

РЕФЕРАТ РОБОТИ

«МЕТАБОЛІТИ БАКТЕРІЙ ТА ДРІЖДЖІВ ТА ЇХ ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ»

виконаної колективом авторів у складі:
к.б.н., зав. лабораторії Хархоти Максима Андрійовича
к.б.н., м.н.с. Харчука Максима Сергійовича
к.б.н., н.с. Василюк Ольги Миколаївни
м.н.с. Лагутіної Ольги Сергіївни

Актуальність теми: Мікроорганізми здатні синтезувати різноманітні метаболіти, значна частина яких використовується в промисловості та сільському господарству. 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, встановлення природи певних груп екзометаболітів і їх ролі у прояві біологічної активності штамів продуцентів.

Бактерії роду *Bacillus* здатні до синтезу ряду біологічно активних екзометаболітів: ферментів, пігментів, сидерофорів, полісахаридів, поліамінів тощо. Завдяки цим властивостям, непатогенності для теплокровних і технологічності при культивуванні штамів-продуценти можуть бути використані при створенні на їх основі чи на основі їх екзометаболітів пробіотиків та пребіотиків, препаратів для очистки питної та стічної вод, препаратів з детоксуючою, імуностимулювальною та протипухлинною активностями, засобів біологічного контролю захворювань рослин тощо.

Молочнокислі бактерії належать до групи широко поширених в оточуючому середовищі мікроорганізмів, а також є важливою складовою нормобіоти людини. Вони продукують ряд метаболітів різної природи, що володіють антимікробною, антиоксидантною та антивірусною активностями. Дані мікроорганізми є основою ефективних та екологічно безпечних мікробіологічних препаратів для широкого застосування.

Ферментовані продукти рослинного та тваринного походження, що виготовлені шляхом спонтанного бродіння, займають важливе місце в раціоні харчування людини, і саме тому, багато уваги науковцями приділяється вивченню їх індигенної мікрофлори - представників групи молочнокислих бактерій. На сьогоднішній день дані про видовий склад молочнокислих бактерій у ферментованих продуктах, що широко використовуються на території України поодинокі. Дослідження лактобацил з традиційних для України ферментованих продуктів має як фундаментальне,

так і прикладне значення, оскільки оцінка біологічної активності видового складу дає змогу відібрати штами МКБ, на основі яких створюються комерційні заквасочні композиції.

Незважаючи на ряд робіт, що присвячено дослідженню біологічної активності бацил та лактобацил, їх екзополімери – одна з найменш досліджених груп метаболітів. Поліглутамінова кислота – природній полімер мікробного походження, перспективний для використання у різних галузях промисловості, завдяки своїй високій розчинності, безпечності та біодеградабельності. Тому для одержання поліглутамінової кислоти у виробничих масштабах широко використовують бактерії таких видів: *B. licheniformis* та *B. subtilis*. Фізико-хімічні властивості поліглутамінової кислоти дозволили розробити ряд препаратів для медицини, ветеринарії, харчової промисловості, косметології, тощо.

Синтез молочнокислими бактеріями екзополісахаридів надає унікальних фізичних та реологічних властивостей, які зумовлюють їх використання у харчовій промисловості як в'язучих, стабілізуювальних, гелеутворювальних агентів, особливо при виробництві кисломолочних продуктів. Значну увагу сфокусовано на дослідженні біологічної активності екзополісахаридів. Зокрема показано, що вони володіють імуностимулювальною, антивірусною, протипухлинною та антиоксидантною активностями. Штами, що продукують ЕПС у великій кількості, є цікавими з точки зору їх використання як для покращення реологічних властивостей продукту, так і для можливого оздоровчого впливу на організм людини.

Іншим актуальним напрямом сучасної біології є дослідження структурних компонентів клітини, серед яких певне місце займають волютинові гранули. Незважаючи на давню історію відкриття волютину, багато питань щодо його генезису, рухливості (“dancing bodies”), причин варіабельності метахроматичного забарвлення, а головне – функції у клітині, залишаються маловивченими. Наявність у складі волютинових гранул значного вмісту фосфору у вигляді неорганічних поліфосфатів дозволила віднести їх до запасних структур. Але сучасні дослідження щодо участі волютину у процесах рН-гомеостазу, іонному обміні та можливих стресових реакціях дозволяє припустити його більш важливу роль в клітині. Це може бути обумовлено поліфункціональністю неорганічних поліфосфатів, які беруть участь у багатьох біологічних процесах: від транспорту іонів до утворення АТФ та регуляції експресії генів. Поліфосфатвмісні гранули виявлені у організмів усіх ланок біологічної еволюції.

Кількість робіт з дослідження структури, компонентного складу, особливостей функціонування волютинових гранул є малочисельною та стосується бактерій. Незважаючи на те, що дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є загальноприйнятою моделлю при вивченні еукаріотичних клітин, відомості про їх волютинові гранули є поодинокими. Сучасні дослідники звертають увагу на ці поліфосфатвмісні структури через їх роль у процесах очистки стічних вод від надлишку фосфору і катіонів токсичних металів, в явищі вірулентності патогенних бактерій, тромбоутворенні і фібринолізі, онкогенезі

тощо. Таким чином, дослідження волютинових гранул не втратило своєї актуальності в наш час і має як фундаментальне, так і практичне значення.

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

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

- Встановити природу пігментів досліджуваних штамів бактерій роду *Bacillus*.

- Визначити закономірності росту та утворення каротиноїдів штамми *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-7525 в умовах глибинного культивування.

- Дослідити пробіотичні властивості штамів *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-7525. Встановити ефективність каротинсинтезувальних штамів *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-7525 у дослідах *in vivo*.

- Провести скринінг штамів бактерій роду *Bacillus*, здатних до синтезу екзополімерних речовин поліамінної природи.

- Виділити, очистити та встановити фізико-хімічні властивості γ -поліглутамінової кислоти, що синтезується бактерій роду *Bacillus*.

- Провести пошук штамів МКБ, що продукують біологічно активні речовини серед ізолятів з традиційних ферментованих продуктів рослинного та тваринного походження;

- Оцінити антивірусну активність метаболітів молочнокислих бактерій.

- Дослідити антимікробну та антиоксидантну активності бактерій роду *Lactobacillus*.

- Вивчити основні промислово важливі ознаки штамів МКБ 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.

Авторами встановлено, що бактерій роду *Bacillus* синтезують пігменти жовтого та червоного кольорів, що мають каротиноїдну природу, основним представником яких є апо-8'- β -каротен-3-ол. Показано, що каротинсинтезувальні культури *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-

7525 володіють пробіотичними властивостями. Досліджено, що штам *B. licheniformis* M20g продукує високі рівні екзополімерних речовин, (в т.ч. γ -поліглутамінову кислоту). Ряд штамів *B. subtilis* синтезують сидерофорні речовини катехолатного типу: моно-, ди- та тримери дигідроксибензоїл-гліцин-треоніну. *B. subtilis* володіє антагоністичною активністю та безпечністю для теплокровних тварин.

Авторами проведено виділення та ідентифікацію штамів молочнокислих бактерій (МКБ) з ферментованих продуктів України. Показано, що екзополісахариди МКБ у нетоксичних концентраціях володіють анти-ВПГ-1 активністю, що реалізується шляхом впливу на різні етапи репродукції вірусу. Встановлено антимікробну активність МКБ щодо патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів. Основну роль у прояві якої відіграє зокрема молочна кислота, пероксид водню та антимікробним речовинам білкової природи.

Авторами уперше встановлено, що різне забезпечення дріжджових клітин фосфором призводить до зміни співвідношення морфологічних типів вакуолярного волютину. Визначено, що до складу волютинових гранул входять дві фракції неорганічних поліфосфатів з довжиною ланцюга близько 55 і 126 фосфатних залишків, ліпіди з насиченими жирними кислотами і білки з молекулярною масою 50-100 кДа. Уперше встановлено, що явище “dancing bodies” має ритмічний характер і біологічну природу. Запропоновано новий метод визначення показника “dancing bodies”. Показники реакції метакромазії і рухливості волютинових гранул можуть бути використані для біоіндикації несприятливих умов існування дріжджів.

Отримані результати можуть слугувати основою для створення біопрепаратів на основі досліджуваних штамів та/чи їх метаболітів.

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.

Наукова новизна:

Встановлено, що біополімер штаму *B. licheniformis* M20-Г є високомолекулярною поліглутаміною кислотою з молекулярною масою більше 2 МДа. Показано, що γ -поліглутамінова кислота, 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 20-50⁰С.

Вперше встановлено провітамінні та пробіотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-7525. Показано, що досліджувані штами синтезують пігменти каротиноїдної природи, основним представником яких є апо-8'- β -каротен-3-ол. Його біосинтез відбувається шляхом послідовного утворення апо-8'-фітофлуену, апо-8'- ζ -каротину, апо-8'-нейроспорину.

Вперше досліджено закономірності синтезу штамми *V. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-7525 пігментів в умовах періодичного глибинного культивування. Підбрано параметри глибинного культивування та компонентний склад живильного середовища, що оптимальні для синтезу штамми пігментів та накопичення їх біомаси. Встановлено, що синтез каротиноїдів починається у кінці експоненційної фази росту культур. Виявлено наявність двох максимумів накопичення пігментів: у середині стаціонарної фази росту та на початку фази старіння культур.

Встановлено, що штамми *V. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-7525 характеризуються пробіотичними властивостями: проявляють антагоністичну активність щодо умовно-патогенних мікроорганізмів, стійкість до низьких значень рН і високих концентрацій жовчі та жовчних кислот, мають низьку адгезивну і високу ферментативну (протео-, ліпо-, ксилано-, целюлозолітичну, пектинестеразну) активності.

Встановлено позитивний вплив штамів *V. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-7525 на нормалізацію якісного і кількісного складу мікробіоти кишківника тварин і птахів, відновлення структури їх тканин та органів, накопичення вітаміну А у печінці, активацію клітинної ланки імунітету.

В роботі вивчено здатність до синтезу екзополісахаридів близько 200 штамів МКБ, ізольованих з ферментованих овочевих та кисломолочних продуктів, що є традиційними для України. Встановлено, що продукція ЕПС не є штамоспецифічною характеристикою. Показано вплив джерела виділення на синтез екзополісахариду. Встановлено, що екзополісахариди молочнокислих бактерій можуть проявляти високу протигерпетичну активність і призводити до нормалізації життєвого циклу клітин, що інфіковані вірусом герпесу, до рівня неінфікованих клітин. Виявлено, що ЕПС проявляють множинну анти-ВПГ-1 дію, оскільки як на ранніх так і на пізніх етапах репродукції вірусу виявляють активність, мають як віруліцидну дію, блокують адсорбцію, проникнення вірусу до клітин, вихід повноцінного вірусу та знижують інфекційний титр вірусу герпесу на 97 – 99%.

Встановлено, що бактерію роду *Lactobacillus*, ізольовані з традиційних ферментованих продуктів, володіють антиоксидантною активністю, яка зберігається і у готовому продукті, зокрема квашеній капусті. Досліджено антимікробну активність штамів *Lactobacillus*, щодо представників фітопатогенних мікроорганізмів та встановлено їх високий інгібуючий ефект.

Уперше встановлено, що різне забезпечення дріжджових клітин фосфором призводить до зміни співвідношення морфологічних типів вакуолярного волютину. Показано, що волютинові гранули дріжджів є твердими та аморфними структурами з гладкою і гідрофобною поверхнею. Визначено, що до складу волютинових гранул *Saccharomyces cerevisiae* УКМ У-517 входять дві фракції неорганічних поліфосфатів з довжиною ланцюга близько 55 і 126 фосфатних залишків, ліпіди з насиченими жирними кислотами і білки з молекулярною масою 50-100 кДа. Підтверджено, що ступінь прояву реакції метакромазії *in vitro* залежить від концентрації і

довжини ланцюга неорганічних поліфосфатів. Встановлено, що метахроматичне забарвлення *in vitro* може з'являтися при співвідношенні цих полімерів з іонами кальцію відповідно 5:1. Індуковано реакцію метахромазії волютинових гранул дріжджів *in vivo* при дії стресових факторів (низькій температурі, кислотному стресі та анаеробіозі), що може бути показником реакції клітини на стрес. Уперше встановлено, що явище “dancing bodies” має ритмічний характер і біологічну природу, оскільки притаманне тільки живим дріжджовим клітинам, високочутливе до зовнішнього впливу фізико-хімічних факторів, залежить від фізіологічного стану клітини та пов'язане з фосфорним метаболізмом. Згідно отриманим результатам, запропоновано гіпотетичні моделі щодо генезису волютинових гранул *S. cerevisiae*, їх структури та механізму рухливості.

Практична значимість:

Створено колекцію штамів молочнокислих бактерій, що здатні продукувати екзополісахариди, які є перспективними для практичного використання. Запропоновано екзополісахариди молочнокислих бактерій в якості основи для створення нових антивірусних засобів. Штам *L. plantarum* 47 см з антиоксидантною активністю може бути використаним для отримання ферментованих овочевих продуктів функціонального харчування та штам *L. plantarum* 1047 к з пробіотичними властивостями - для заквашування овочевої сировини.

Запропоновано новий метод визначення показника “dancing bodies” (кількості клітин з рухливими волютиновими гранулами). Показники реакції метахромазії і рухливості волютинових гранул можуть бути використані для біоіндикації несприятливих умов існування дріжджів. Метод виділення волютинових гранул, який раніше був запропонований Eixler et al. (2005) для бактерій і водоростей, може бути застосований для дріжджових клітин. Одержані результати рекомендовано до використання в учбових курсах та посібниках.

Створено колекцію штамів бактерій роду *Bacillus*, що синтезують високі рівні каротиноїдних пігментів та поліамінних біополімерів. Отримані результати щодо синтезу каротиноїдних пігментів бактеріями роду *Bacillus* є підґрунтям для створення пробіотичного препарату з провітамінною активністю на основі штамів *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7513 та ІМВ В-7525, а також для розробки середовища для його промислового отримання.

Висновки:

У циклі робіт проведено комплексні фундаментальні дослідження біологічних особливостей перспективних продуцентів ряду біологічно активних речовин, встановлення природи певних груп екзометаболітів і їх ролі у прояві біологічної активності штамів продуцентів

У наступних висновках викладені основні науково-дослідні результати:

1. Встановлено, що біополімер штаму *B. licheniformis* М20-Г є високомолекулярною поліглутаміновою кислотою з молекулярною масою більше 2 МДа.

2. Показано, що γ -поліглутамінова кислота, 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.

3. Пігменти штамів *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 та IMB B-7525 представлені комплексом ліпідів та вуглеводів, належать до C₃₀-апокаротиноїдів, зокрема, апо-8'-фітофлуену, апо- ζ -8'-каротину, апо-8'-нейроспорину та апо-8'- β -каротен-3-олу.

4. Синтез каротиноїдів штамми *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 та IMB B-7525 починається у другій половині експоненційної фази росту. Загальний вихід пігментного комплексу є максимальним на 21 годину культивування і становить 220±15 та 501±45 мг/л, відповідно.

5. Загальний вихід каротиноїдного комплексу штамів *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 та IMB B-7525 може бути підвищено у 2,1 – 3,9 та 1,6 – 2,7 рази, відповідно за рахунок додавання у середовище культивування арабінози, (NH₄)₂SO₄ та FeSO₄.

6. Штами *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 та IMB B-7525 відповідають вимогам щодо пробіотичних культур. Вони характеризуються антагоністичною активністю щодо умовно-патогенних мікроорганізмів, стійкістю до умов шлунково-кишкового тракту, низькою адгезивністю, високою ферментативною активністю, безпечністю, чутливістю до антибіотиків.

7. Штами *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 і IMB B-7525 доцільно використовувати у композиції, оскільки вони доповнюють один одного за антагоністичною, ферментативною і провітамінною активністю, що суттєво розширює їх біологічну ефективність.

8. 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.

9. Показано, що штамми молочнокислих бактерій, ізольовані з різних джерел є активними продуценти біологічно активних речовин. Частота виділення штамів-продуцентів екзополісахаридів залежала як від джерела виділення так і роду МКБ.

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

11. 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.

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

13. 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.

14. 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.

15. Прояв реакції метахромазії *in vitro* залежить від кількості і довжини ланцюга поліфосфатів, а також від співвідношення концентрації цих полімерів та іонів Ca^{2+} .

16. Встановлено індикаторну роль реакції метахромазії волютинових гранул на стресову дію як умов культивування, так і факторів космічної погоди.

17. 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.

_____ / к.б.н., зав. лабораторії Хархота М.А. /
(підпис)

_____ / к.б.н., м.н.с. Харчук М.С. /
(підпис)

_____ / к.б.н., н.с. Василюк О.С. /
(підпис)

_____ / м.н.с. Лагутіна О.С. /
(підпис)