

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра биохимии и биофизики

**СКРИНИНГ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ У ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
СОЛЁНЫХ ОЗЁР**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

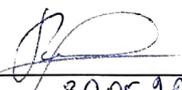
Направления подготовки 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Матевосян Соны Гайковны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент


30.05.2022
(подпись, дата)

М.В. Каневский

Научный консультант:

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


30.05.2022
(подпись, дата)

Е.Н. Сигида

Зав. кафедрой:

д.б.н., профессор


30.05.2022
(подпись, дата)

С.А. Коннова

Саратов 2022

Введение. Галофильные и галотолерантные бактерии составляют подавляющее большинство микрофлоры океанов, морей, солёных озёр, солончаков, морских маршей и других акваторий и территорий, широко распространённых в различных климатических зонах по всему миру. Присутствие значительного количества соли в среде обитания этих микроорганизмов оказало существенное влияние на их метаболизм и строение поверхностных клеточных структур.

В последние годы активно исследуется биотехнологический потенциал галофилов и возможность их применения в различных сферах жизнедеятельности. Разнообразные свойства галофильных бактерий делают их потенциально ценным ресурсом для разработки инновационных биотехнологических процессов и получения биополимеров, каротиноидов, фармацевтических препаратов, косметических средств, пищевых добавок, молекулярных зондов, а также разнообразных ферментов.

Биокатализаторы использовались человеком на протяжении многих веков, и на сегодняшний день количество ферментов, применяемых в различных сферах жизни, постоянно растет. В настоящее время актуальным является поиск наиболее перспективных способов получения ферментов, так как производство препаратов на их основе занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии, а объемы продукции постоянно увеличиваются. Широкое применение ферментов связано с их биологической ролью – способностью во много раз увеличивать скорость химических реакций, а также высокой специфичностью по отношению к определенным веществам и типам реакций.

Производство внеклеточных ферментов является одним из факторов адаптации галофильных бактерий к обитанию в средах, характеризующихся нехваткой питательных веществ и наличием антропогенных поллютантов. Уникальной особенностью ферментов галофильных бактерий, которая позволяет рассматривать их как новую альтернативу для использования в различных областях биотехнологии, является их полиэкстремофильность, они

могут функционировать при высоких концентрациях соли и в широком диапазоне значений температуры и рН, при которых другие белки денатурируют.

Экстраклеточные гидролазы составляют одну из наиболее важных групп промышленных ферментов, которые используются при производстве моющих средств и фармацевтических препаратов, в хлебопечении, пивоварении и сыроварении, при производстве кожи и бумаги, а также в управлении отходами. В связи с этим, поиск штаммов–продуцентов внеклеточных ферментов среди галофильных бактерий и оптимизация условий культивирования по их продукции является востребованным направлением в микробиологии.

Объектами данной работы являлись 16 штаммов грамположительных и грамотрицательных галофильных бактерий, ранее изолированных из образцов соли озёр Карун (Файюмский оазис, Египет) и Эльтон (Волгоградская область, Россия), идентифицированных и охарактеризованных на основании данных культурально-морфологических и физиологических свойств и анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Целью данной работы являлось выявление и характеристика внеклеточной протеолитической, амилолитической, липолитической и пектинолитической активности у галофильных бактерий, выделенных из солёных озёр.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) скрининг штаммов-продуцентов протеолитических, амилолитических, липолитических и пектинолитических внеклеточных ферментов чашечным методом с использованием дифференциально-диагностических плотных сред со специфическими субстратами;

2) исследование влияния условий культивирования (содержание NaCl в среде, температура и продолжительность выращивания) на внеклеточную ферментативную активность изучаемых галофильных бактерий;

3) оптимизация условий культивирования по продукции внеклеточных ферментов.

Объектами исследования являлись 16 штаммов грамположительных и грамотрицательных галофильных бактерий (таблица 1), отличающихся по способности роста при различных концентрациях NaCl – погранично экстремальные, умеренные и слабые галофилы [1]. Бактериальные штаммы культивировали в течение 3 суток при температуре 30 °С в жидкой питательной среде Luria-Bertani [2] Культуры бактерий дальше поддерживали на плотной питательной среде того же состава с добавлением 2 % агар-агара при температуре 30 °С.

Таблица 1 – Штаммы бактерий, использованные в работе

Название штамма	Окраска по Граму	Группа галофилов
<i>Bacillus licheniformis</i> EG1QL30	положительная	умеренные
<i>Bacillus halotolerans</i> RU2EL4	положительная	слабые
<i>Bacillus velezensis</i> EG5QL12	положительная	умеренные
<i>Chromohalobacter salexigens</i> EG1QL3	отрицательная	пограничные экстремальным
<i>Halobacillus dabanensis</i> EG1HP4QL	положительная	слабые
<i>Halomonas caseinilytica</i> EG33S7QL	отрицательная	слабые
<i>Halomonas salina</i> EG19S7QL	отрицательная	слабые
<i>Halomonas</i> sp. EG18S7QL	отрицательная	умеренные
<i>Halomonas</i> sp. EG27S8QL	отрицательная	слабые
<i>Halomonas</i> sp. EG24S8QL	отрицательная	умеренные
<i>Halomonas</i> sp. EG30S8QL	отрицательная	слабые
<i>Halomonas ventosae</i> RU5S2EL	отрицательная	слабые
<i>Marinomonas ostreistagni</i> EG26S8QL	отрицательная	слабые
<i>Salinibacillus aidingensis</i> EG2QL8	положительная	умеренные
<i>Salinivibrio costicola</i> EG6S8QL	отрицательная	слабые
<i>Salinivibrio</i> sp. EG9S8QL	отрицательная	пограничные экстремальным

Материалы и методы исследования. Ферментативную активность исследуемых штаммов бактерий выявляли чашечным методом с использованием дифференциально-диагностических плотных сред со специфическими субстратами: для протеаз – молочного агара [3], для амилаз – растворимого крахмала [4], для липаз – твин-40, твин-60 и твин-85 [5], для пектиназ – яблочного пектина [6].

Анализируемые штаммы засеивали уколом в плотную среду, чашки Петри инкубировали при 30 °С в течение 7 суток. Интенсивность синтеза внеклеточных ферментов оценивали по величине диаметра зоны просветления среды вокруг колоний бактерий через 2, 3, 4 и 7 суток после обработки агаровой пластинки: для амилаз – раствором Люголя, для липаз – 0,05 % раствором бромтимолового синего, для пектиназ – 1 % раствором гексадецилтриметиламмония бромид.

Для количественного определения ферментативной активности и оптимизации условий культивирования по продукции внеклеточных ферментов исследуемые бактериальные штаммы культивировали в течение 14 суток при 20, 30 и 40 °С глубинным методом в жидких питательных средах: для протеаз в соответствии с методикой [3], для амилаз – [7], для липаз – [5] и для пектиназ – [6].

Протеолитическую активность в культуральной жидкости отобранных штаммов определяли на протяжении 14 суток культивирования колориметрическим методом по методике с реактивом Фолина-Чиокалтеу [8], активность протеаз в ед/мл вычисляли по формуле, приведенной в [9]; амилолитическую активность в культуральной жидкости определяли методом Каравея [10], активность амилаз в мг/мл вычисляли по формуле, приведенной в [11]; липолитическую активность определяли по методике [12], активность липаз в ед/мл вычисляли по формуле, также приведенной в [12]; пектинолитическую активность определяли по методике [13], активность пектиназ в ед/мл вычисляли по формуле, приведённой также в [13].

Определение белков осуществляли с помощью реактива Бредфорда [14]. Калибровочную кривую строили, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Структура и объем работы. Работа включает в себя такие структурные элементы, как Содержание, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список использованных источников. Работа проиллюстрирована 13 рисунками и 11 таблицами. Список литературы состоит из 99 наименований. Объем работы составляет 64 страницы.

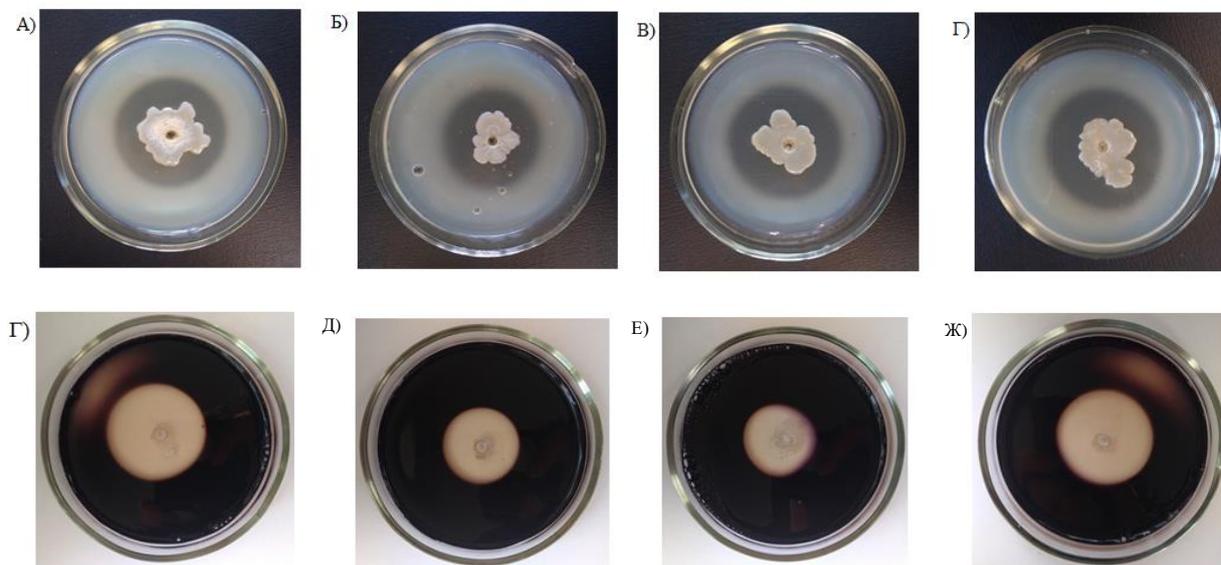
Основное содержание работы.

Исследуемые штаммы были протестированы на способность к продукции внеклеточных липаз, пектиназ, протеаз и амилаз при культивировании на агаре, содержащем соответствующие субстраты. В результате было установлено, что некоторые из исследуемых штаммов росли на средах, содержащих крахмал и казеин, но ни один штамм не был способен расти на средах, содержащих петкин и твин.

В результате скрининга 16-ти штаммов на способность к продукции внеклеточных протеаз при культивировании на молочном агаре ферментативная активность была обнаружена у 8 бактериальных штаммов: *H. dabanensis* EG1HP4QL, *B. halotolerans* RU2EL4, *B. velezensis* EG5QL12, *B. licheniformis* EG1QL30, *Halomonas* sp. EG24S8QL, *Halomonas* sp. EG27S8QL, *Halomonas* sp. EG30S8QL и *H. ventosae* RU5S2EL. Скрининг исследуемых штаммов при культивировании на крахмальном агаре продемонстрировал ферментативную активность у всех вышеперечисленных штаммов за исключением *H. ventosae* RU5S2EL.

Наибольшую протеолитическую активность (диаметр зоны просветления в диапазоне 42-45 мм к 7-му дню культивирования) продемонстрировали штаммы *H. dabanensis* EG1HP4QL, *B. halotolerans* RU2EL4, *B. licheniformis* EG1QL30 и *B. velezensis* EG5QL12 (рисунок 1). Наибольшая амилолитическая активность (диаметр зоны просветления в диапазоне 38-44 мм к 7-му дню культивирования) была выявлена у штаммов *Halomonas* sp. EG24S8QL,

Halomonas sp. EG27S8QL, *Halomonas* sp. EG30S8QL и *B. velezensis* EG5QL12 (рисунок 1). Вышеуказанные штаммы бактерий были отобраны для дальнейшего изучения.



А) *H. dabanensis* EG1HP4QL; Б) *B. halotolerans*RU2EL4; В) *B. velezensis* EG5QL12; Г) *B. licheniformis* EG1QL30; Д) *Halomonas* sp. EG24S8QL; Е) *Halomonas* sp. EG27S8QL; Ж) *Halomonas* sp. EG30S8QL

Рисунок 1 – Штаммы, демонстрирующие протеолитическую (А, Б, В, Г) и амилолитическую (Г, Д, Е, Ж) активность

Для выявления оптимальных условий по продукции внеклеточных протеаз отобранные штаммы культивировали глубинным методом в течение 14 суток при 20, 30 и 40 °С в жидкой питательной среде, содержащей сухое молоко, и NaCl в концентрациях 5, 10 и 15 %.

Так, для бактериального штамма *H. dabanensis* EG1HP4QL наибольшая протеолитическая активность была отмечена в среде с содержанием 15 % NaCl к 12-м суткам культивирования при 40 °С градусах. При культивировании при температуре 30 °С максимальное значение активности внеклеточных протеаз достигало лишь к 12-м и 14-м суткам культивирования в среде, содержащей 5 % NaCl, и к 12-м суткам при содержании 10 % NaCl. При культивировании при

температуре 20 °С продукция протеаз снижалась при повышении концентрации соли в среде.

Штамм *B. halotolerans* RU2EL4 показал наибольшую протеолитическую активность к 5-м суткам культивирования при 40 °С в среде, содержащей 5 % NaCl. При культивировании при температуре 30 °С максимальное значение активности внеклеточных протеаз достигалось к 5-м суткам культивирования в среде, содержащей 5 % NaCl и к 7-м суткам в среде с 10 и 15 % NaCl. При культивировании при температуре 20 °С максимальное значение активности протеаз достигалось в среде, содержащей 5 % NaCl, к 10-м суткам культивирования.

Сходная тенденция наблюдалась для культуры *B. velezensis* EG5QL12, для которой максимальные значения активности внеклеточных протеаз достигались к 5-м суткам культивирования в средах, содержащих 5 % NaCl при температуре 30 и 40 °С. При выращивании при температуре 20 °С увеличение продукции протеаз с течением времени наблюдалось в среде, содержащей 5 % NaCl.

Для штамма *B. licheniformis* EG1QL30 наибольшая продукция внеклеточных протеаз наблюдалась при культивировании в среде, содержащей 5 % NaCl, в диапазоне исследуемых температур. Максимальный уровень активности наблюдался на 4-7 сутки выращивания при 30 °С и на 5-7 сутки при 40 °С, при этом активность протеаз в культуре, выращенной при 40 °С был в 1,5 раз выше, чем при 30 °С. В среде, содержащей 10 % NaCl, при 40 °С высокая активности ферментов сохранялась к 14-м суткам культивирования. При культивировании при температуре 20 °С максимальная продукция внеклеточных протеаз, аналогично штамму *B. velezensis* EG5QL12, наблюдалась лишь к 10-14 суткам.

Для детекции оптимальных условий по продукции экстраклеточных амилолитических ферментов отобранные штаммы бактерий в течение 14 дней культивировали при 20, 30 и 40 °С в жидкой питательной среде, содержащей растворимый крахмал и NaCl в концентрациях 5, 10 и 15 %.

Для штамма *Halomonas* sp. EG24S8QL наибольшая продукция внеклеточных амилаз наблюдалась к 3-м суткам при культивировании при 30 и 40 °С в среде, содержащей 5 % NaCl. Максимальный уровень активности наблюдался на 12 сутки выращивания при 20 °С в среде, содержащей 10 % NaCl.

У штамма *Halomonas* sp. EG27S8QL наибольшая продукция внеклеточных амилаз также наблюдалась при культивировании в среде, содержащей 5 % NaCl, в диапазоне исследуемых температур. Максимальный уровень активности ферментов сохранялась к 14-м суткам культивирования. При культивировании при температуре 40 °С наблюдалось постепенное снижение активности фермента, обусловленное, вероятно, продукцией экстраклеточного глюкана, что привело к искажению данных по активности фермента.

Штамм *Halomonas* sp. EG30S8QL продемонстрировал наибольшую амилолитическую активность на 6 сутки культивирования при 20 °С в среде с 10 % NaCl и на 4 сутки выращивания при 30 °С в среде с 15 % NaCl, а при 40 °С в среде, содержащей 5 % NaCl, сохранял максимум продукции амилаз к 14 суткам культивирования.

Для штамма *B. velezensis* EG5QL12 в среде, содержащей 15 % NaCl, был выявлен максимум продукции амилаз при культивировании при 20 и 30 °С, соответственно. При культивировании при 40 °С максимальная амилолитическая активность наблюдалась все 14 суток в среде, содержащей 5 и 10 % NaCl.

Заключение. Усиленный синтез внеклеточных ферментов у галофильных микроорганизмов является одним из способов адаптации бактерий к агрессивным условиям окружающей среды. Экстраклеточные гидролазы галофильных бактерий стабильны и активны в широком диапазоне NaCl, температуры и pH. В настоящее время всё более широкое применение в промышленности находят биокаталитические процессы с применением

различных ферментов и ферментных препаратов бактериального происхождения.

Таким образом, галофильные бактерии являются уникальными объектами для выделения внеклеточных гидролаз, изучения их биохимических свойств, оценки их роли в функционировании микробного сообщества, а также для применения в различных биотехнологических процессах.

В ходе проведения данного исследования была изучена продукция внеклеточных протеолитических, амилолитических, липолитических и пектинолитических ферментов галофильными бактериями и определены оптимальные условия культивирования по продукции экстраклеточных протеаз и амилаз для исследуемых штаммов. Установлено, что экстраклеточные гидролазы исследуемых штаммов характеризуются активностью в диапазоне NaCl 5-15 % и температуры 20-40 °С, которая сохраняется до 14 суток культивирования. Полученные данные указывают на перспективность дальнейших исследований внеклеточных гидролаз отобранных бактериальных штаммов.

Выводы:

1. Проведён скрининг штаммов-продуцентов внеклеточных протеаз, амилаз, липаз и пектиназ чашечным методом с использованием дифференциально-диагностических плотных сред со специфическими субстратами. Среди 16-ти исследуемых бактериальных штаммов выявлено 7 штаммов-продуцентов как протеаз, так и амилаз: *H. dabanensis* EG1HP4QL, *B. licheniformis* EG1QL30, *B. halotolerans* RU2EL4, *B. velezensis* EG5QL12, *Halomonas* sp. EG27S8QL, *Halomonas* sp. EG24S8QL и *Halomonas* sp. EG30S8QL, а также штамм *H. ventosae* RU5S2EL, обладающий протеолитической активностью. Наиболее перспективными продуцентами протеаз являлись штаммы EG1HP4QL, RU2EL4, EG1QL30 и EG5QL12, а амилаз – штаммы EG27S8QL, EG24S8QL, EG30S8QL и EG5QL12. Липолитическая и пектинолитическая активности среди исследуемых штаммов не выявлены.

2. Исследовано влияние содержания NaCl в среде, температуры и продолжительности культивирования на активность внеклеточных протеаз в культуральной жидкости изучаемых бактерий. Для штаммов *B. halotolerans* RU2EL4; *B. licheniformis* EG1QL30 и *B. velezensis* EG5QL12 оптимальным по продукции протеаз является культивирование при температуре 30 °С в жидкой питательной среде, содержащей 5 % NaCl, в течение 5-7 суток. Для штамма *H. dabanensis* EG1HP4QL оптимальным является культивирование при 40 °С в среде, содержащей 15 % NaCl, в течение 12 суток.

3. Исследовано влияние условий (концентрация NaCl и температура) и продолжительности культивирования изучаемых бактерий на внеклеточную амилолитическую активность. Оптимальным для продукции внеклеточных амилаз штаммами *Halomonas* sp. EG24S8QL, *Halomonas* sp. EG27S8QL, *Halomonas* sp. EG30S8QL и *B. velezensis* EG5QL12 является культивирование при всём диапазоне рассматриваемых температур в течение 6-14 суток в жидкой питательной среде, содержащей 5 % NaCl.

Список литературы:

1. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы — продуценты экзополисахаридов, выделенные из солёных озёр Карун (Египет) и Эльтон (Россия) / И. М. Ибрахим [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 345-353.

2. Bertani, G. Studies only so genesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. / G. Bertani // Journal of Bacteriology. – 1951. – V. 62. – P. 293-300.

3. Elbanna, K. Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt / K. Elbanna, I. M. Ibrahim, A.-M. Revol-Junelles // Extremophiles. – 2015. – V. 19, N 4. – P. 763-774.

4. Качан, А. В. Выделение и характеристика штамма *Bacillus* sp. 406, продуцирующего термостабильную амилазу / А. В. Качан, О. Б. Русь, А. Н. Евтушенков // Современное состояние и перспективы развития микробиологии

и биотехнологии: материалы VI Международной научной конференции, Минск. – 2008. – С. 147-149.

5. Бакулин, М. К. Микробиология. Методические указания к лабораторным работам и учебной практике / М. К. Бакулин, А. А. Лещенко, Е. В. Чеботарев. – Киров: ВГУ, 2005. – С. 126.

6. <http://www.himedialabs.ru/m597> (дата обращения: 30.05.2022)

7. Русь О. Б. Характеристика природного изолята *Bacillus* sp., продуцирующего термостабильную амилазу / О. Б. Русь, А. Н. Евтушенко // Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География. – 2008. – Т. 3. – С. 47-50.

8. Folin, O. On tyrosine and tryptophan determination in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // Journal of Biological Chemistry. – 1929. – V. 73. – P. 627-649.

9. Cupp-Enyard, C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate / C. Cupp-Enyard, A. Sigma // Journal of Visualized Experiments. – 2008. – V.19. – P. 1-2.

10. Колб, В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – С. 234.

11. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities / Z. Xiao, R. Storms, A. Tsang // Analytical Biochemistry. – 2006. – V. 351. – P.146-148.

12. Внеклеточная липолитическая активность бактерий рода *Arthrobacter* / Л. В. Ерхова [и др.] // Доклады национальной академии наук Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 5. – С. 77-80.

13. Horikoshi, K. Production of Alkaline Enzymes by Alkalophilic Microorganisms / K. Horikoshi // Agricultural and Biological Chemistry. – 1972. – V. 36, N 2. – P. 285-293.

14. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс // М.: Мир. – 1985. – С. 315-342.

