

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України



**«МЕТАБОЛІТИ БАКТЕРІЙ ТА
ДРІЖДЖІВ ТА ЇХ ФУНКЦІОНАЛЬНА
АКТИВНІСТЬ»**

Колектив авторів:

1. **Хархота Максима Андрійович** - кандидат біологічних наук, завідувач лабораторії біологічних полімерних сполук Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.
2. **Харчук Максим Сергійович** - кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.
3. **Василюк Ольга Миколаївна** - кандидат біологічних наук, науковий співробітник Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.
4. **Лагутіна Ольга Сергіївна** - молодший науковий співробітник Інституту медицини праці ім. Ю.І. Кундієва НАМН України.

**на здобуття щорічної Премії Президента України для
молодих вчених**

КИЇВ - 2020

Актуальність**теми:**

Мікроорганізми здатні синтезувати різноманітні метаболіти, значна частина яких використовується в промисловості та сільському господарстві. Деякі сполуки (частина антибіотиків, ферменти, вітаміни, полімерні сполуки) в промислових масштабах отримують лише біотехнологічним шляхом. Активний розвиток науки потребує постійного пошуку продуцентів біологічних речовин з новими властивостями. Враховуючи високий біосинтетичний потенціал бактерій родів *Bacillus* і *Lactobacillus*, актуальним завданням є комплексні фундаментальні дослідження біологічних особливостей перспективних продуцентів ряду біологічно активних речовин та встановлення їхньої природи.

Мета роботи:

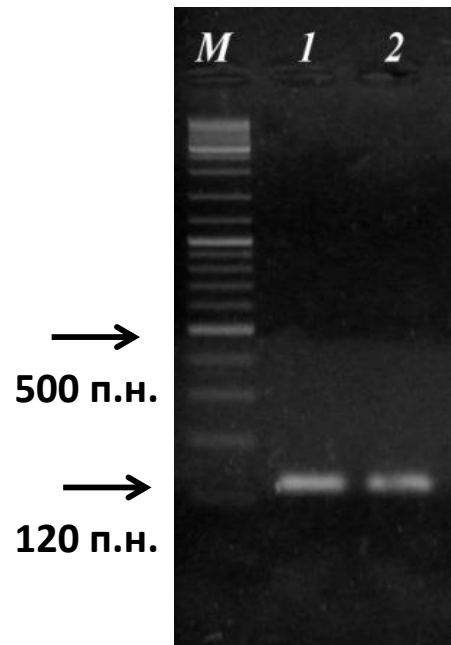
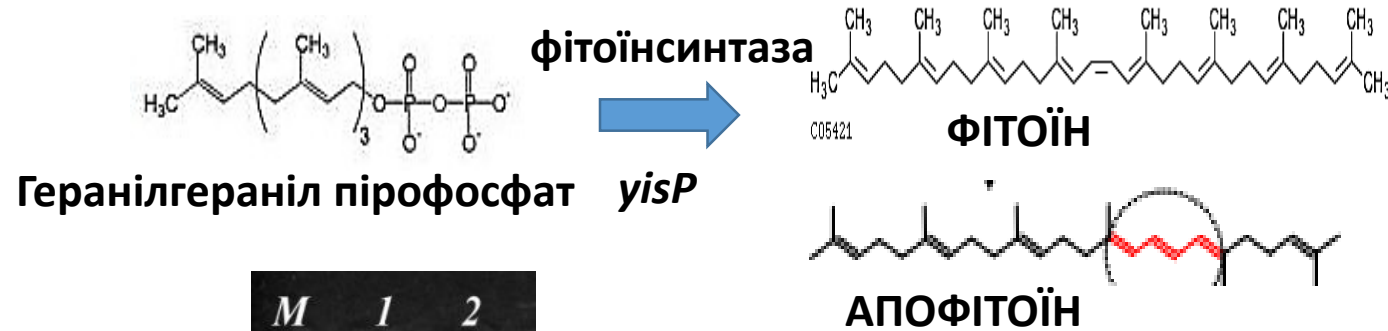
- дослідити природу та фізико-хімічні властивості біологічно активних речовин бактерій родів *Bacillus*, *Lactobacillus* та *Saccharomyces*.

Завдання роботи:

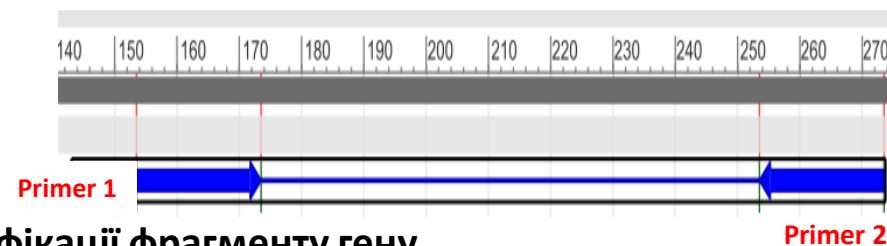
- Встановити природу пігментів досліджуваних штамів бактерій роду *Bacillus* та визначити закономірності росту та утворення каротиноїдів штамми *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 та IMB B-7525.
- Дослідити пробіотичні властивості штамів *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 та IMB B-7525.
- Провести скринінг штамів бактерій роду *Bacillus*, здатних до синтезу екзополімерних речовин поліамінної природи та встановити фізико-хімічні властивості γ -поліглутамінової кислоти.
- Провести пошук штамів молочнокислих бактерій, що продукують біологічно активні речовини;
- Оцінити антимікробну та антивірусну активність метаболітів молочнокислих бактерій.
- Вивчити основні промислово важливі ознаки штамів молочнокислих бактерій та оцінити перспективи їх використання у складі заквасок для виготовлення ферментованих продуктів.
- Дослідити морфологію волютинових гранул *in vivo* та *in vitro* і з'ясувати чи пов'язана вона зі зміною концентрації фосфору у середовищі. Встановити компонентний склад виділених волютинових гранул.
- Дослідити рухливість волютинових гранул в процесі культивування дріжджів під впливом ряду фізико-хімічних факторів та в умовах фосфорного голодування та його гіперкомпенсації.
- Визначити вплив фізико-хімічних факторів на прояв реакції метахромазії *in vitro* в системі поліфосфатів волютинових гранул.
- Дослідити вплив стресових факторів на особливості волютинових гранул.
- Розробити гіпотетичну модель впливу фосфорного метаболізму на особливості морфології і функціонування волютинових гранул.

ПЛР-АНАЛІЗ ГЕНА ФІТОЇНСИНТАЗИ ШТАМІВ *B. AMYLOLIQUEFACIENS* IMB B-7513 та B-7525

3



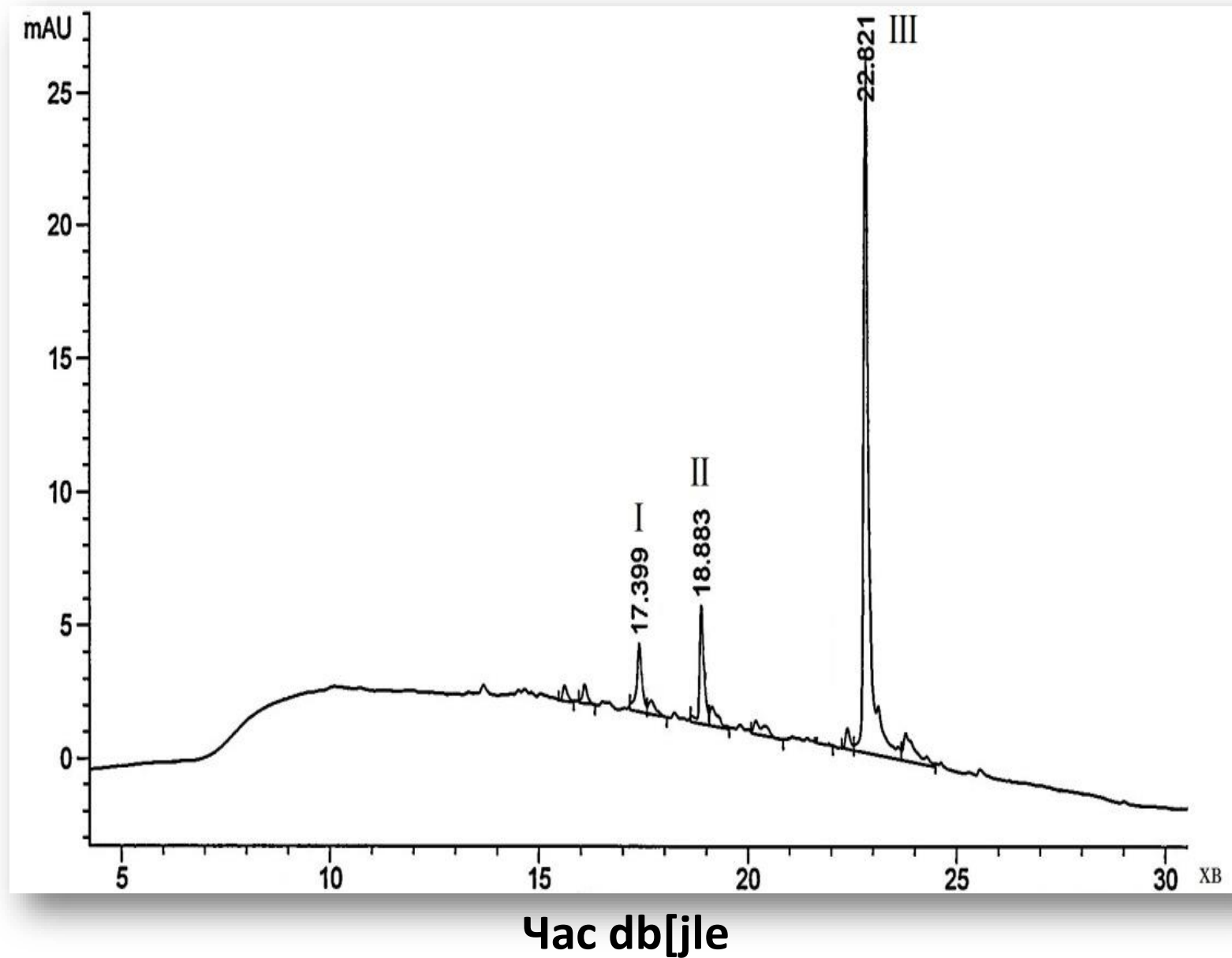
Праймер	Нуклеотидна послідовність	Амплікон, п.н.
<i>yisP</i> (R)	5'-TTT GAG GGA TTT GAA CAG GC-3'	120
<i>yisP</i> (F)	5'-ACA GAA CGG CTC TTC TTC CA-3'	



Електрофореграма ампліфікації фрагменту гену
 фітоїнсинтази (*yisP*) бактерій роду *Bacillus*: M – маркер,
 1 – *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513,
 2 – *B. amyloliquefaciens* IMB B-7525

НРЛС-ХРОМАТОГРАМА ЕКСТРАКТУ ПІГМЕНТІВ ШТАМУ *B. AMYLOLIQUEFACIENS* ІМВ В-7513

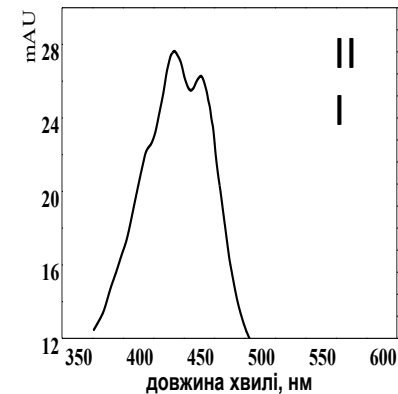
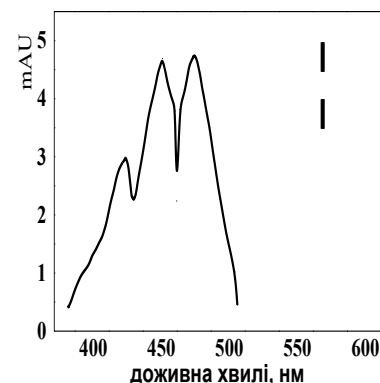
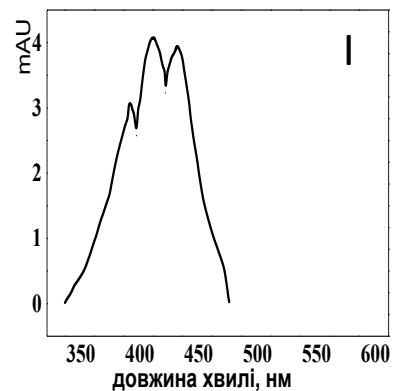
4



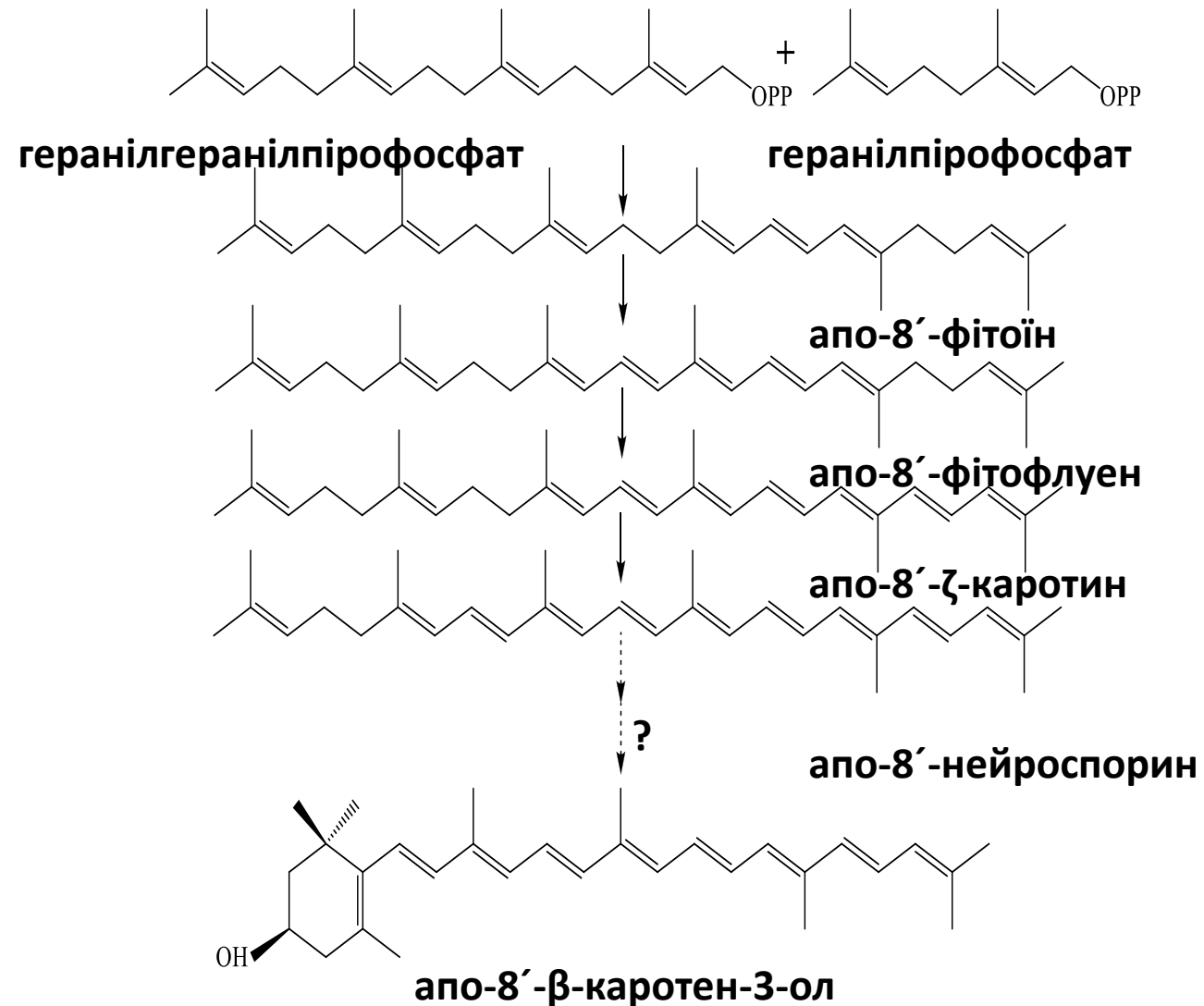
ХРОМАТОГРАФІЧНІ ПОКАЗНИКИ ТА СПЕКТРИ ПОГЛИНАННЯ КАРОТИНОЇДІВ ДОСЛІДЖУВАНИХ ШТАМІВ

№	час, х в	λмакс, нм			MS	Сполука
		1	2	3		
I	<u>17,4</u>	<u>380</u>	<u>398</u>	<u>422</u>	<u>405</u>	апо-8-ζ-каротин
	К	378	400	425	404	
II	<u>18,9</u>	<u>415</u>	<u>440</u>	<u>465</u>	<u>498</u>	апо-8-нейроспорин
	К	412	435	465	402	
III	<u>22,6</u>	<u>395</u>	<u>418</u>	<u>440</u>	<u>723</u>	(C _{8:0})-глікозил-апо-8'-β-каротен-3-ол
	К	403	425	450	418	
IV *	<u>18,4</u>	<u>330</u>	<u>345</u>	<u>364</u>	<u>565</u>	глікозил-апо-8-фітофлуен
	К	330	345	364	403	

К – за *Britton, 2004* ; * - інгібіторний аналіз з дифеніламіном



ШЛЯХ СИНТЕЗУ КАРОТИНОЇДІВ ШТАМАМИ *B. AMYLOLIQUEFACIENS* ІМВ В-7525 ТА ІМВ В-7513



Фізико-хімічні властивості ПГК штаму *Bacillus sp M 20-G*

Амінокислота	Вміст, %	Амінокислота	Вміст, %
L-аспарагінова	0	L-тирозин	0
L-глутамінова	93,9	L-валін	0
L-серин	0,6	L-метионін	0
L-гістидин	0	L-фенілаланін	0
L-гліцин	1,8	L-ізолейцин	0
L-треонін	0	L-лейцин	0,6
L-аргінін	1,0	L-лізин	0
L-аланін	1,0	L-пролін	1,1
L-цистеїн	0,0		

Молекулярна вага: ≥ 2000000 Да

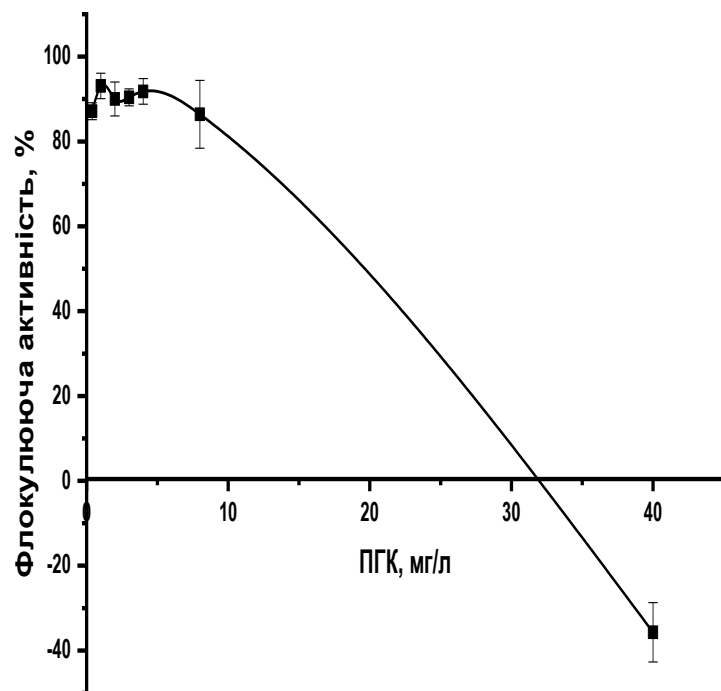
Наявність вуглеводів: відсутні

Токсичність:

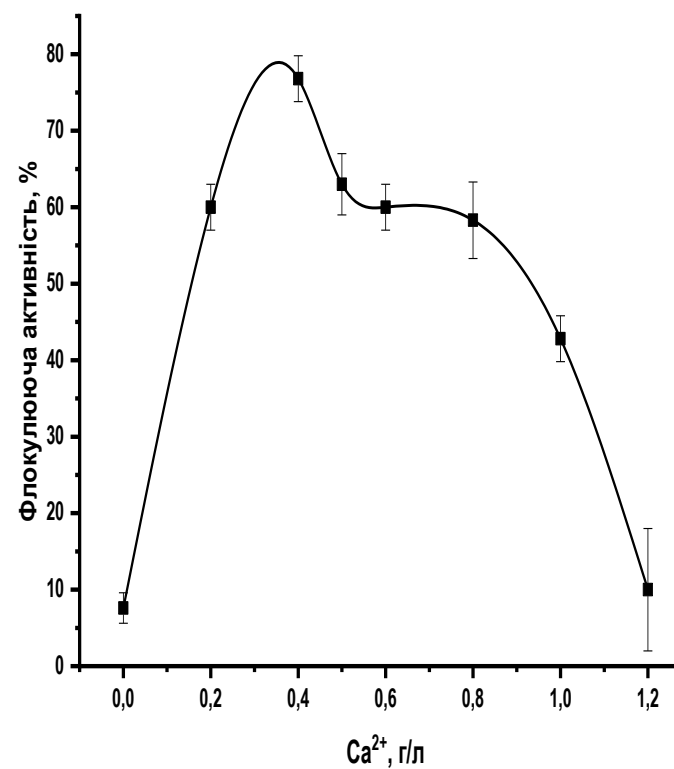
Миші - ≥ 20 мг/тварину

Культура тканин - $\geq 2,5$ мг/мл

Вплив концентрації γ -ПГК (А) та катіонів Ca^{2+} (Б) на флокулюючу активність γ -ПГК штаму *B. licheniformis* M20-Г

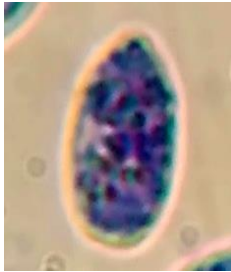
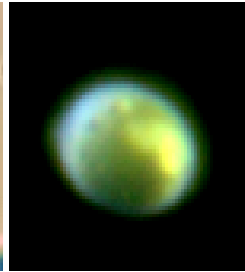

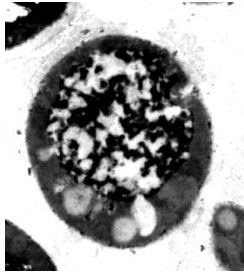
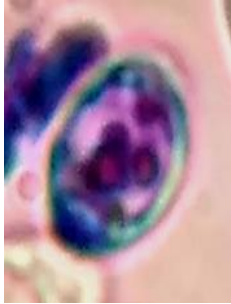
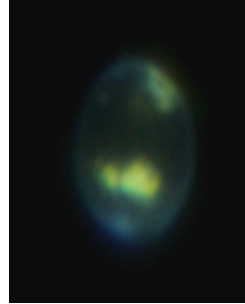
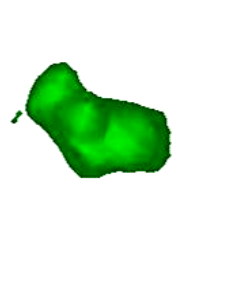
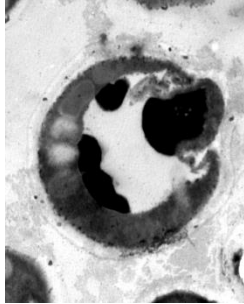

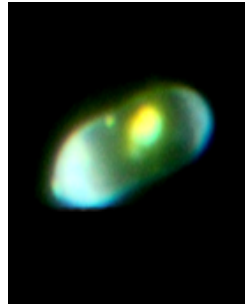



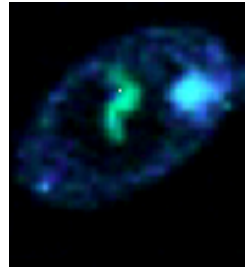

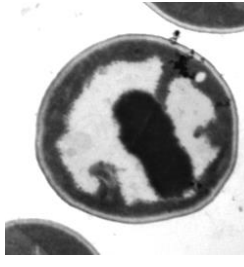


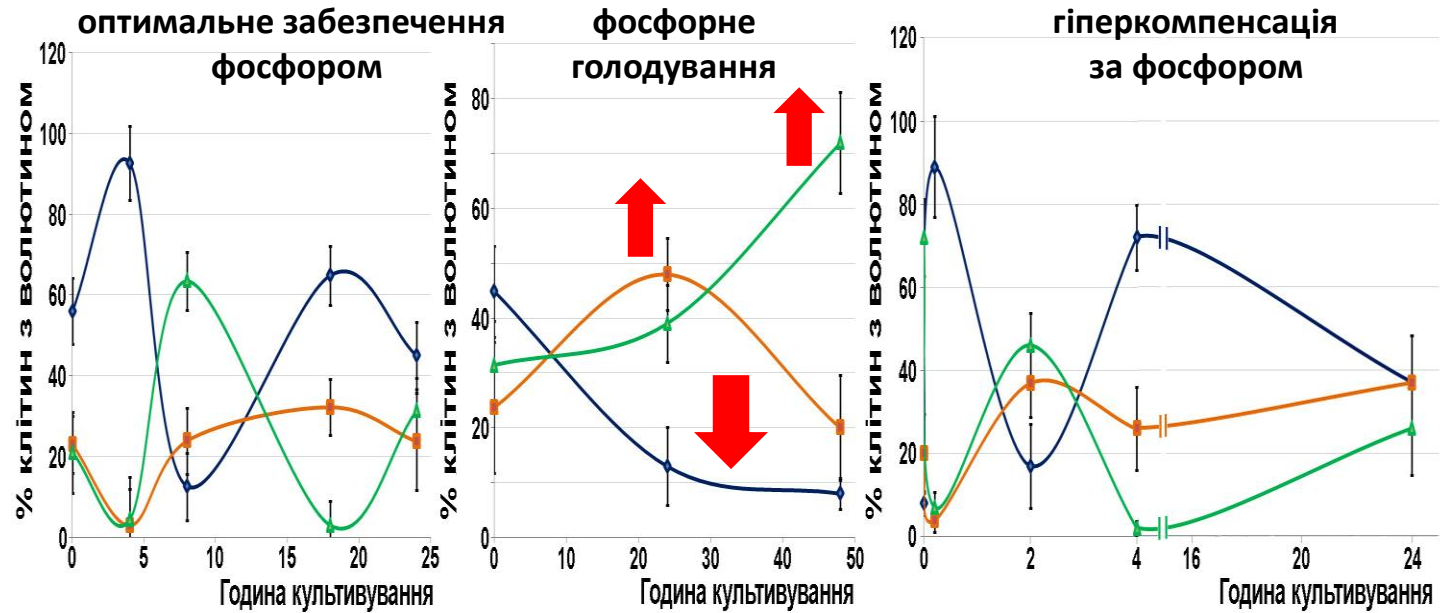
А



Б

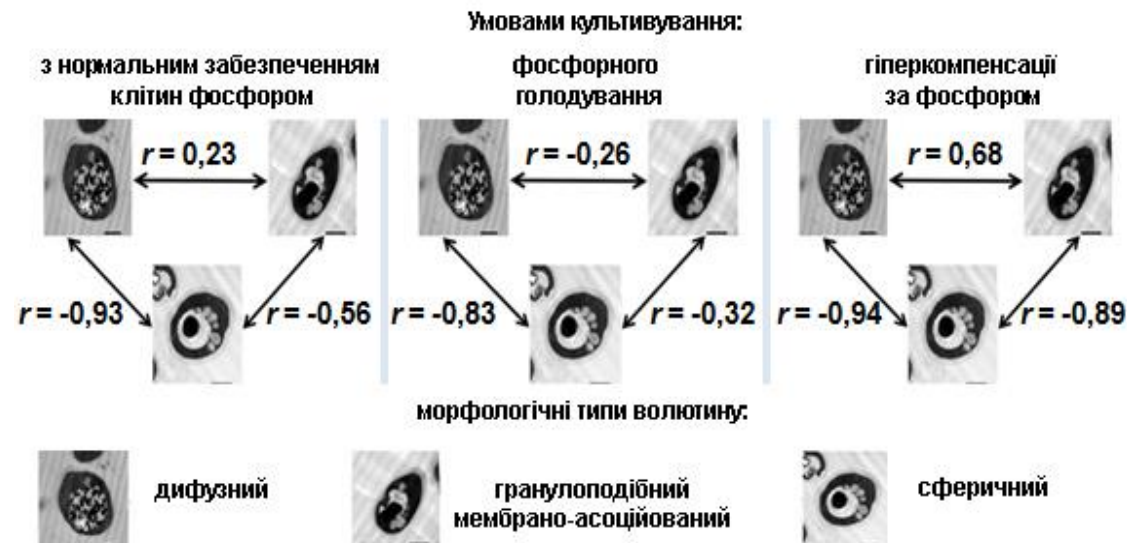
Мікроскопії:

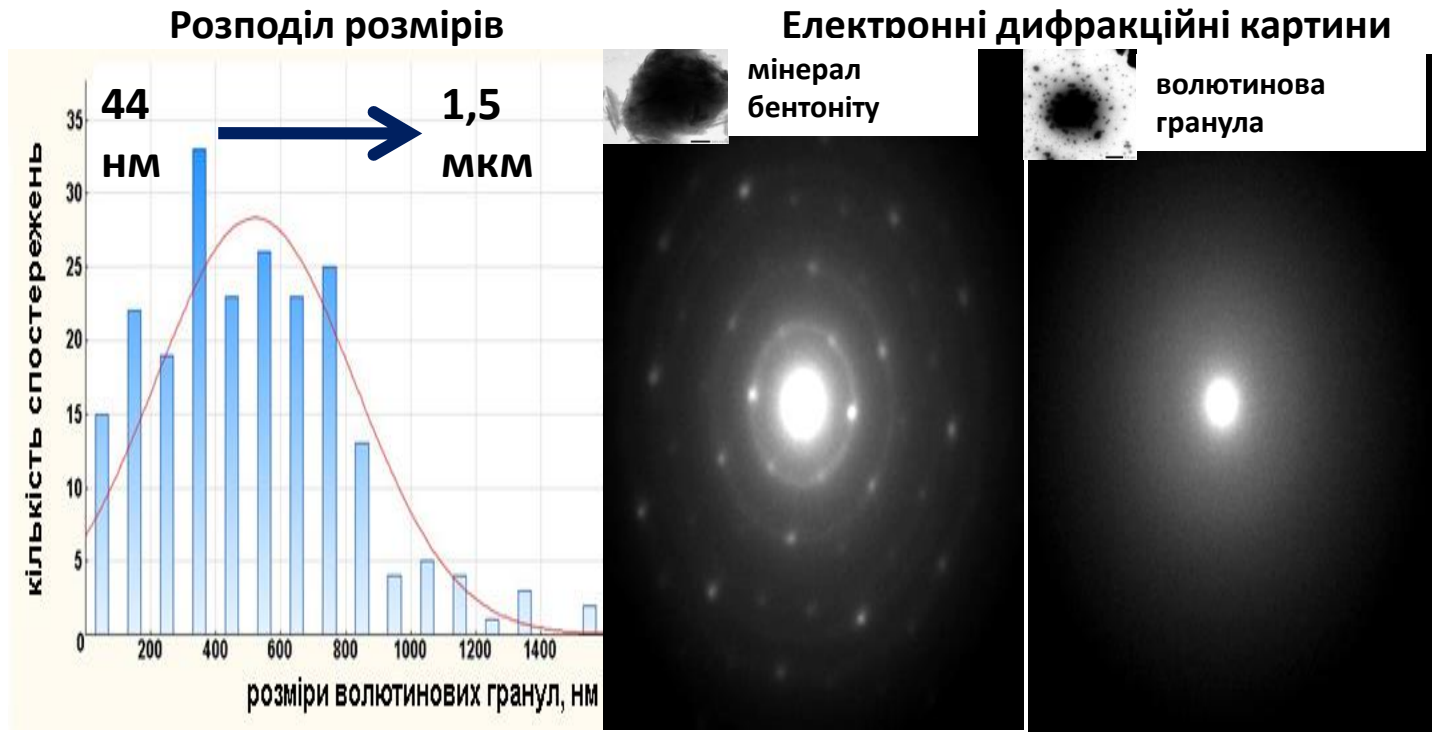
	Світлова	Люмінесцентна	Конфокальна	Електронна
Дифузний				
Гранулоподібний мембрано-асоційований				
Сферичний				
Паличкоподібний				



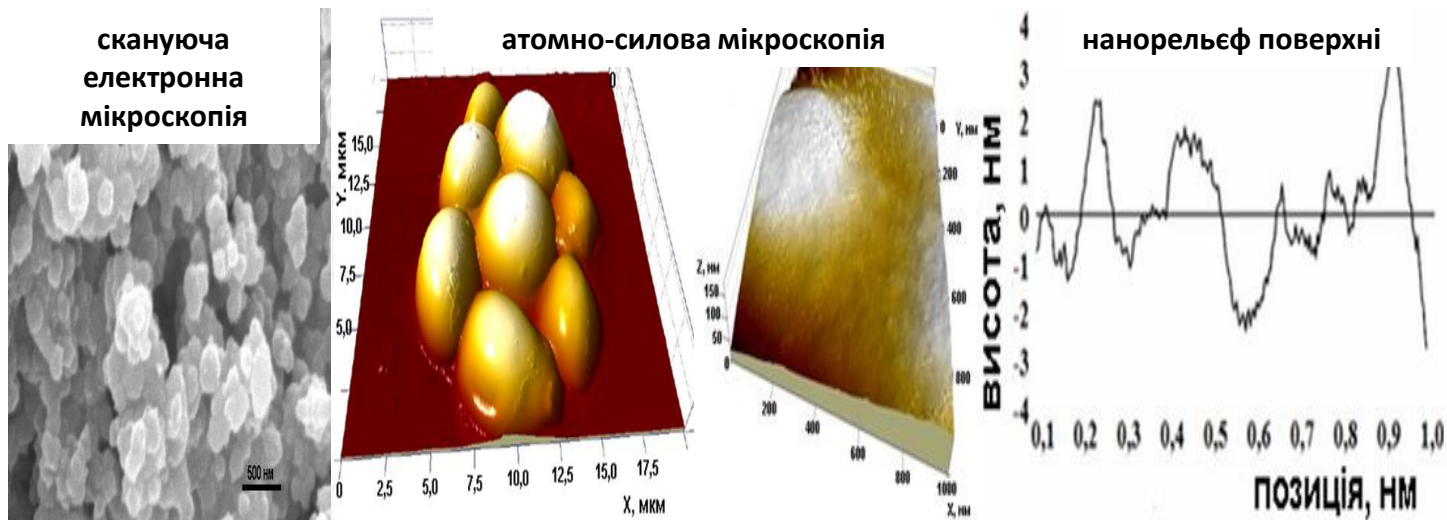
Форми волютину: ◆ Сферична ■ Гранулоподібна мембрано-асоційована ▲ Дифузна

Кореляційні зв'язки змін морфології

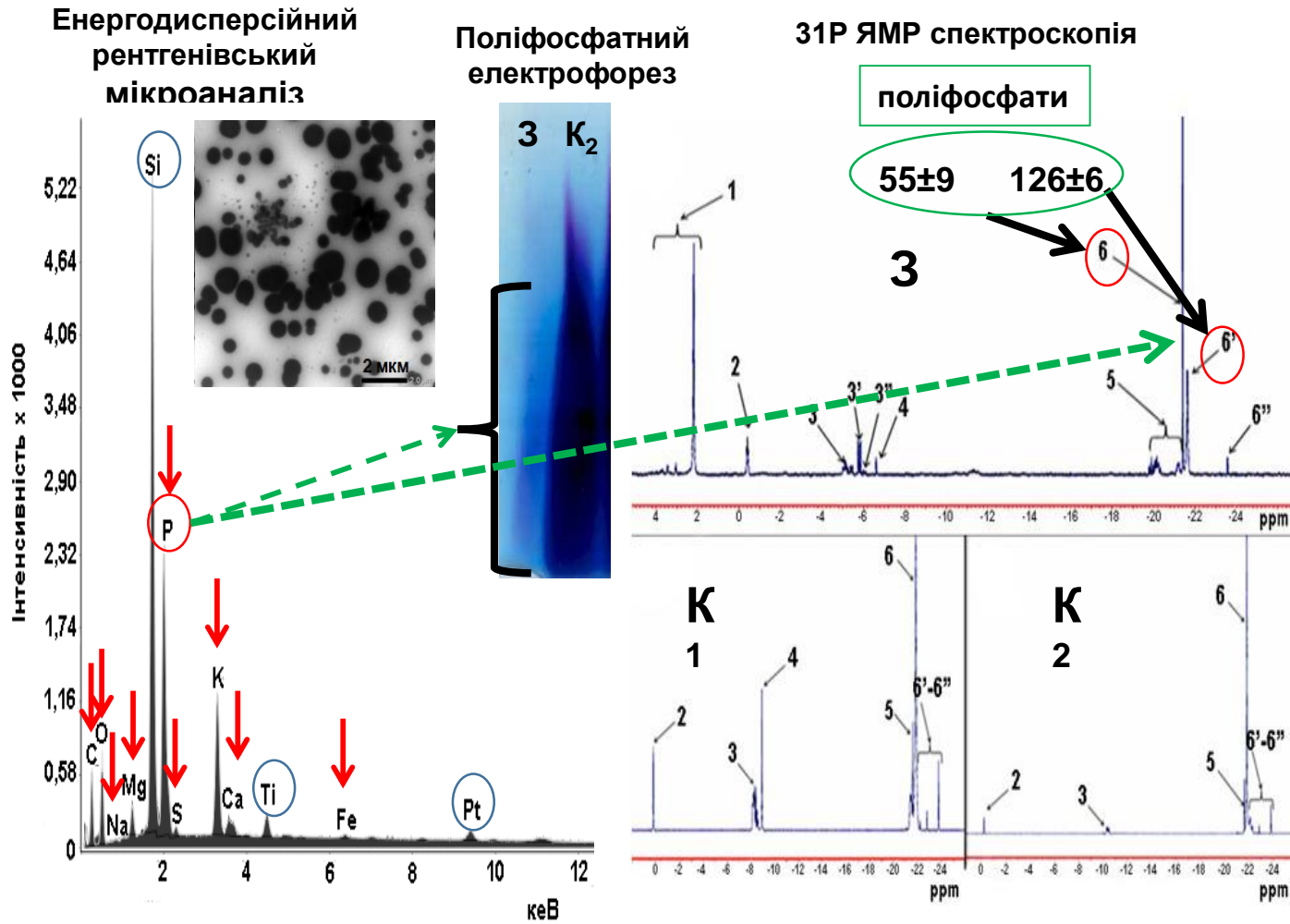




Загальний вигляд поверхні волютинової гранули



Поліфосфатний і катіонний склад волютинових гранул 12



Si, Ti і Pt – елементи підложки
 → Елементи препарату виділених волютинових гранул
K1 – контроль 1 (комерційний поліфосфат з довжиною ланцюга 12-18 фосфатних залишків)
K2 – контроль 2 (комерційний поліфосфат з довжиною ланцюга 200 фосфатних залишків)

3 – зразок
1 – монофосфати органічних сполук; **2** – ортофосфат; **3, 3' і 3''** – термінальні фосфатні групи поліфосфатів;
4 – пірофосфат; **5** – передтермінальні фосфатні групи поліфосфатів; **6, 6' і 6''** – внутрішні фосфатні групи поліфосфатів.

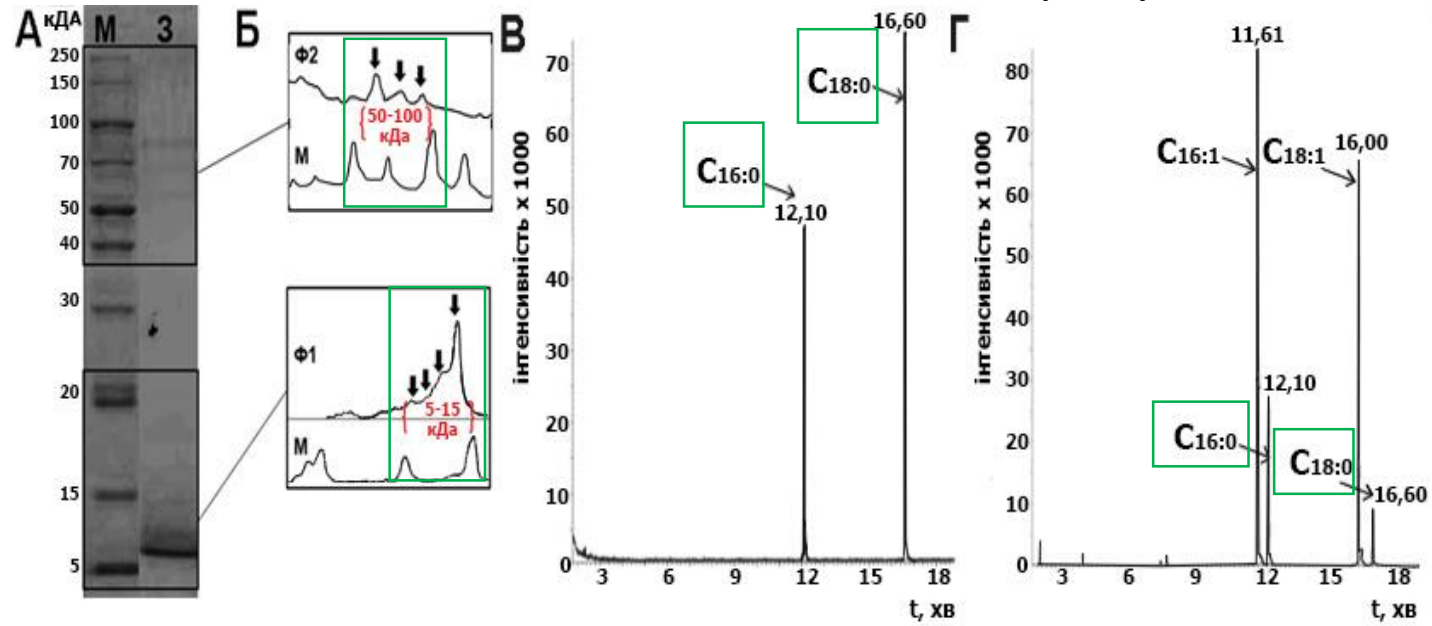
Органічні компоненти волютинових гранул

Білковий склад

Ліпідний склад

Білковий електрофорез і його фореграма

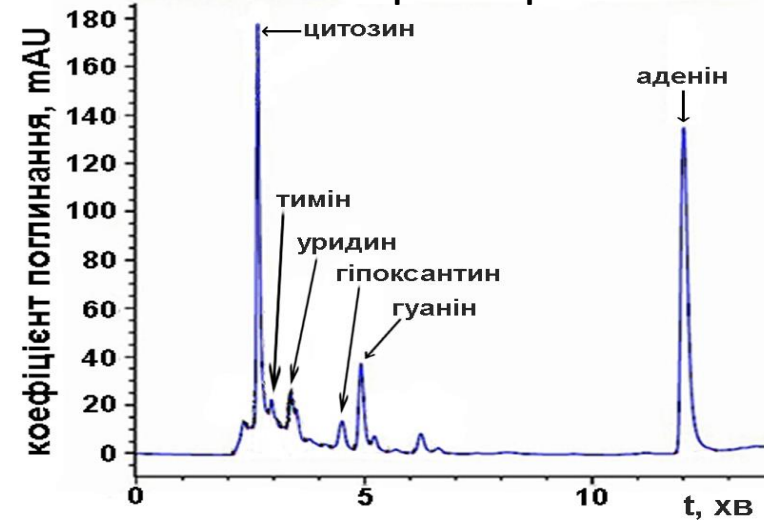
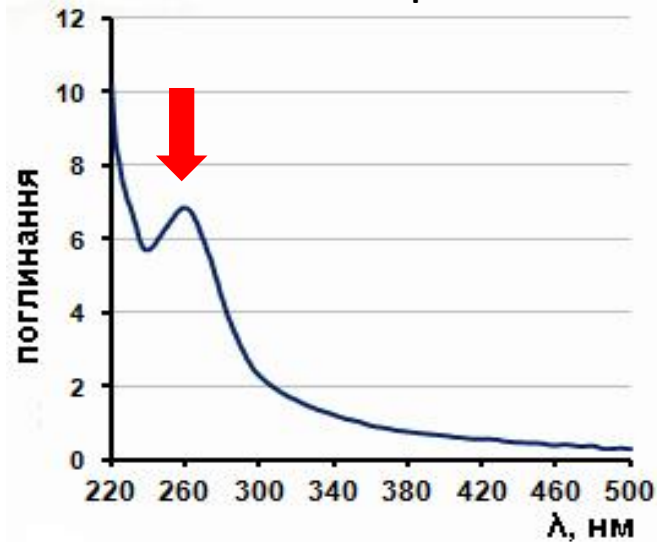
TIC-спектри жирних кислот



Нуклеотидний склад

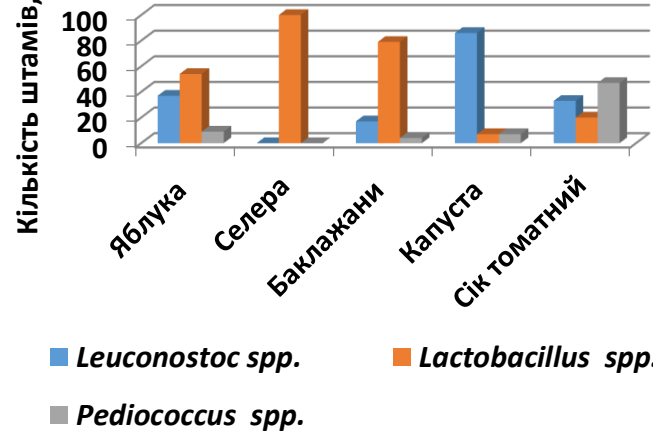
УФ-спектр

DAD-хроматограма

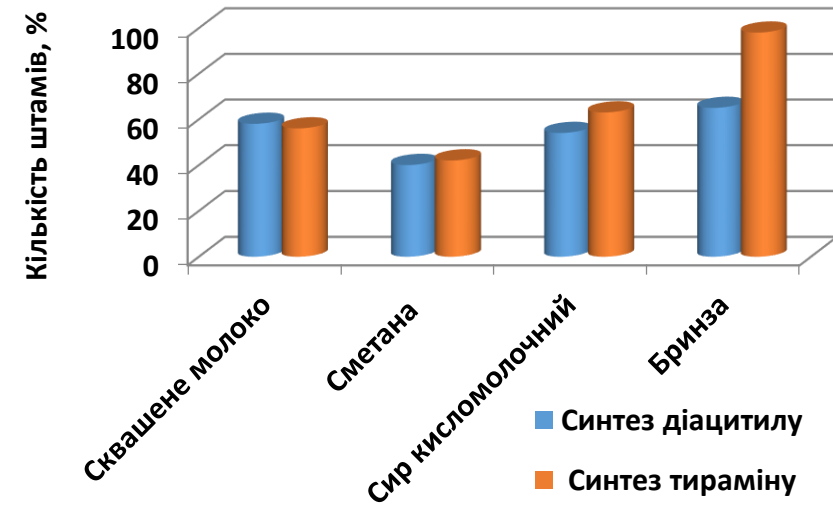


Властивості штамів молочнокислих бактерій, ізольовані з традиційних ферментованих продуктів України

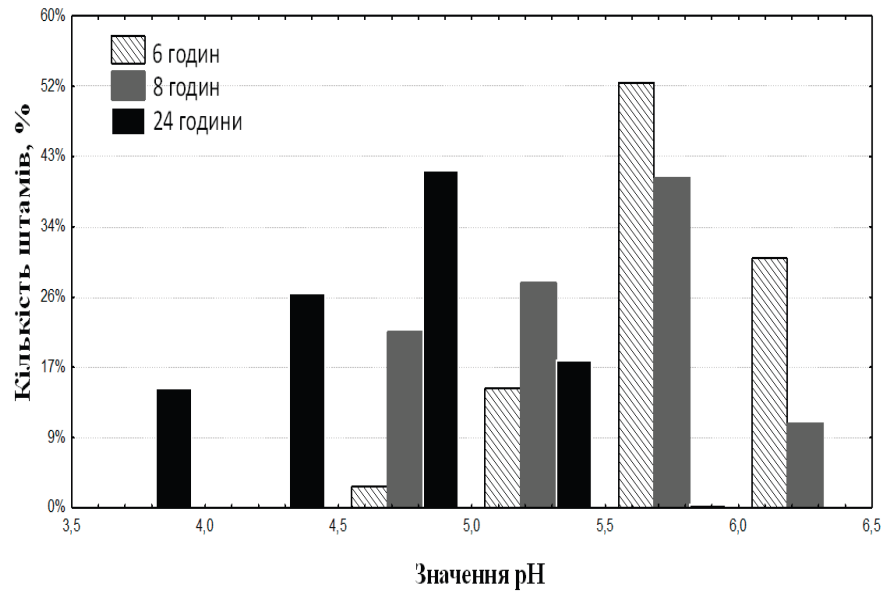
Штами молочнокислих бактерій, ізольовані з різних ферментованих продуктів рослинного походження



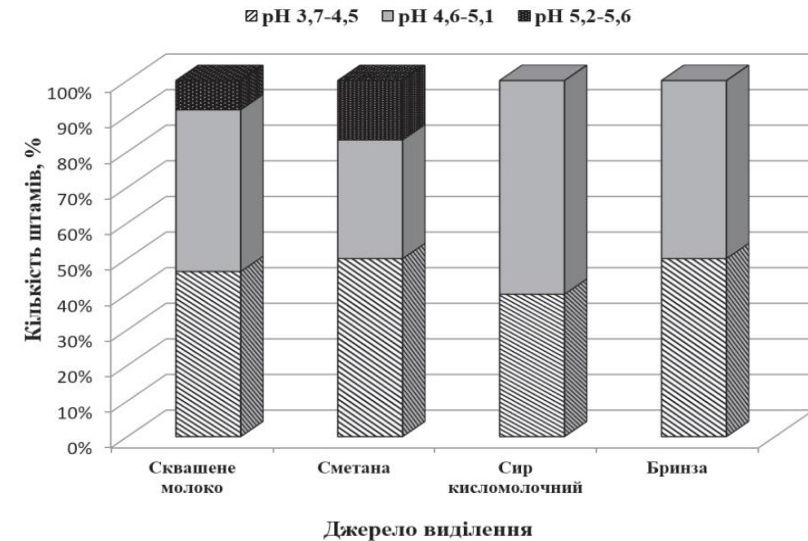
Синтез діацетилу і тираміну штамми *L. lactis* залежно від джерела виділення



Розподіл штамів лактококів за значенням рН при культивуванні в молоці через 6, 8 і 24 год.

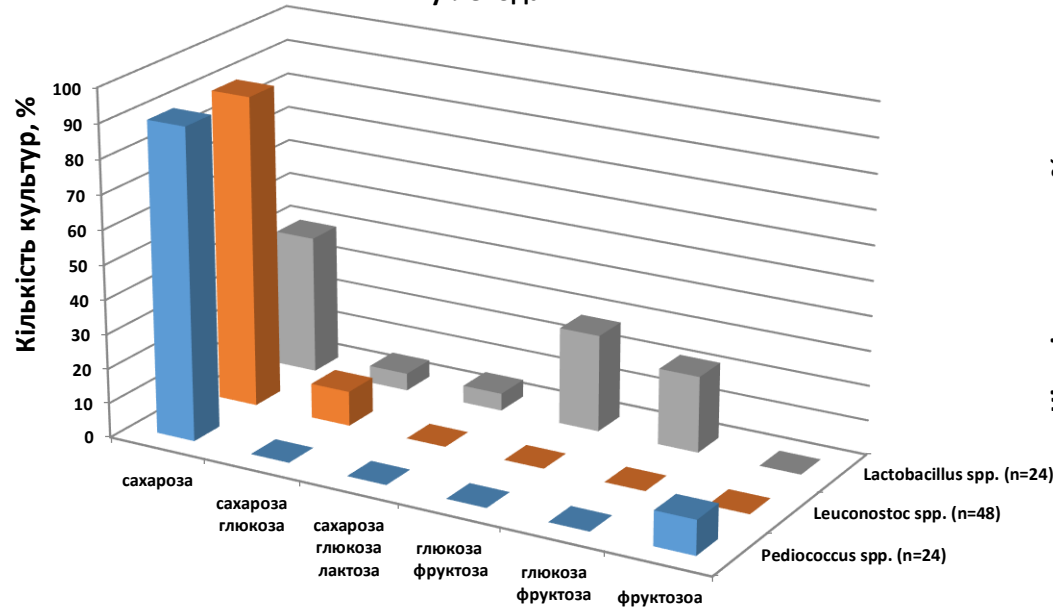


Розподіл штамів лактококів за рівнем кислотоутворення в молоці через 24 год залежно від джерела виділення



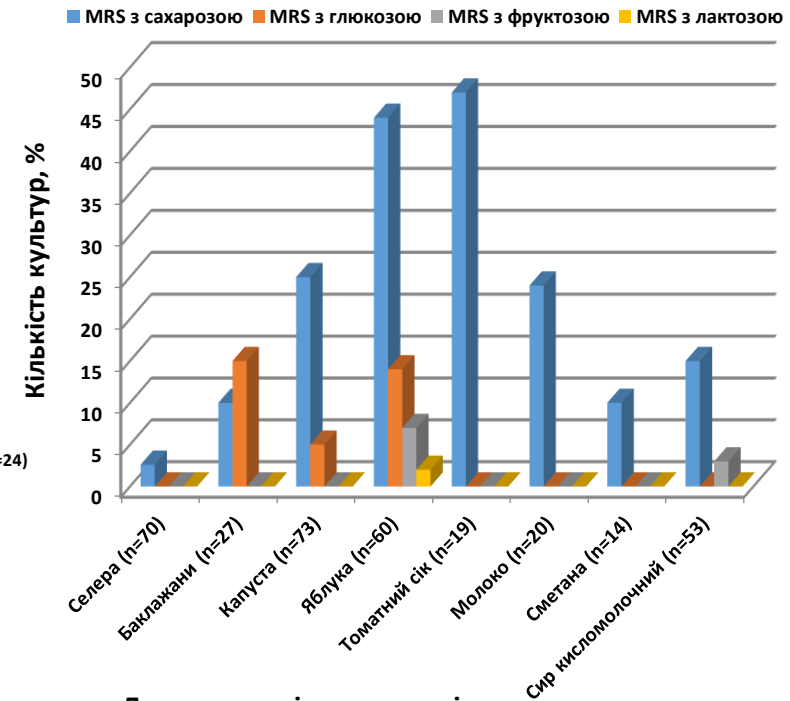
ПРОДУКЦІЯ ЕЗКОПОЛІСАХАРИДІВ ШТАМАМИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ФЕРМЕНТОВАНИХ ПРОДУКТІВ

Синтез екзополісахаридів штамми родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* і *Pediococcus* на середовищах MRS з різними вуглеводами

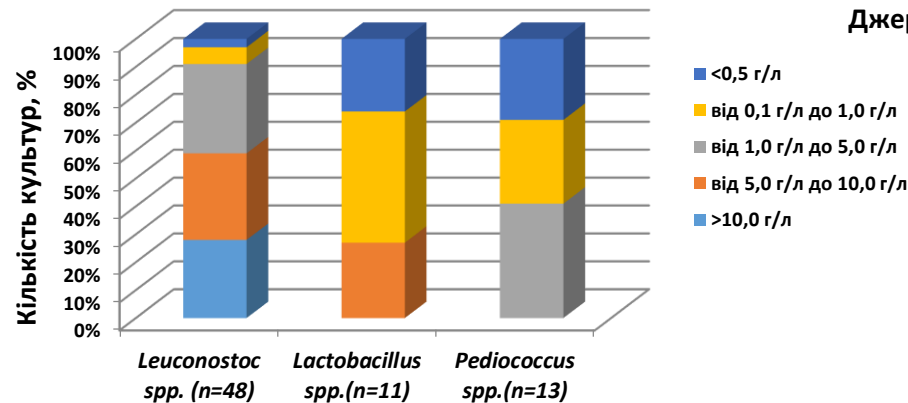


Середовищах MRS з вуглеводами

Частота виділення штамів МКБ, що продукують екзополісахариди, залежно від джерела виділення.



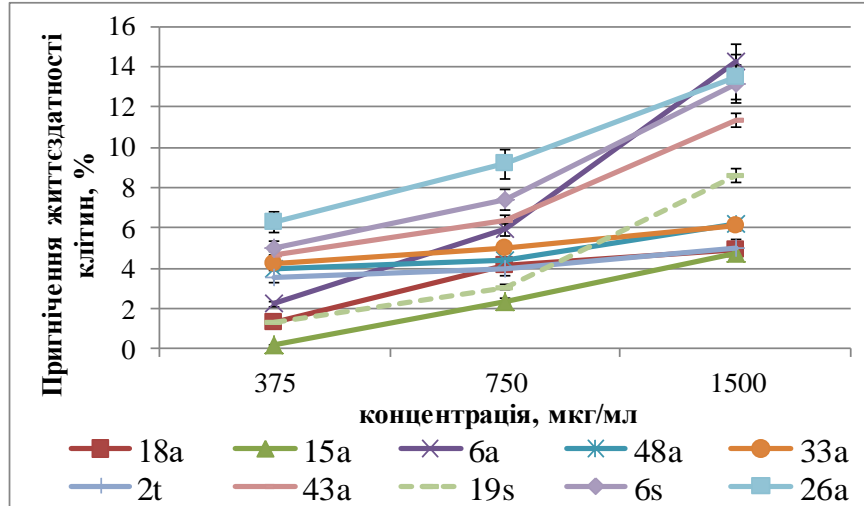
Джерело виділення штамів



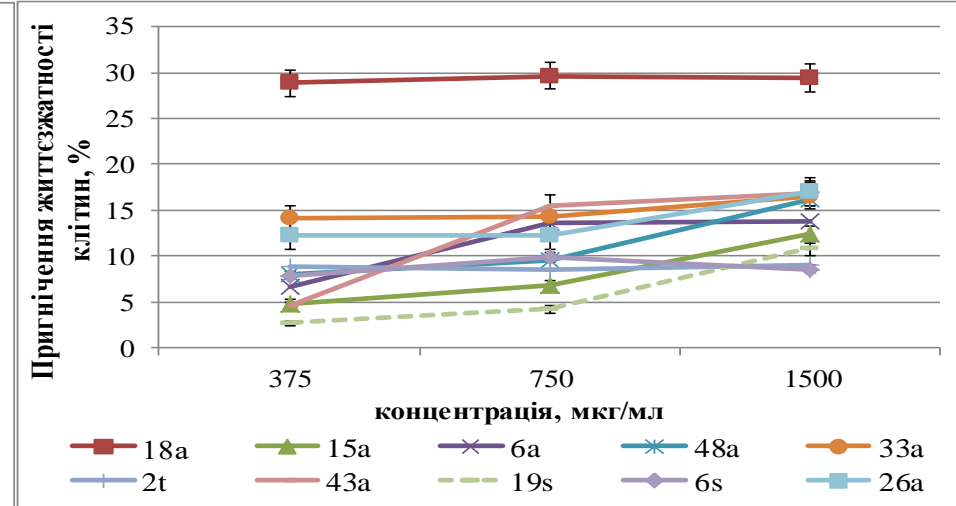
Розподіл штамів МКБ за кількістю екзополісахаридів, що продукуються на середовищі MRS з сахарозою

Цитотоксична дія екзополісахаридів для культур клітин MDBK (А) та ВНК-21 (Б)

А



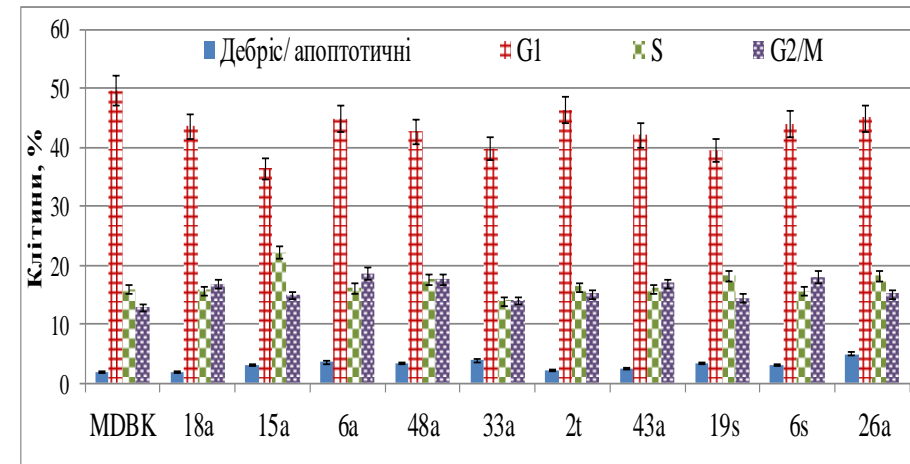
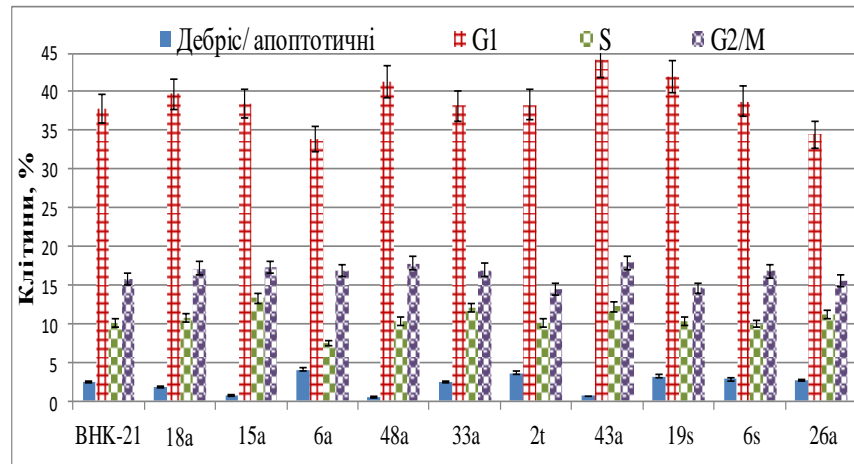
Б



Аналіз особливостей клітинного циклу культури клітин MDBK (А) та ВНК-21 (Б) за дії екзополісахаридів

Б

А



Перспективні пробіотичні штами

Чутливі до клінічно
важливих антибіотиків

Пригнічують ріст тест культур УПМ

Мають здатність до
формування біоплівки

L. plantarum 1047к
L. plantarum 691т

Адгезуються до клітин
букального епітелію

Стійкі до дії шлункового соку

Стійкі до дії лізоциму

Перспективні культури для ферментування овочів

Ріст при 2-8% NaCl

L. plantarum 47см
L. plantarum 952к

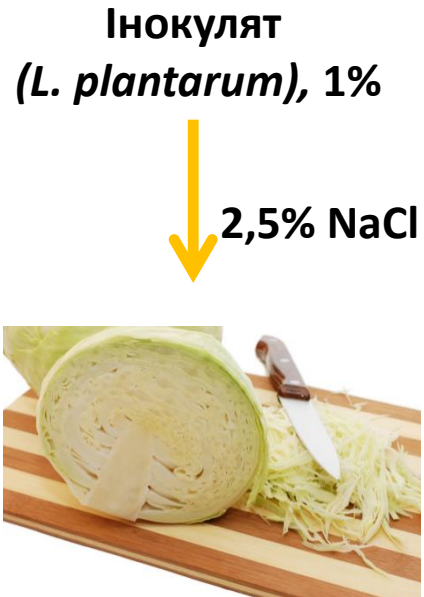
Ріст при 10⁰С-45⁰С

Не продукують біогенних амінів

Висока швидкість росту в
овочевих середовищах

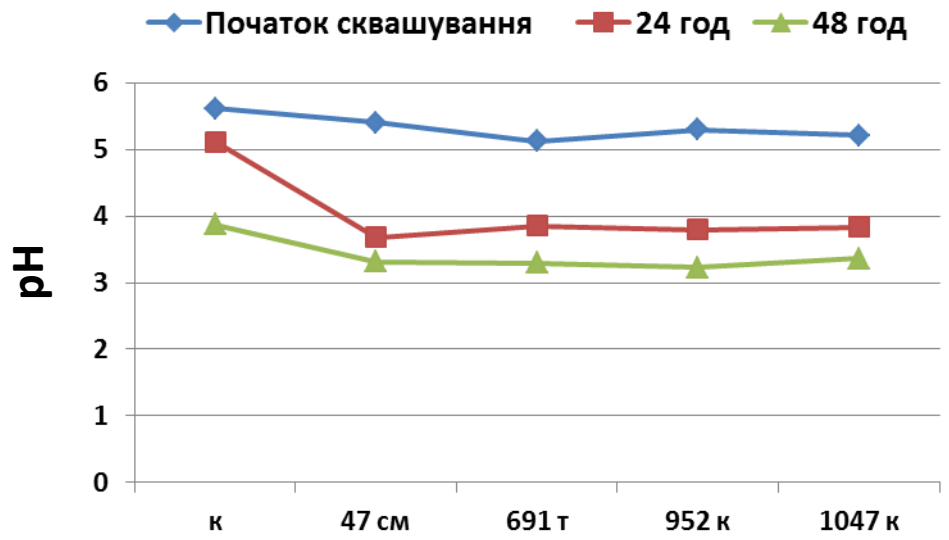
Пригнічують ріст фітопатогенних
мікроорганізмів

Заквашування капусти штамми *Lactobacillus plantarum*

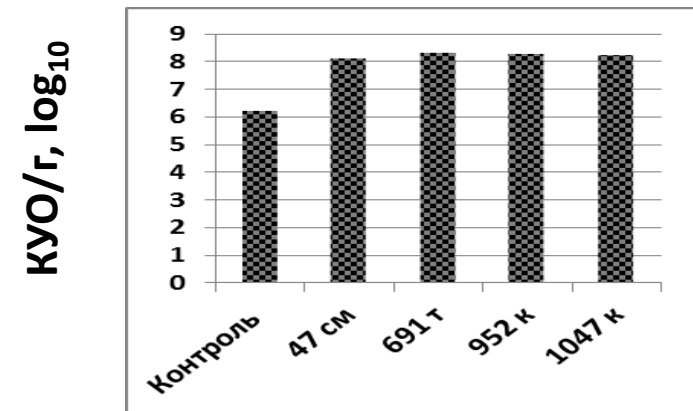


24 год, 37°C

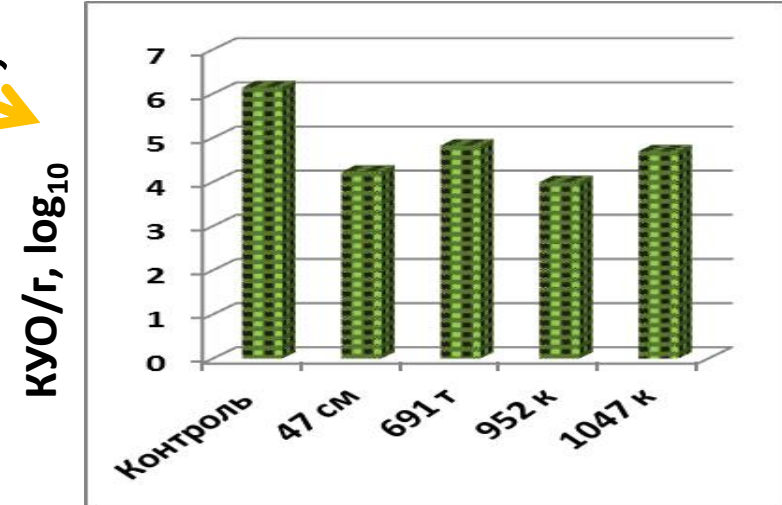
48 год, 37°C



Кількість МКБ



Стороння мікрофлора



1. Встановлено, що біополімер штаму *B. licheniformis* M20-Г є високомолекулярною γ -поліглутаміною кислотою з молекулярною масою більше 2 Мда, що синтезується в глибинних умовах штамом *B. licheniformis* M20-Г, в концентрації лише 0,5 мг/л проявляє високу флокулюючу активність, яка стабільна за рН 5–8 та температури 20-50°C.

2. Пігменти штамів *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 та IMB B-7525 представлені комплексом ліпідів та вуглеводів, належать до C_{30} -апокаротиноїдів, зокрема, апо-8'-фітофлуену, апо- ζ -8'-каротину, апо-8'-нейроспорину та апо-8'- β -каротен-3-олу. Їх синтез починається у другій половині експоненційної фази росту.

3. Штами *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 та IMB B-7525 відповідають вимогам щодо пробіотичних культур. Доцільно використовувати зазначені культури у композиції, оскільки вони доповнюють один одного за антагоністичною, ферментативною і провітамінною активністю, що суттєво розширює їх біологічну ефективність.

4. Біологічна ефективність композиції штамів (1:1) та кожного штаму окремо проявлялась у відновленні кількісного і якісного складу мікробіоти шлунково-кишкового тракту, збільшенні вмісту вітаміну А в печінці, активації перитонеальних макрофагів, відновленні мікроструктури тканин внутрішніх органів. **5.** Показано, що штамми молочнокислих бактерій, які були ізольовані з різних джерел є активними продуценти біологічно активних речовин. Частота виділення штамів-продуцентів екзополісахаридів залежала як від джерела виділення так і роду молочнокислих бактерій.

6. Встановлено, що біологічно активні речовини молочнокислих бактерій проявляють антивірусну активність. Використання екзополісахаридів сприяє нормалізації життєвого циклу клітин, що інфіковані вірусом простого герпесу до рівня неінфікованих клітин.

7. Показано ефективність використання штамів для швидкого та стандартизованого процесу заквашування овочів. Запропоновано штам *Lactobacillus plantarum*, що володіють антимікробними та антиоксидантними властивостями для заквашування овочевої сировини.

8. Співвідношення морфологічних типів волютину залежить від стадії росту культури та умов культивування і пов'язана з забезпеченням клітин фосфором.

9. Виділені волютинові гранули є твердими аморфними структурами, які мають гладку гідрофобну поверхню. Їх розмір коливається у широкому діапазоні від 44 нм до 1,5 мкм. Підтверджено, що до складу волютинових гранул дріжджів входять: неорганічні поліфосфати, катіони металів і білки. Вперше виявлено наявність двох фракцій поліфосфатів з середньою довжиною ланцюга 55 ± 9 і 126 ± 6 фосфатних залишків, білкової фракції з молекулярною масою 50-100 кДа і ліпідів з насиченими жирними кислотами з довжиною ланцюга 16 і 18 атомів карбону.

10. Рухливість волютинових гранул є ритмічною і має біологічну природу, оскільки притаманна тільки живим клітинам, високочутлива до фізико-хімічних факторів середовища, залежить від фізіологічного стану клітини та безпосередньо пов'язана з фосфорним метаболізмом.

11. Прояв реакції метахромазії *in vitro* залежить від кількості і довжини ланцюга поліфосфатів, а також від співвідношення концентрації цих полімерів та іонів Ca^{2+} . Встановлено індикаторну роль реакції метахромазії волютинових гранул на стресову дію як умов культивування, так і факторів космічної погоди.

12. Запропоновані гіпотетичні схеми переходів морфологічних типів волютинових гранул, їх компонентного складу та механізму рухливості. Вперше показано етапи формування і деградації волютинових гранул в умовах різного забезпечення дріжджових клітин фосфором. Представлена структура дріжджового волютину, яка відрізняється від відомої в літературі бактеріальної моделі наявністю ліпідного шару на поверхні гранули. Вперше розглянуто явище “dancing bodies” як результат внутрішньоклітинних механо-хімічних перетворень.

Кількість публікацій: 53, в т.ч. за тематикою роботи 34 статі (4 – у зарубіжних виданнях із IF), 12 тез доповідей. Загальна кількість посилань на публікації авторів/h-індекс роботи згідно баз даних складає відповідно: Scopus – 14/4; Google Scholar – 59/8. Отримано 7 патентів України на корисну модель.