токсические свойства и способными вызывать иммунный ответ в макроорганизмах. Физико-химические свойства ЛПС определяются их составом и структурой. В виду амфифильной природы ЛПС способны образовывать супрамолекулярные комплексы в воде, что оказывает существенное влияние на их биодоступность и свойства при взаимодействии с макропартнером. В связи с этим, изучение строения гликополимеров поверхности бактерий и их поведения в водных растворах является актуальной задачей.

В исследовании агрегационной способности ЛПС могут быть полезны методы динамического и электрофоретического рассеяния света (ДРС и ЭРС, соответственно). Так, метод ДРС может быть использован для определения размера супрамолекулярных комплексов ЛПС, формируемых ими в водных растворах, а при помощи ЭРС возможно установление абсолютной величины ζ -потенциала, характеризующего их стабильность. Также для понимания поведения молекул в растворах полезными могут быть и знания о их конформационном поведении, для характеристики которого часто используется спектроскопия кругового дихроизма (КД).

Объект исследования – ЛПС галофильных бактерий *Salinivibrio* sp. EG9S8QL и *Salinivibrio costicola* EG6S8QL, выделенных из образцов соли озера Карун (Египет) и охарактеризованные в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН.

Цель работы: характеристика состава и некоторых физико-химических свойств ЛПС штаммов галофильных бактерий *Salinivibrio costicola* EG6S8QL и *Salinivibrio* sp. EG9S8QL.

Для реализации цели исследования были поставлены и решались следующие задачи:

- 1) Вырастить бактериальные культуры и выделить препараты ЛПС.
- 2) Определить химический состав ЛПС, макромолекулярную организацию, его моносахаридный состав и профиль жирных кислот липида А.
- 3) С применением метода ДРС охарактеризовать агрегационные свойства ЛПС, изучить влияние на них катионов различной валентности и детергентов.
- 4) С применением спектроскопии КД изучить конформационные свойства ЛПС, изучить влияние на них катионов различной валентности.

Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 76 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: экология и многообразие галофильных и галотолерантных микроорганизмов; общая характеристика строения мембраны грамотрицательных бактерий; состав и структура липополисахаридов, а также их свойства; ζ -потенциал и его применение; спектроскопия кругового дихроизма в исследовании конформационных особенностей биополимеров.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Было произведено непосредственное выделение препаратов ЛПС из клеточной стенки исследуемых штаммов. Для этого проводилось культивирование бактерий на модифицированной питательной среде LB (Luria-Bertani), содержащей в конечном объеме (1 л) следующие компоненты: триптон (10 г), дрожжевой экстракт (5 г), NaCl (50 г), сахароза (20 г), pH 7. После

культивирования бактериальную массу отделяли центрифугированием, высушивали ацетоном и проводили экстракцию ЛПС горячим 45% водным фенолом, полученный экстракт очищали от примесей фенола, белков и фосфолипидов.

После проводили биополимерный анализ полученных препаратов с помощью колориметрических методов (Таблица 1). ЛПС_{EG6S8QL} и ЛПС_{EG9S8QL} содержали характерные для гликополимеров компоненты, а именно углеводы (10 и 7%) и 2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту (КДО) (0,2 и 0,5%), помимо этого в их составе было установлено содержание фосфора, а также незначительных примесей белков.

Таблица 1 – Биополимерный состав ЛПС исследуемых штаммов *Salinivibrio*

Штамм	Выход, %	Содержание, %			
		Углеводы	Белки	КДО	Фосфор
EG6S8QL	2,26	10 ± 1	2,2 ± 0,1	0,2	3,7±0,1
EG9S8QL	2,65	7 ± 1	3,7 ± 0,1	0,5	1

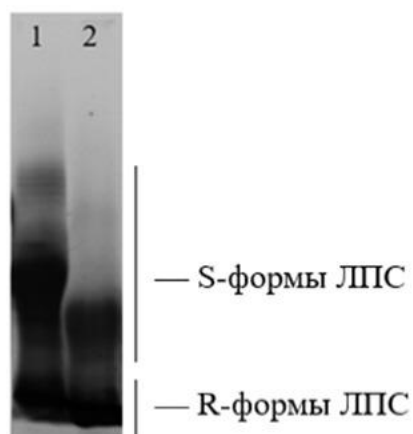
Определение моносахаридного состава исследуемых гликополимеров осуществляли с помощью газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ). Для этого исследуемые ЛПС гидролизовали, путем ацетилирования переводили в ацетаты полиолов, а также путем метилирования с последующим ацетилированием переводили в ацетилированные метилгликозиды. Полученные производные идентифицировали методом ГЖХ, с использованием в качестве стандартов образцы ацетилированных метилгликозидов и ацетатов полиолов, полученных из эталонных моносахаридов (Supelco, США). Исследование показало присутствие в ЛПС_{EG6S8QL} N-ацетилглюкозамина, глюкозы, галактуроновой и глюкуроновой кислот, на долю которых приходилось 41, 29, 19 и 11 %, соответственно. В ЛПС_{EG9S8QL} преобладали рамноза и N-ацетилглюкозамин (39 и 37%), также выявлена глюкоза (13%), и в незначительных количествах (менее 5% от суммы всех идентифицированных моносахаридов) обнаружены фукоза, манноза, глюкуроновая и галактуроновая кислоты.

Исследование профиля жирных кислот (ЖК) липида А, исследуемых гликополимеров проводили также с помощью ГЖХ. Для это ЛПС подвергали О-дезацелированию для перевода его О-дезацелированную форму. ЖК в составе липида А модифицированного и нативного гликополимеров обработкой 1 М HCl в метаноле переводили в форму метиловых эфиров ЖК (МЭЖК). Полученные производные идентифицировали с помощью ГЖХ по времени удерживания, в качестве эталонного образца использовали смесь МЭЖК бактериального происхождения (Sigma Aldrich, США).

Исследование показало наличие насыщенных и ненасыщенных алкановых и гидроксиалкановых кислот с длиной цепи от C₁₂ до C₁₈. Основными по содержанию в ЛПС_{EG6S8QL} были 3-гидроксидедекановая (3-ОН-C_{12:0}), тетрадекановая (C_{14:0}), 3-гидрокситетрадекановая (3-ОН-C_{14:0}), гексадекановая (C_{16:0}) и октадеценная (C_{18:1}) кислоты, на их сумму приходилось более 85% от суммы площадей идентифицированных пиков. Помимо этого, в нем в минорных количествах (2-6%) были выявлены додекановая (C_{12:0}), гексадеценная (C_{16:1}) и октадекановая (C_{18:0}) кислоты. В тоже время жирнокислотный состав ЛПС_{EG9S8QL} отличался отсутствием непредельных алкановых кислот и преобладанием 3-гидроксикислот, содержание которых составляло более 65% от суммы идентифицированных МЭЖК. Сравнение содержания ЖК до и после О-дезацелирования, показало, что О-связанные ЖК представлены 3-гидроксидедекановой кислотой, что видно по снижению их содержания по отношению к другим кислотам, в то время как амидосвязанные ЖК представлены 3-гидрокситетрадекановой кислотой, так как ее содержание после О-дезацелирования увеличилось.

С помощью электрофоретического анализа в полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием азотнокислым серебром устанавливали макромолекулярную организацию ЛПС. Анализ выявил гетерогенность исследуемых ЛПС по молекулярной массе. Так в нижней части электрофореграммы превалировали R-ЛПС, лишенные ОПС, и преобладающая часть S-ЛПС, что свидетельствовало о невысокой молекулярной массе

полисахаридной части в составе ЛПС (Рисунок 1). В середине электрофореграммы присутствовало незначительное количество S-ЛПС с кажущейся молекулярной массой ~30-40 кДа для ЛПС_{EG9S8QL} и ~25 кДа для ЛПС_{EG6S8QL}.



1 – ЛПС_{EG9S8QL}, 2 – ЛПС_{EG6S8QL}

Рисунок 1 – Результат ПААГ электрофореза

При помощи флуориметрической спектроскопии с использованием в качестве флуорохрома N-фенил-1-нафтиламина была установлена критическая концентрация агрегатообразования (ККА). Для ЛПС_{EG6S8QL} и ЛПС_{EG9S8QL} ККА составила 3,6 и 17,8 мкг/мл, соответственно. Результаты экспериментов позволили установить отрицательная зависимость ККА от их молекулярной массы.

Изучение влияния температуры и концентрации гликополимера на процесс их агрегации проводили на основе размера супрамолекулярных комплексов, определяемом с помощью метода ДРС. В результате анализа данных полученных методом ДРС ЛПС в различных условиях нами выявлялось мономодальное либо бимодальное распределение супрамолекулярных комплексов гликополимеров по их размеру. Так, комплексы, зафиксированные в первом случае, далее в работе будут называться агрегатами, в то время как во

втором случае комплексы меньшего размера будут называться агрегатами, а более крупные – кластерами.

Между концентрацией ЛПС обоих штаммов и размером, формируемых ими агрегатов и кластеров при фиксированном значении температуры выявлена отрицательная зависимость.

Касательно влияния температуры на размер агрегатов гликополимеров при их фиксированной концентрации, как правило, наблюдалась параболическая зависимость с максимальным размером агрегатов у обоих гликополимеров при 20°C.

Исследование влияния одно- и двухвалентных катионов, а также детергентов на агрегацию гликополимеров на основе размера супрамолекулярных комплексов и величине ζ -потенциала, определяемых методами ДРС и ЭРС, соответственно. Установлено, что катионы независимо от своей валентности усиливали агрегацию ЛПС, о чем говорит увеличение размера или доли рассеяния кластеров при их наличии, либо возрастание величины агрегатов при отсутствии кластеров. В пользу ростостимулирующего эффекта катионов также свидетельствует тенденция к повышению величины ζ -потенциала ЛПС с ростом концентрации Na^+ или Ca^{2+} , указывающая на понижение стабильности растворов гликополимеров, следствием чего является усиление самоассоциации молекул. Детергенты, в частности додецилсульфат натрия (ДСН), оказывали дезагрегирующее действие, вызывая снижение размера агрегатов и исчезновение кластеров при их наличии. В пользу дезагрегирующего действия также свидетельствует обратная зависимость величины ζ -потенциала от концентрации ДСН, указывающая на повышение стабильности растворов ЛПС, обусловленное ослаблением агрегации молекул с ростом содержания детергента.

Исследование конформационного поведения ЛПС проводили с помощью КД-спектроскопии, так типичные спектры КД, полученные для обоих гликополимеров при 4°C представлены на рисунке 2. Оба исследуемых

препарата ЛПС демонстрировали отрицательный пик на интервале длин волн 207-212 нм, характерный для ацетамидной группы N-ацетилглюкозамина.

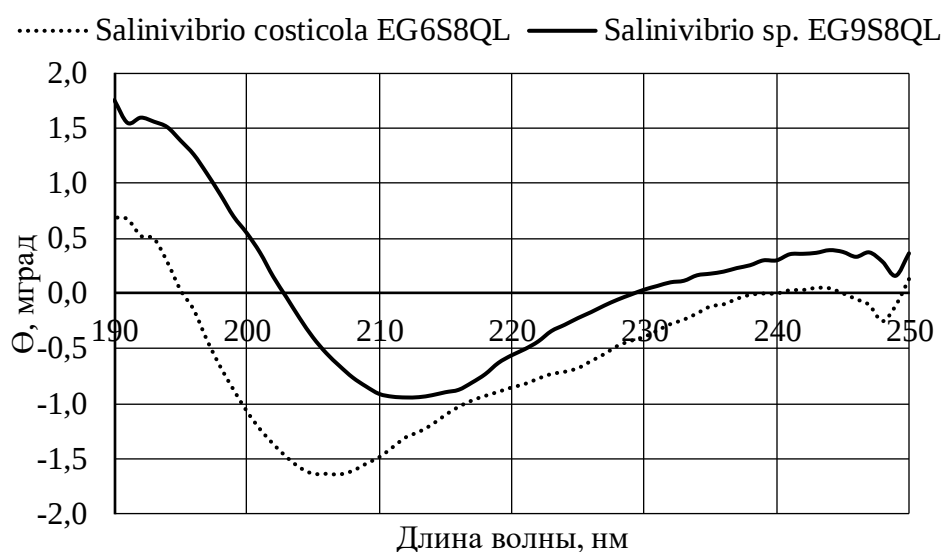


Рисунок 2 – Спектры КД растворов, исследуемых ЛПС с концентрацией 250 мкг/мл при 4°C

Для характеристики влияния температуры на конформацию полисахаридных цепей ЛПС определяли значения коэффициента молярной эллиптичности при 4, 20 и 37 °C и строили соответствующий график зависимости (Рисунок 3). Из литературных данных известно, что при низких температурах полисахаридные цепи склонны к образованию спиральных структур. Таким образом, что при 4 и 20°C полисахариды в исследуемых гликополимерах преимущественно находились в α -спиральной конформации, а уменьшение коэффициента молярной эллиптичности при 20°C относительно 4°C говорит о повышении упорядоченности α -спиралей с ростом температуры. Резкий рост величины коэффициента при 37°C по сравнению с 20°C свидетельствует о наличии конформационного перехода α -спираль $\rightarrow$ случайная катушка в интервале температур 20-37°C, на основе чего можно предположить, что при 37°C для полисахаридных цепей ЛПС преобладала конформация случайной катушки. В тоже время в присутствии катионов различной

валентности при 37°C отмечался резкий рост коэффициента молярной эллиптичности по сравнению с контрольным образцом, указывающее на ион-опосредованный конформационный переход случайная катушка → α -спираль.

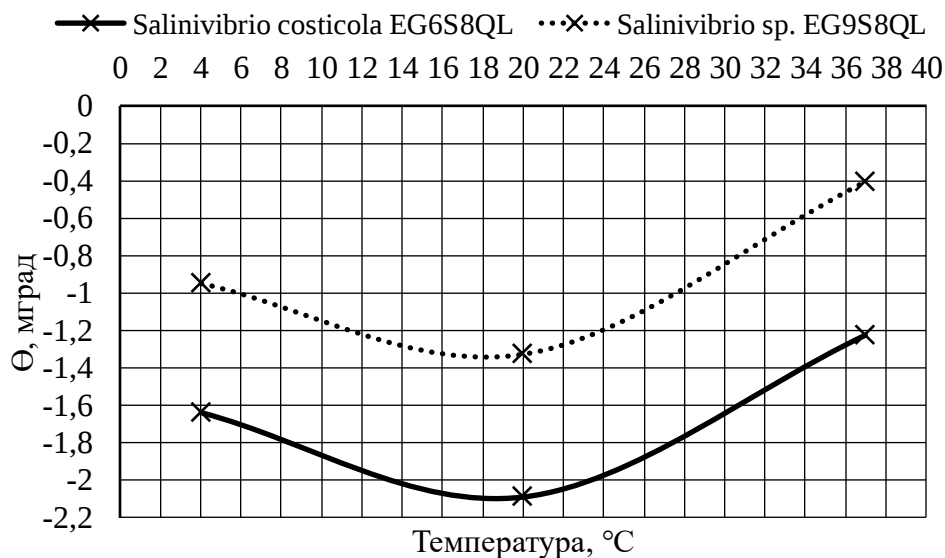


Рисунок 3 – Зависимость коэффициента молярной эллиптичности от температуры

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании сравнительных исследований химического состава ЛПС двух ранее не изученных штаммов бактерий – представителей рода *Salinivibrio*, выявлена консервативность структуры их липидов А, что согласуется с данными литературы по представителям других видов этого рода. Однако показаны различия в моносахаридном составе, соотношении образующих их молекулярных форм ЛПС, которые, возможно, являются следствием реализации их адаптации к различным условиям засоленности и свидетельствуют об участии гликополимеров поверхности бактерий в этом процессе.

На основании сравнительного исследования агрегационных свойств у ЛПС_{EG6S8QL} показана более сильная склонность к агрегации по сравнению с ЛПС_{EG9S8QL}, о чем свидетельствует более низкое значение ККА, а также более выраженная температурно-концентрационная зависимость размера

супрамолекулярных комплексов у первого гликополимера. В отношении катионов металлов независимо от валентности установлено стимулирующее, а в случае детергентов отрицательное действие на процесс агрегации гликополимеров обоих штаммов бактерий.

На основании сравнительного исследования конформационных свойств у исследуемых ЛПС выявлено образование их полисахаридными цепями случайных катушек или α -спиралей в зависимости от температуры, а в отношении катионов металлов независимо от валентности установлена способность к индукции конформационного перехода случайная катушка $\rightarrow$ α -спираль.

На основе результатов проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. Из биомассы клеток *Salinivibrio costicola* EG6S8QL и *Salinivibrio* sp. EG9S8QL выделены препараты ЛПС. Методом электрофореза в ПААГ выявлена гетерогенность исследуемых ЛПС по молекулярной массе с преобладанием R-форм. Электрофоретическая подвижность S-форм ЛПС свидетельствовала о большей молекулярной массе ОПС в ЛПС_{EG9S8QL}, по сравнению с ЛПС_{EG6S8QL}.
2. Охарактеризован состав моносахаридов и жирных кислот ЛПС исследуемых штаммов. Анализ липидов А продемонстрировал консервативность состава первичных жирных кислот – присутствие О-связанной 3-гидроксидодекановой кислоты и N-связанной 3-гидрокситетрадекановой кислоты, что согласуется с литературными данными по другим представителям рода *Salinivibrio*. В составе ЛПС_{EG6S8QL} идентифицированы N-ацетилглюкозамин, глюкоза, галактуриновая и глюкуроновая кислоты в соотношении 4 : 3 : 2 : 1. В ЛПС_{EG9S8QL} выявлено преобладание рамнозы и N-ацетилглюкозамина в соотношении 1 : 1.
3. С применением метода ДРС охарактеризованы агрегационные свойства ЛПС исследуемых штаммов в воде при различной температуре и в присутствии катионов Na^+ , Ca^{2+} и ДСН. Выявлено мономодальное и бимодальное распределение супрамолекулярных комплексов по размеру для ЛПС_{EG9S8QL} и

ЛПС_{EG6S8QL}, соответственно. В присутствии катионов Na^+ , Ca^{2+} (5-50 мМ) наблюдалось увеличение размера агрегатов или кластеров исследуемых ЛПС, в то время как ДСН оказывал дезагрегирующее действие на комплексы.

4. Методом спектроскопии КД изучены спектральные свойства водных растворов ЛПС при различной температуре и в присутствии катионов Na^+ и Ca^{2+} . Установлено, что полисахаридные цепи ЛПС исследуемых штаммов в водных растворах способны образовывать случайные катушки или спирали в зависимости от значения температуры. Присутствие катионов Na^+ и Ca^{2+} вызывает ион-опосредованный переход случайная катушка $\rightarrow$ α -спираль.

