

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

Кафедра биохимии, биофизики

**СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПОЛИ-ГАММА-ГЛУТАМИНОВОЙ
КИСЛОТЫ, ПРОДУЦИРУЕМОЙ ГАЛОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ
BACILLUS ATROPINAEUS В-221**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Липатова Никиты Николаевича

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

Ю.П. Федоненко

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук

С.А. Коннова

Саратов 2026

Введение. Галофильные бактерии представляют собой группу микроорганизмов, для роста которых в среде необходимо наличие солей. Находясь в условиях повышенного осмотического давления, сочетающегося с аномальными температурами, экстремальными значениями pH среды, высушивания и регидратации, бактерии выработали различные адаптационные стратегии, предотвращающие обезвоживание клеток. Одним из механизмов адаптации галофилов к экстремальным условиям среды обитания является экстраклеточная продукция полимеров (полисахаридов, полипептидов, полиглутаминовой кислоты и др.), создающих вокруг клеток микроокружение с относительно постоянными значениями pH, солёности и температуры. Эти экстраклеточные полимеры (ЭП) обладают спектром свойств (влагоудерживающей, эмульгирующей, флокулирующей активностями, поверхностно-активными свойствами), которые потенциально востребованы в биотехнологиях, используемых при очистке сточных вод, в сельском хозяйстве, пищевой и косметической промышленности. Одним из преимуществ использования галофилов в качестве продуцентов биополимеров является малая вероятность контаминации бактериальной культуры, что позволяет использовать более низкие требования к микробиологическому контролю, уменьшающие затраты на стерилизацию. Однако, высокая концентрация соли может подвергать коррозии металлические части биореакторов, для предотвращения чего рекомендуется использовать коррозионно-устойчивые материалы.

Объектом исследования являлся изолят галофильных бактерий В-221, выделенный из пелоида самоосадочного оз. Боткуль (Волгоградская область).

Цель работы: характеристика структурно-функциональных свойств экстраклеточного полимера, продуцируемого изолятом галофильных бактерий В-221.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) идентифицировать изолят галофильных бактерий В-221;
- 2) выделить полимер из культуральной жидкости изолята В-221;

- 3) охарактеризовать состав и структуру экстраклеточного полимера;
- 4) определить биотехнологически востребованные свойства биополимера.

Исследования выполнялись с использованием методов, адекватных поставленным задачам. Идентификация изолята бактерий осуществлялась с помощью филогенетического анализа по гену 16S РНК, на основе полногеномного секвенирования и физиолого-биохимических характеристик. Было проведено культивирование микроорганизмов в оптимальных условиях, ЭП были выделены путем осаждения из культуральной жидкости холодным этиловым спиртом. Химический состав ЭП был определен колориметрическими методами. Структура ЭП определялась на основании анализа одномерных протонных и углеродных спектров. Молекулярная масса полимера определялась вискозиметрическим методом и высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Были определены такие физико-химические, как эмульгирующая, флокулирующая активности, влаго- и маслоудерживающей способностей и влияние ЭП на степень синерезиса крахмала.

Структура бакалаврской работы. Работа построена по общему плану и состоит из введения, основной части с 3 главами (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение) заключения и списка использованных источников. Объем работы составил 50 страниц, при написании работы использовано 92 литературных источника.

Основное содержание работы. Боткуль – горько-солёное бессточное озеро на севере Прикаспийской низменности, западная часть которого расположена на территории Эльтонского сельского поселения Палласовского района Волгоградской области (48.791401, 46.594009). Представительные пробы пелоидов (лечебных грязей) отбирались в стерильные контейнеры и сохранялись в портативном холодильнике при +4 °С.

Для выделения ЭП продуцирующих бактериальных культур сначала были получены накопительные культуры посевом микроорганизмов из

образца пелоида (1 г) на жидкую среду S-G (9 мл), содержащую 5 % NaCl. Отбор изолята В-221 был осуществлен по мукоидному фенотипу колоний высевом накопительной культуры на чашки Петри со средой S-G, содержащей 10% NaCl), и инкубацией при 37 °С в термостате в течение 5 суток. Чистоту бактериальной культуры контролировали с помощью световой микроскопии. Хранение изолята осуществляли при –70°С в среде S-G с добавлением 20% глицерина.

Из бактериальных клеток изолята В-221, выращенных до экспоненциальной стадии роста, была выделена ДНК и с помощью универсальных праймеров 27F и 1492R методом ПЦР был получен ген 16S рРНК. Секвенирование гена было осуществлено на коммерческой основе в ООО «Евроген». Для последовательности фрагмента гена 16S рРНК длиной 780 пар нуклеотидов, с использованием сервиса BLAST был осуществлен поиск ближайших гомологов. Выделенный изолят был фенотипически близок к представителям рода *Bacillus*, однако уровень гомологии последовательностей гена 16S рРНК 87,17% и 87,13% с типовыми штаммами *Bacillus spizizenii* NRRL В-23049 и *Bacillus tequilensis* 10b, соответственно, был недостаточен для уверенной видовой идентификации. При этом построенное филогенетическое дерево с использованием программы MEGA11 демонстрировало отнесение изолята В-221 в боковую ветвь к кластеру, в котором большая часть видов была представлена галофильными и непатогенными видами бацилл. Эти данные позволяют предполагать наличие у изолята В-221 сходных биохимических и физиологических характеристик, которые могли быть использованы для оптимизации условий культивирования изолята.

В рамках полифазного подхода к идентификации бактерий в дополнение к филогенетическому анализу по гену 16S рРНК была проведена характеристика морфологических и физиологических параметров изолята и филогенетический анализ, на основе полногеномного секвенирования, который показал, что исследуемый изолят формирует кладу с ближайшим

штаммом *B. atrophaeus* SW. Процент сходства геномных последовательностей согласно fastANI составляет 98,74%. Сходство со сборками остальных видов *Bacillus* не превышает 82,31%. Полученные филогенетические и морфофизиологические характеристики дают возможность точной идентификации выделенного изолята и его отнесение к *Bacillus atrophaeus*.

На следующем этапе исследования было проведено культивирование бактерий изолята *Bacillus atrophaeus* B-221 на модифицированной питательной среде ГРМ и на среде Сигал-Гибсон (S-G), а из культуральной жидкости осаждением спиртом был выделен ЭП.

Для определения содержания белка в ЭП был выбран метод Бредфорда, поскольку он характеризуется низкой чувствительностью к примесям углеводов, присутствующих в составе ЭП, в отличие метода Лоури. Этот метод также характеризуется меньшим временем проведения анализа в сравнении с методом с бичинхоиновой кислотой. Массовая доля белка в ЭП составила $2,77 \pm 0,01\%$ и $1,83 \pm 0,01\%$ при культивировании штамма B-221 на среде S-G и модифицированной среде ГРМ, соответственно.

При определении массовой доли углеводов в ЭП фенол-сернокислотным методом без предварительного гидролиза было показано их довольно низкое содержание, которое составляло $2,74 \pm 0,04\%$ и $1,65 \pm 0,01\%$ при культивировании на среде S-G и модифицированной среде ГРМ, соответственно.

По результатам анализа моносакхаридного состава методом газожидкостной хроматографии ацетатов полиолов в ЭП было показано присутствие маннозы и глюкозы в приблизительно равных количествах.

Вследствие выявленного незначительного содержания белка и углеводов в ЭП и анализа литературных данных о структуре ЭП бацилл мы предположили, что экстраклеточный биополимер данного галофильного изолята представлен поли-гамма-глутаминовой кислотой (γ -ПГК). Для подтверждения данной гипотезы была проведена тонкослойная хроматография (ТСХ) гидролизата ЭП с последующей визуализацией

компонентов нингидриновым реактивом. По результатам ТСХ в ЭП была выявлена преобладающая фракция с коэффициентом удержания 0,52 соответствующим таковому у L- и D-глутаминовой кислоты, используемых в качестве стандартов. Метод ТСХ не позволил дифференцировать энантиомерный состав γ -ПГК поскольку у энантиомеров не отличались коэффициенты удержания. В гидролизате исследуемого ЭП присутствовала слабовыраженная фракция с $R_f = 0,44$, которая, вероятно, обусловлена присутствием оставшихся после гидролиза олиго- и димеров глутаминовой кислоты.

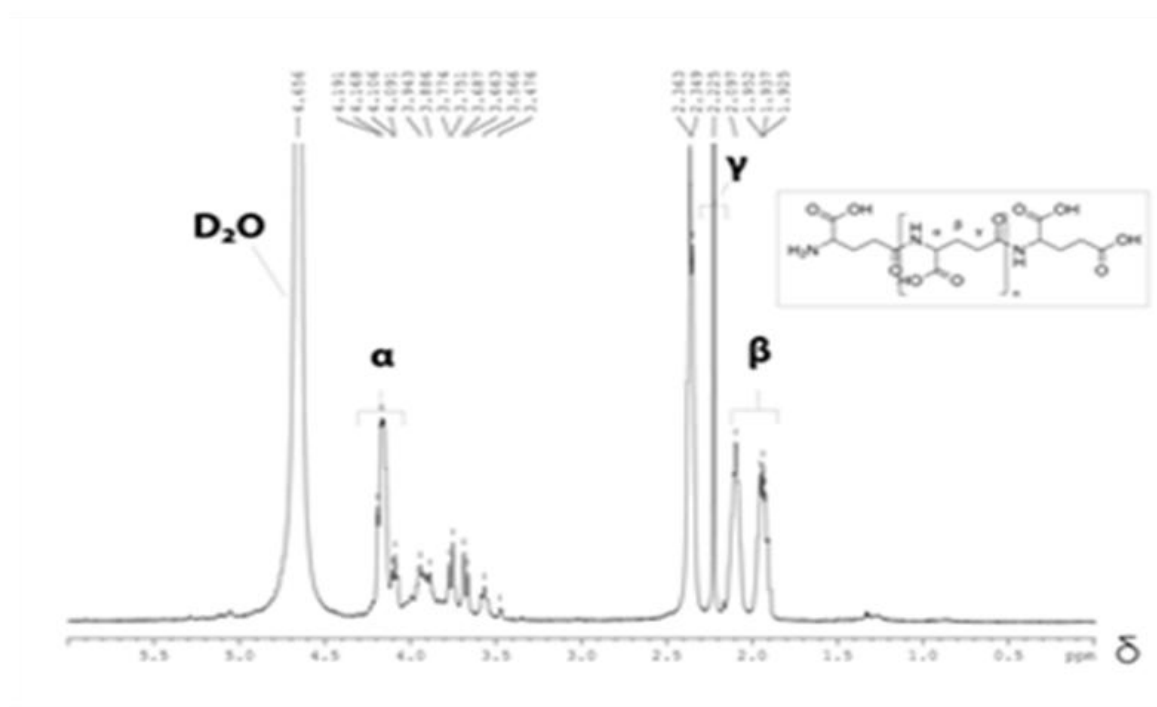
Проведённая ^1H -ЯМР спектроскопия ЭП (рисунок 1а) *B. atrophaeus* В-221 показала наличие сигналов при δ 4,17 м.д. протонов α -СН группы, при δ 1,93 м.д. и δ 2,10 м.д. протонов β -СН₂ и δ 2,23 м.д. – γ -СН₂. Наблюдаемый сигнал при δ 4,66 м.д. обусловлен присутствием в образце остаточных количеств НОД.

Данные ^{13}C -ЯМР спектроскопии (рисунок 1б) демонстрировали наличие сигналов при δ 55,95 м.д., δ 28,94 м.д., δ 33,50, которые соответствовали атомам углерода в α -СН, β -СН₂, γ -СН₂ группах. Сигналы δ 176,31 м.д. и δ 179,51 м.д., соответствовали атомам углерода в α - и γ -карбонильных групп, соответственно. Также в ^{13}C -ЯМР спектрах присутствовали сигналы в области при δ 60-85 м.д. и δ 105 м.д., значительно меньшей интенсивности, чем сигналы γ -ПГК, которые обусловлены наличием примеси полисахарида в ЭП.

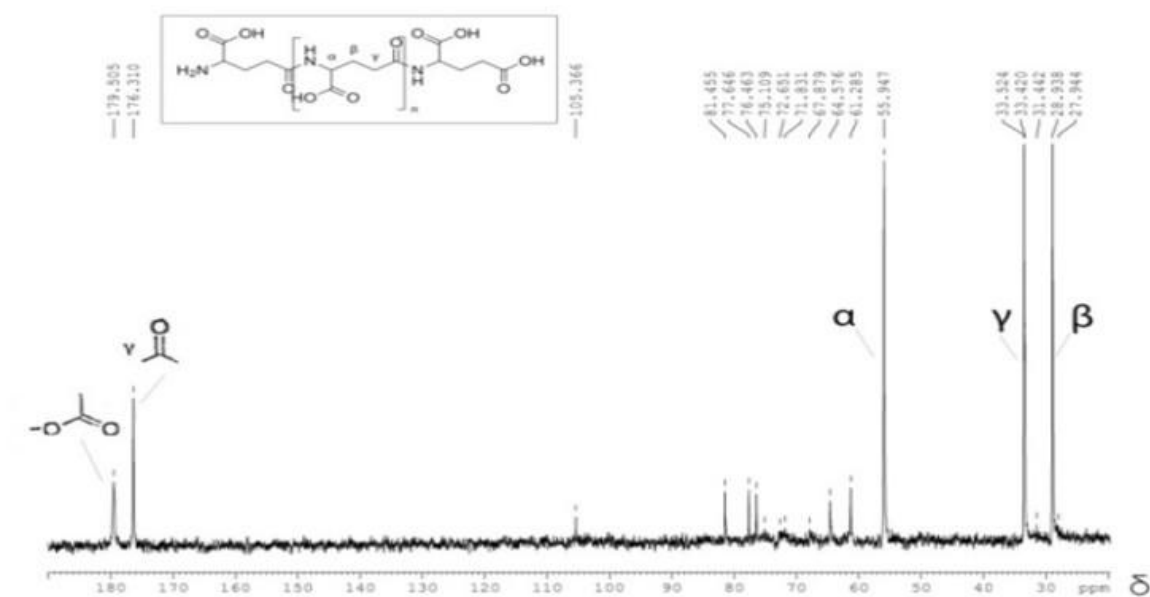
Полученные данные свидетельствовали о том, что в составе ЭП преобладает линейный полимер, мономерными звеньями которого является остаток глутаминовой кислоты. Данные ЯМР спектроскопии подтверждались результатами ТСХ. Амидная связь в γ -ПГК в отличие от пептидной связи в белках не дает окрашивание в методе Бредфорда, что согласуется с полученными нами данными.

Молекулярная масса была определена методом ВЭЖХ и вискозиметрическим методом для интактной и модифицированной γ -ПГК,

полученной частичным гидролизом. Средневязкостная молекулярная масса была определена для интактной и модифицированной γ -ПГК и составила $6,39 \cdot 10^5$ Да и $4,83 \cdot 10^4$ Да, соответственно, в то время как для модифицированной ПГК молекулярная масса, определенная методом ВЭЖХ, составила $3,08 \cdot 10^5$ Да.



(a)



(б)

Рисунок 1 – ^1H (а) и ^{13}C (б) ЯМР спектры ЭП *B. atrophaeus* В-221

Различия в молекулярных массах определенных вискозиметрическим методом и ВЭЖХ возникли поскольку коэффициент α в уравнении Марка-Хоумвика не одинаков для низко- и высокомолекулярных фракций. Вероятно, различия в молекулярной массе могут быть связаны с изменением конформации молекул γ -ПГК. Для определения теоретически расчетной молекулярной массы γ -ПГК был введен поправочный коэффициент равный отношению средневязкостной молекулярной массы к молекулярной массе, определенной с помощью ВЭЖХ, который составил 0,157. Исходя из этого молекулярная масса интактной γ -ПГК составила $4,064 \cdot 10^6$ Да.

Исходя из высоких значений молекулярной массы исследуемой γ -ПГК, мы определили некоторые физико-химические характеристики полимера (эмульгирующую и флокулирующую активности, влаго- и маслоудерживающую способности). Определенные значения этих характеристик полимера позволяют оценить перспективы его использования в различных областях промышленности, таких как пищевая, косметическая, медицинская, а также при очистке сточных вод.

γ -ПГК продемонстрировала способность стабилизировать водные эмульсии в течении длительного времени с растительным маслом, *о*-ксилолом, керосином и нефтью. Индексы эмульгирования представлены в таблице 1. Эмульгирующая активность полимера, полученного при культивировании бактерий на среде ГРМ с глицерином, была значительно выше в отношении *о*-ксилола.

Высокая эмульгирующая активность исследуемого ЭП в отношении растительного масла предполагает возможность его потенциального использования в пищевой промышленности, например, при производстве хлеба для предотвращения старения и улучшению текстуры, а также в качестве стабилизатора мороженого и йогуртов. Высокий индекс эмульгирования в отношении нефти демонстрирует перспективность использования водных растворов ЭП в качестве компонента снижения вязкости тяжелой нефти при транспортировке по трубопроводам.

Измерение влагоудерживающей способности показало достаточно высокую способность связывать воду – 1 г γ -ПГК связывал $38,4 \pm 1,6$ г воды, что позволяет предположить востребованность данного полимера в косметологической промышленности в качестве компонента увлажняющих средств. Было показано, что 1 г γ -ПГК обладает способностью связывать $5,68 \pm 0,99$ г растительного масла. Применение влаго- и маслоудерживающих полимеров в пищевой промышленности при добавлении в фарш, йогурты и тесто позволяет улучшать текстуру продуктов и значительно увеличивать сроки их хранения.

Таблица 1 – Эмульгирующая активность ЭП *Bacillus atrophaeus* В-221

Среда культивирования	Гидрофобный субстрат			
	растительное масло	о-ксилол	керосин	нефть
S-G	$55,7 \pm 0,6\%$	$13,4 \pm 0,9\%$	$5,7 \pm 0,1\%$	$76,5 \pm 3,6\%$
ГРМ	$55,2 \pm 5,1\%$	$55,8 \pm 2,8\%$	$2,92 \pm 0,8\%$	н/д

Примечание – н/д – нет данных.

Для γ -ПГК были получены данные флоккулирующей способности (ФС), было показано, что γ -ПГК проявляла максимальную ФС в 29,1% при ее концентрации в 16 мг/л, при этом более высокие концентрации приводили к стабилизации суспензии каолина.

Полученные данные о зависимости ФС γ -ПГК от его концентрации соотносятся с литературными данными, при этом для определенных форм γ -ПГК, ФС, показана на более высоком уровне. Потенциальном применении полимера в качестве флокулянта вероятно затруднено, так как он обладает не высокой флоккулирующей активностью относительно других полимеров, у которых она может достигать до 90 %.

Измеренная флокулирующая активность ЭП в отношении суспензии активированного угля была отрицательная при всех используемых концентрациях ЭП. Можно сделать вывод, что ЭП не обладает флокулирующей активностью в отношении суспензии, где твердая фаза представлена частицами, не имеющими на поверхности отрицательно или положительно заряженных групп. В отличие от частиц каолина, несущих на поверхности отрицательный заряд, что объясняется механизмом флокуляции γ -ППК, основанном на образовании ионных мостиков с отрицательно заряженными группами через ионы Ca^{2+} .

Степень синерезиса 2% раствора крахмала была определена для концентраций γ -ППК в геле 0,1%, 0,25% и 0,5%. До 4 суток после начала эксперимента даже минимальная используемая концентрация γ -ППК обеспечивала отсутствие синерезиса. Добавление 0,5% γ -ППК в раствор крахмала не приводило к синерезису в течении 8 суток. Следует отметить, что степень синерезиса на 8 сутки эксперимента была снижена относительно контроля в 10, 37 и 69 раз в присутствии 0,1%, 0,25% и 0,5% γ -ППК, соответственно. Наблюдаемый эффект позволяет предположить, что исследуемая γ -ППК может быть использована в качестве пищевой добавки в производстве сыров, творога и йогуртов.

Заключение. В ходе проведенных исследований был выделен штамм галофильных бактерий, продуцирующий значительное количество ЭП. На основании физиолого-биохимических и морфологических характеристик, а также филогенетического анализа последовательности гена 16S рРНК и молекулярно-генетического анализа генома штамм В-221 был отнесен к *B. atrophaeus*.

Выделение экстраклеточного полимера с последующей очисткой и структурной характеристикой позволило установить, что *B. atrophaeus* В-221 продуцирует высокомолекулярную γ -ППК, масса которой составляет 4,064 МДа. Измерение физико-химических характеристик γ -ППК позволило продемонстрировать ее высокую эмульгирующую активность, способность к

удержанию воды и растительного масла и снижению степени синерезиса раствора крахмала, что делает выделенный биополимер перспективным для практического применения. Высокомолекулярная γ -ПГК может использоваться в пищевой промышленности и косметологии, как загуститель, стабилизатор, влагоудерживающий агент в составе гелей, кремов и биотехнологии для создания биоразлагаемых материалов.

Выводы. 1. Изолят В-221, выделенный из образца пелоида гипергалинного оз. Боткуль, на основании физиолого-биохимических характеристик и филогенетического анализа последовательности гена 16S рРНК и молекулярно-генетического анализа генома был отнесен к виду *Bacillus atrophaeus*.

2. Из культуральной жидкости *B. atrophaeus* В-221 был выделен ЭП в препаративных количествах, состоящий из γ -ПГК с незначительной примесью углеводов и белков.

3. Для ЭП были определены востребованные в биотехнологии физико-химические свойства (влаго- и маслоудерживающая способности, эмульгирующая и флокулирующая активности, влияние на степень синерезиса), позволившие определить его высокий биотехнологический потенциал.

Таким образом, выделенный штамм *B. atrophaeus* В-221 представляет значительный интерес как продуцент γ -ПГК, а полученный биополимер может быть использован в различных биотехнологических процессах.