

УДК 579.66

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ IN SILICO ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ БАКТЕРИЙ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА КСАНТАНА

А.М. Киреева¹, А.Е. Барашков¹, И.А. Николаев¹, Н.Т. Жилинская^{1,2}

¹*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,*

²*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова
Санкт-Петербург, Россия*

Внеклеточный гетерополисахарид ксантан, синтезируемый бактериями рода *Xanthomonas*, широко используется в качестве загустителя и стабилизатора в пищевой, косметической и фармацевтической отраслях, в нефтяной промышленности. Изучение in silico бактериальных ферментов, принимающих участие в производстве целевого биотехнологического продукта, актуальным направлением исследований. Решением данной задачи является использование специализированных компьютерных программ в сети интернет, таких как база данных последовательностей белков UniProt, комплексная информационная система по ферментам BRENDA. Анализ баз данных показал, что фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза инициирует биосинтез ксантана бактериями *Xanthomonas campestris*. Подобраны условия культивирования в биореакторе Biosan бактерий *Xanthomonas campestris*, предоставленных из Ведомственной коллекции культур полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Можно предположить, что возрастание активность фермента инициации биосинтеза ксантана бактериями *Xanthomonas campestris* начнется после 65 часов с момента начала культивирования бактерий на дрожжевой питательной среде, при температуре 30°C, после перехода кривой роста микроорганизмов в стационарную фазу.

Ключевые слова: ксантан, *Xanthomonas campestris*, фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза, культивирование

Введение

В настоящее время в промышленности широко используются культурные штаммы микроорганизмы. Это объясняется тем, что благодаря большому разнообразию синтезируемых ферментов микроорганизмы более эффективны и экономичны, чем химические реагенты. Из разнообразия культурных штаммов микроорганизмов выделяют микроорганизмы, синтезирующие целевые полисахариды. Полисахариды микробного происхождения обладают нетоксичными, биосовместимыми, биоразлагаемыми и биоадгезивными свойствами [6, с.27103].

Внеклеточный гетерополисахарид ксантан синтезируется бактериями рода *Xanthomonas*. Бактерии рода *Xanthomonas* относятся к семейству *Pseudomonaceae*, типу *Proteobacteria*, классу *Alphaproteobacteria*. Род *Xanthomonas* включает такие виды, как *X. campestris*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. fragaria*, *X. gummisudans*, *X. juglandis*, *X. phaseoli*, *X. vasculorum* et al. В промышленном производстве используется бактерия *Xanthomonas campestris*.

Благодаря способности сгущать водные растворы, служить в качестве диспергирующего агента, стабилизировать эмульсии и суспензии ксантан нашел применение в производстве фармацевтических, косметических и пищевых продуктов, а также текстильных и керамических изделий. Ксантановая камедь была одобрена FDA (Управление по контролю за продуктами и лекарствами) для применения в пищевых продуктах и фармацевтической продукции в 1968 году [5, с.95]. С тех пор интерес к этому биополимеру только растет, поскольку его характеристики очень привлекательны для промышленности по сравнению с другими

материалами, представленными на рынке. Также ксантан может быть использован в качестве эмульгирующего и стабилизирующего агента в таких продуктах, как лосьоны, шампуни, дезодоранты, кремы для лица, тела, увлажнители для лица и т.д. [4, с.2]. Ксантан также может использоваться как заменитель агара в средах для культур тканей растений и культур микроорганизмов, в фармацевтической промышленности для получения лекарственных форм препаратов, вакцин. Проводятся исследования по применению микросфер и гидрогелей на основе ксантановой камеди, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты омега-3, в таргетной терапии при онкологических заболеваниях, в частности, для их целенаправленного высвобождения в колоректальный канал при раке толстой кишки [7, с.432].

С целью расширения спектра использования ксантан подвергают модификации. Модифицированный продукт может найти широкое применение для очистки сточных вод от металлов (особенно тяжелых). Он может быть использован для адсорбции органических красителей и тяжелых металлов [3, с.1134]. Также на данный момент ксантановая камедь используется в производстве безглютенового хлеба для придания воздушной текстуры.

В настоящее время в Российской Федерации ксантановая камедь в промышленных масштабах не производится. Были неоднократные попытки создания производств в разных регионах страны [1, с.95]. Основной проблемой, которая возникает при промышленном синтезе ксантана, является то, что продуцент имеет повышенную требовательность к составу питательных сред, в связи с чем повышается стоимость итогового продукта.

Большую роль в процессе биосинтеза ксантана играют соотношение углерода и азота в питательной среде, а также сам источник азота [2, с.105]. В состав питательной среды для производства ксантана обязательно должны входить источники углерода, азота, фосфора, микроэлементы и биологически активные соединения. Среды для культивирования бактерий *Xanthomonas campestris*, удовлетворяющие этим требованиям, отличаются друг от друга происхождением и сочетанием компонентов, входящих в их состав. В качестве источника углерода могут быть использованы: глюкоза, фруктоза, мальтоза, сахароза, галактоза, сахар-сырец, крахмал, меласса [2, с.107]. Для получения ксантана чаще всего используются среды сложного состава, включающие, в основном, 2–4 % глюкозы и сахарозы, 0,05–0,1 % источников азота, таких как дрожжевой экстракт, пептон, нитрат аммония, имеющие достаточно высокую стоимость.

Бактерии рода *Xanthomonas* не растут на средах, содержащих сорбит, инозитол, целлобиозу, адинитол, глицерин, дульцитол и маннит. Оптимальная температура для роста 30 °С. Исследования показали, что питательные среды, содержащие сахарозу, показывали максимальный прирост биомассы. Следующими по эффективности являются мальтоза, лактоза, декстроза и фруктоза (в порядке убывания). Изучение *in silico* бактериальных ферментов, принимающих участие в производстве целевого биотехнологического продукта, является актуальным направлением исследований. Решением данной задачи является использование баз данных и программ в сети интернет. Комплексная информационная система по ферментам BRENDA позволяет получить информацию об организме, из которого был выделен фермент, его номенклатуре, катализируемых реакциях, его каталитической активности, активаторах и ингибиторах. База данных последовательностей белков UniProt содержит информацию о нуклеотидной последовательности белка, его 3D-структуре, массе, местоположении и роли важных доменов и сайтов. Эти программы взаимосвязаны и имеют перекрестные ссылки.

Цель исследования - изучение *in silico* ферментного состава бактерий *Xanthomonas campestris*, инициирующих биосинтеза ксантана, оценка влияния времени и температуры культивирования на активность роста бактерий.

Материалы и методы исследований

Для анализа состава белков и ферментативной активности *Xanthomonas campestris* использовались следующие on-line программы: информационная система по ферментам Brenda, база данных последовательностей белков UniProt.

Для культивирования бактерий *Xanthomonas campestris* приготовили дрожжевую питательную среду следующего состава: сахароза - 10 г/л; дрожжевой экстракт - 2 г/л; CaCO₃ - 3 г/л. В исследовании использован штамм бактерии *Xanthomonas campestris* из Ведомственной коллекции культур полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, г.Пушкин, Санкт-Петербург).

Культивирование бактерий *Xanthomonas campestris* проводили в персональном биореакторе Biosan RTS-1. Принцип работы биореактора основан на неинвазивном, механически управляемом перемешивании, во время которого клеточная суспензия смешивается вращением биореактора вокруг своей оси с изменением направления вращения, что приводит к перемешиванию и оксигенации для аэробного культивирования. В сочетании с ближней ИК оптической системой можно регистрировать кинетику роста клеток неинвазивно в реальном времени. Процесс культивирования осуществляли на дрожжевой среде глубинным способом при температуре 30 °С и скорости перемешивания 60 об/мин. Накопление биомассы культуры фиксировали по приросту оптической плотности культуральной среды с интервалом в каждые 30 мин при длине волны 850 нм.

Результаты исследований и их обсуждение

Изучение базы данных Uni Prot показало, что в белковый состав клеток *Xanthomonas campestris* *pv.* *campestris* входит, наряду с другими ферментами, фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза (UDP-glucose:undecaprenyl-phosphate glucose-1-phosphate transferase), который является иницирующим ферментом синтеза экзополисахарида ксантан (рис.1). Этот фермент проявляет каталитическую активность к следующим субстратам: ди-транс, окта-цис-ундекапренилфосфат; УДФ- α -D-глюкоза; α -D-глюкозилди-транс, окта-цис-ундекапренилдифосфат; УМФ. Фермент расположен на внутренней клеточной мембране бактерии. Номенклатурный номер (ЕС) 2.7.8.31.

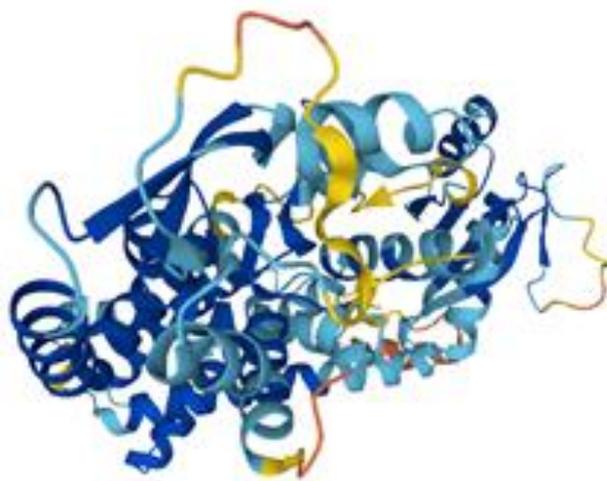


Рисунок 1. Структура УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансферазы [Uni Prot, 2024]

Механизм инициации синтеза ксантана состоит в следующих этапах. Фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза (2.7.8.31) является иницирующим ферментом для синтеза экзополисахарида ксантана (рисунок 2). Катализирует перенос молекулы глюкозо-1-фосфат из UDP-Glc на липид-носитель ундекапренилфосфат (C55-P) с образованием фосфоангидридной связи, приводящей к глюкозил-пирофосфорил-ундекапренолу (Glc-PP-C55). Схема биосинтеза ксантана представлена на рисунке 2:

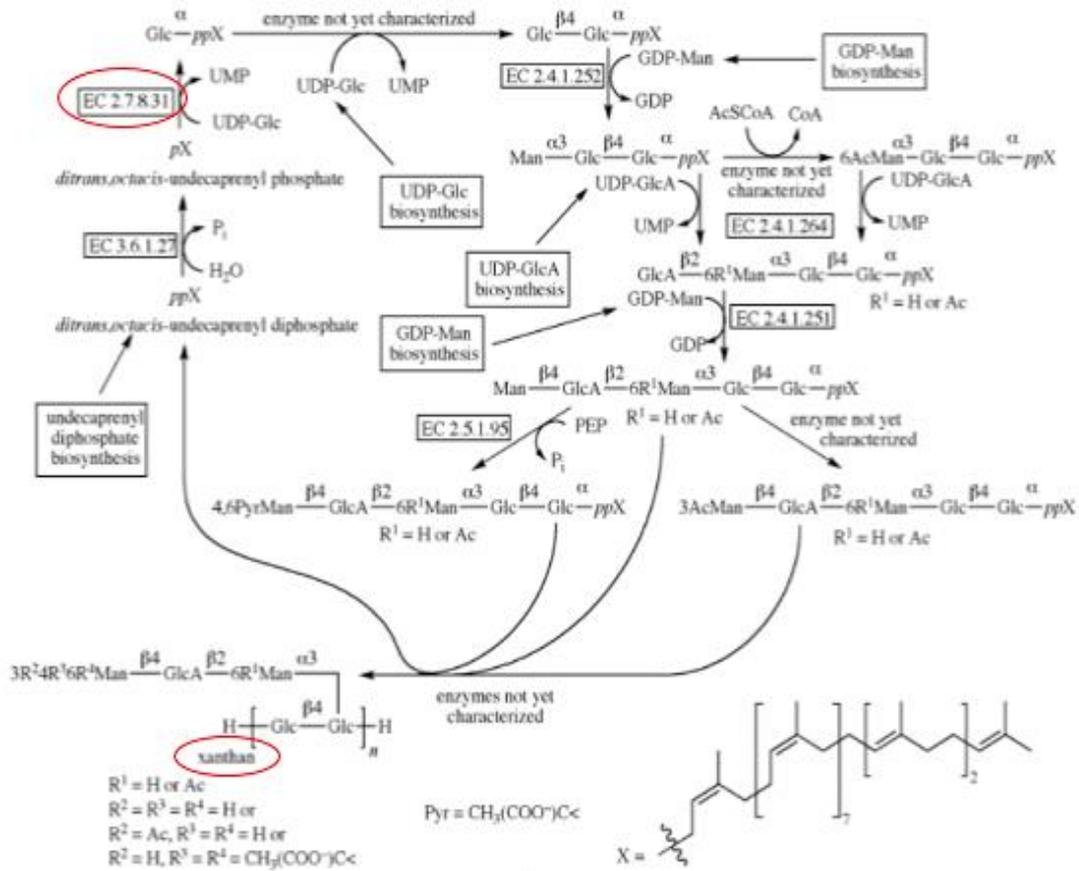


Рисунок 2. Схема биосинтеза ксантана [Brenda, 2024]. EC 2.7.8.31 - номенклатурный номер фермента, УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза; xanthan – ксантан

Для прогнозирования условий активирования ферментативной активности бактерий *Xanthomonas campestris* проведено культивирование штамма на дрожжевой среде, при температуре 30°C, в биореакторе Biosan RTS-1 (рис. 3). Увеличение оптической плотности суспензии бактерий показало, что стационарная фаза в ходе культивирования *Xanthomonas campestris* на дрожжевой среде наступает на 65 час культивирования.

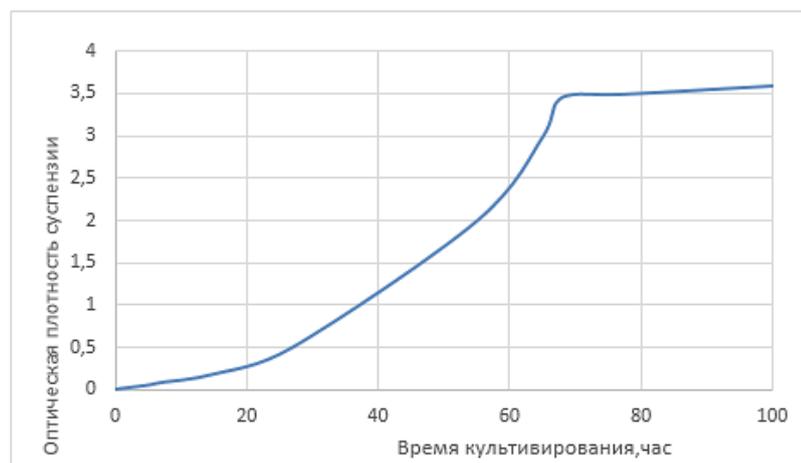


Рисунок 3. Кривая роста бактерий *Xanthomonas campestris*

Заключение

Изучение компьютерных баз данных Brenda и Uni Prot показало, что для инициации биосинтеза ксантана бактерии *Xanthomonas campestris* используют мембранный фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансферазу. Можно предположить, что возрастание активности фермента инициации биосинтеза ксантана бактериями *Xanthomonas campestris* начнется после 65 часов с момента начала культивирования бактерий на дрожжевой питательной среде, используемой в данном эксперименте, при температуре 30°C, после перехода кривой роста микроорганизмов в стационарную фазу.

Библиографический список

1. Осоковская И.И. Синтез и свойства модифицированной ксантановой камеди / И.И. Осоковская, А.М. Бородина, А.В. Курзин [и др.] // Химия растительного сырья. – 2021. – № 4. – С. 95-104.
2. Хисаметдинов М.Р. Влияние состава питательной среды на рост культуры *Xanthomonas campestris* и синтез экзополисахарида ксантана / М.Р. Хисаметдинов, В.С. Гамаюрова, Р.Р. Сагдеева [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2009. – № 2. – С. 104-110.
3. Alharthi F.A., Alshammari R.H., Hasan I. Synthesis of Xanthan Gum Anchored α -Fe₂O₃ Bionanocomposite Material for Remediation of Pb (II) Contaminated Aquatic System // Polymers. – 2023. – Vol. 15. – № 5. – P. 1134.
4. Furtado I.F. Xanthan gum: applications, challenges, and advantages of this asset of biotechnological origin / I.F. Furtado, E.B. Sydney, S.A. Rodrigues et al. // Biotechnology Research and Innovation Journal. – 2022. – Vol. 6, № 1. – P. 1-10.
5. Jindal N., Khattar J.S. Microbial polysaccharides in food industry // Biopolymers for food design. – Academic Press, 2018. – P. 95-123.
6. Patel J. Xanthan gum derivatives: Review of synthesis, properties and diverse applications / J. Patel, B. Maji, N.S.H.N. Moorthy et al. // RSC advances. – 2020. – Vol. 10, № 45. – P. 27103-27136.
7. Trombinoa Sonia, Serinib Simona, Cassanoa Roberta, Calviello Gabriella. Xanthan gum-based materials for omega-3 PUFA delivery: Preparation, characterization and antineoplastic activity evaluation // Carbohydrate Polymers, Volume 208, 2019, p. 431-440.