



БИОЛОГИЯ

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 274–279

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 274–279

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-274-279>

Научная статья
УДК 577.359

Оценка вторичной структуры поли- γ -глутаминовой кислоты, продуцируемой *Bacillus subtilis* EGP5QL12, методом спектроскопии кругового дихроизма

М. В. Черных¹✉, И. М. И. Ибрахим², В. С. Гринёв^{1,3},
Е. Н. Сигида³, Ю. П. Федоненко^{1,3}, С. А. Коннова^{1,3}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Фаюмский университет, сельскохозяйственный факультет, Фаюм, Арабская республика Египет, P0Box: 63514 (Египет)

³Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

Черных Марина Владимировна, студент биологического факультета, marinac814@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2701-8430>

Ибрахим Ибрахим Мохамед Ибрахим, ассистент кафедры микробиологии, imb00@fayoum.edu.eg, <https://orcid.org/0000-0002-5374-3508>

Гринёв Вячеслав Сергеевич, кандидат химических наук, доцент кафедры органической и биоорганической химии Института химии; старший научный сотрудник лаборатории биохимии, grinev@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0627-6804>

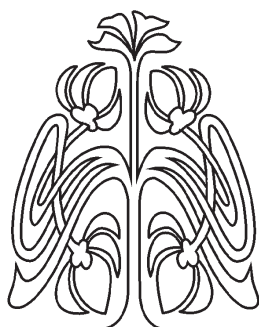
Сигида Елена Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии, sigida_e@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9223-4589>

Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биохимии, Саратов, fedonenko_yu@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0255-8190>

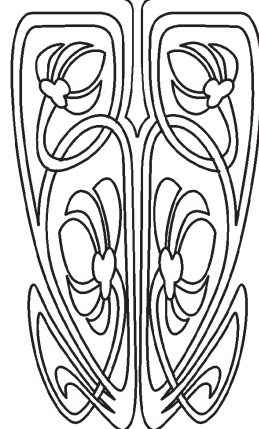
Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биофизики; ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, Konnovasa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9607-8173>

Аннотация. Из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* EGP5QL12 выделен экстраклеточный полимер с выходом 5,6 г/л. На основании данных тонкослойной хроматографии, колориметрических исследований и данных ИК-фурье-спектроскопии установлено, что данный полимер является поли- γ -глутаминовой кислотой (ПГК). ПГК широко используется в медицине, косметологии и пищевой промышленности благодаря способности связывать воду и катионы металлов. Для оценки и прогнозирования биотехнологического потенциала выделенного полимера проведён анализ характерных спектральных признаков, позволяющих установить его вторичную структуру. ПГК, по данным спектроскопии кругового дихроизма, при варьировании pH формирует преимущественно β -структуры при невысокой доле нерегулярных структур и α -спиралей, что наделяет ее высоким потенциалом для создания гидрогелей и композиционных материалов.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, поли- γ -глутаминовая кислота, вторичная структура, круговой дихроизм



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





Для цитирования: Черных М. В., Ибрагим И. М. И., Гринёв В. С., Сигида Е. Н., Федоненко Ю. П., Коннова С. А. Оценка вторичной структуры поли-γ-глутаминовой кислоты, продуцируемой *Bacillus subtilis* EGP5QL12, методом спектроскопии кругового дихроизма // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 274–279. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-274-279>

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Evaluation of the secondary structure of poly-γ-glutamic acid produced by *Bacillus subtilis* EGP5QL12 by circular dichroism spectroscopy method

M. V. Chernykh¹ ✉, I. M. I. Ibrahim², V. S. Grinev^{1,3}, E. N. Sigida³, Yu. P. Fedonenko^{1,3}, S. A. Konnova^{1,3}

¹Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

²Fayoum University, Egypt, Fayoum, POBox: 63514 (Egypt)

³Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, 13 Entuziastov Pr., Saratov 410049, Russia

Marina V. Chernykh, marinac814@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2701-8430>

Ibrahim M. I. Ibrahim, ibrahim.egypt2016@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5374-3508>

Vyacheslav S. Grinev, grinev@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0627-6804>

Elena N. Sigida, si_elena@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9223-4589>

Yulia P. Fedonenko, fedonenko_yu@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0255-8190>

Svetlana A. Konnova, konnovasa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9607-8173>

Abstract. An extracellular polymer was isolated from the culture liquid of *Bacillus subtilis* EGP5QL12 with the yield of 5,6 g/L. On the basis of the data of thin layer chromatography, colorimetric analyses and FTIR spectroscopy, it was established that the polymer is poly-γ-glutamic acid (PGA). PGA is widely used in medicine, cosmetology and the food industry due to its ability to bind water and metal ions. To assess the biotechnological potential of the isolated polymer and predict the possibilities of its application in various fields of the national economy, it is necessary to analyze the characteristic spectral features that make it possible to establish its secondary structure. The isolated PGA preparation was analyzed by circular dichroism spectroscopy at various pH values. According to the results of this study, it was found that the polymer forms predominantly β-structures with a low proportion of irregular structures and α-helices, which gives it a high potential for creating hydrogels and composite materials.

Keywords: *Bacillus subtilis*, poly-γ-glutamic acid, secondary structure, circular dichroism

For citation: Chernykh M. V., Ibrahim I. M. I., Grinev V. S., Sigida E. N., Fedonenko Yu. P., Konnova S. A. Оценка вторичной структуры поли-γ-глутаминовой кислоты, продуцируемой *Bacillus subtilis* EGP5QL12, методом спектроскопии кругового дихроизма. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 274–279. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-274-279>

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Сохранение ресурсного потенциала нашей планеты и обеспечение экологической безопасности являются важнейшими проблемами современности. Один из инструментов для решения данных проблем – использование биоразлагаемых нетоксичных функциональных соединений. Перспективным источником таких соединений являются галофильные бактерии – активные продуценты полисахаридов и других биополимеров, обладающих рядом специфических характеристик, перспективных для развития многих отраслей биотехнологии. Микробные биополимеры находят широкое применение в пищевой, фармацевтической и других отраслях благодаря своей уникальной структуре и физико-химическим свойствам [1]. Одним из соединений, синтезируемых бактериями и применяющихся в различных областях промышленности, является поли-γ-

глутаминовая кислота (ПГК). Этот нетоксичный биоразлагаемый полимер, способный связывать воду и катионы металлов, широко используется для доставки лекарственных средств против рака и диабета, в качестве увлажняющего агента в кремах, а также биоремедиации загрязненных акваторий и территорий [2]. Использование биополимера в тех или иных целях зависит от его физико-химических свойств, обусловленных его первичной и вторичной структурами. Цель данной работы – оценка вторичной структуры ПГК, продуцируемой галофильным штаммом *Bacillus subtilis* EGP5QL12, выделенным из образцов соли озера Карун (Египет) [3], методом спектроскопии кругового дихроизма (КД).

Материалы и методы

Для получения экстраклеточного полимера бактерии исследуемого штамма культивировали на богатой питательной среде S-G (500 мл) [4]



при 30 °С в течение 72 ч в колбах Эрленмейера (1 л) на орбитальном шейкере, культуральную жидкость отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин с использованием Allegra X-30R (Beckman Coulter, США) и диализовали 48 ч против дистиллированной воды (предел исключения диализных мембран 14 кДа). Диализат концентрировали на роторном испарителе Laborota 4000 (Heidolph, Германия) при пониженном давлении до объема 100 мл и подвергали дробному осаждению 96% этанолом в объемном соотношении 1:2 в течение 16 ч при –18 °С. ПГК осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин, перерастворяли в минимальном объеме воды и диализовали против дистиллированной воды для освобождения от остаточного количества этанола. Затем раствор ПГК концентрировали и лиофилизировали с использованием Benchtop 2K (VirTis, США). Выход ПГК составил 4,5 г/л.

Анализ состава ПГК методом тонкослойной хроматографии проводили после кислотного гидролиза препарата (4 М CF₃COOH, 2 ч) на пластинах Sorbfil с алюминиевой подложкой в системе растворителей н-бутанол : вода : уксусная кислота в объёмных отношениях 4:1:1. Для проявления аминокислоты использовали 0,5% раствор нингидрина в ацетоне.

Анализ содержания углеводов и белков проводили колориметрическими методами [5, 6] по реакции соответственно с фенолом и серной кислотой и с реактивом Брэдфорда на спектрофотометре Specord 40 (Analytik Jena, Германия).

ИК-спектры образца экстраклеточного полимера регистрировали на ИК-фурье-спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Scientific, США), снабжённом устройством поглощения паров воды и углекислого газа, в диапазоне волновых чисел 400–4000 см⁻¹ со спектральным разрешением 4 см⁻¹. Тонко измельчённый образец смешивали с навеской KBr (FTIR grade, Sigma Aldrich, США) и прессовали в таблетку. Спектры регистрировали в режиме пропускания, образцом сравнения служил воздух.

Вторичную структуру ПГК оценивали методом спектроскопии кругового дихроизма на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания), снабжённом системой постоянной продувки азотом особой чистоты (99,996%, объёмная доля кислорода не более 0,001%) и температурным контроллером кюветного отделения Temperature control (Quantum Northwest, США) с точностью поддержания температуры 0,1 °С. Для регистрации спектров

использовалась свободная от внутренних напряжений стекла и предназначенная для поляризационных измерений кварцевая кювета 101-QS P (Hellma Analytics, США) с длиной оптического пути 10 мм. Образец растворяли в 0,1 М NaF при pH: 2.5, 4.2, 5.3, которые получали добавлением H₃PO₄ и Na₂HPO₄. Спектры КД регистрировали в диапазоне длин волн 190–260 нм. Средняя молярная эллиптичность остатка рассчитывалась по формуле

$$[\theta] = [\theta]_{obs} \cdot \frac{MRW}{10lc},$$

где $[\theta]_{obs}$ – наблюдаемая эллиптичность, °; MRW – средний вес остатка; l – длина пути кюветы, см; c – молярная концентрация ПГК, г/л.

Деконволюцию спектров КД производили с использованием поставляемого со спектрометром Chirascan программного обеспечения CDNN 2.1 (Германия) [7].

По величинам доли каждого типа укладки ПГК сделан вывод о возможности использования исследуемого полимера в биотехнологии.

Результаты и их обсуждение

Из культуральной жидкости бактерий *B. subtilis* EGP5QL12 с выходом 5,6 г/л был выделен экстраклеточный полимер. В выделенном препарате колориметрическим методом установлена доля углеводов – 16%, а белков не обнаружено. Полимер подвергали кислотному гидролизу, который освобождали от кислоты упариванием на роторном испарителе. Методом ТСХ обнаружено наличие в гидролизате только одной фракции, выявляемой нингидрином, которая по фактору удерживания $R_f(0,3)$ соответствовала стандарту – глутаминовой кислоте.

Анализ ИК-спектров полимера выявил характеристичные для глутаминовой кислоты полосы поглощения (табл. 1). Так, в спектрах наблюдалось присутствие уширенной полосы

Таблица 1 / Table 1

Полосы поглощения в ИК-спектре ПГК и их отнесение
Absorption bands in the FTIR spectrum of PGA and their assignment

Отнесение полос / Bands assignment	Волновое число, см ⁻¹ / Wavenumber, cm ⁻¹
Валентные колебания / Stretching vibrations	
O-H / N-H	3415
C=O Амид I / Amide I	1636
COO ⁻ (антисимм./ antisymm.)	1618
COO ⁻ (симм. / symm.)	1410

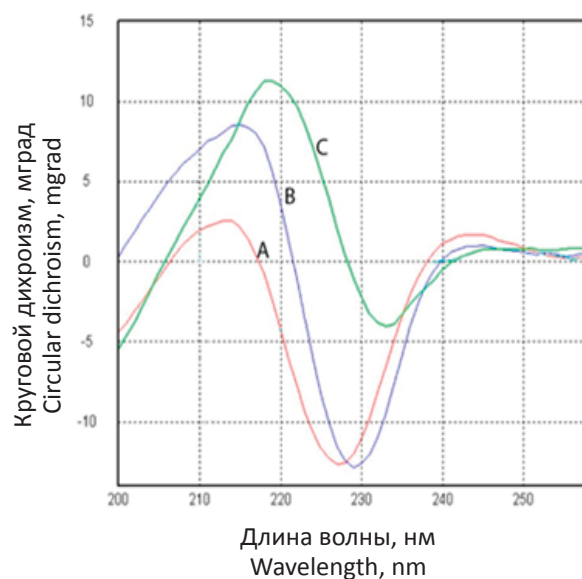


с максимумом поглощения при 3415 см^{-1} , относящейся к валентным колебаниям связанных водородными связями гидроксильных групп (О-Н), которые маскируют валентные колебания N-H групп, обычно наблюдаемых в этой области спектра. В области, характерной для полос колебаний карбонильных групп, присутствовали две разрешённые полосы с максимумами при 1636 и 1618 см^{-1} , первая из которых соответствовала полосе валентных колебаний C=O «Амид I», характерной для полипептидов и белков с преобладанием β -складчатых структур [8]. Вторая полоса отнесена к антисимметричным колебаниям диссоциированных карбоксильных групп, что подтверждается наличием полосы поглощения симметричных валентных колебаний 1410 см^{-1} . При этом в спектре отсутствует полоса поглощения, характерная для недиссоциированных карбоксильных групп, вблизи $1725\text{--}1700\text{ см}^{-1}$. Указанное отнесение подтверждалось присутствием полос поглощения деформационных колебаний соответствующих групп атомов и согласовывалось с литературными данными [9].

Таким образом, на основании данных ТСХ и ИК-фурье-спектроскопии полимер идентифицирован как поли- γ -глутаминовая кислота.

Наличие у ПГК оптически активного центра позволяет использовать спектроскопию КД для анализа изменений во вторичной структуре её полимера, аналогично полипептидам и белкам. Основным хромофором, используемым при регистрации спектров КД, является группа атомов, образующих амидную связь (-C(=O)-N(-H)-), дающая две полосы поглощения, соответствующих $\pi \rightarrow \pi^*$ и более длинноволновым $n \rightarrow \pi^*$ переходам. Спектры КД выделенного препарата, записанные при различных значениях pH, представлены на рисунке.

В диапазоне $220\text{--}240\text{ нм}$ в спектрах КД наблюдался отрицательный эффект Коттона, обусловленный $n \rightarrow \pi^*$ переходами атомов, образующих амидную связь. По характеру изменений профиля спектров можно судить о перестройке вторичной структуры в ответ на уменьшение кислотности среды [10]. С увеличением pH наблюдался батохромный сдвиг полосы поглощения $n \rightarrow \pi^*$, обусловленной вышеназванным хромофором, причём наиболее значимые трансформации вторичной структуры ПГК происходили при изменении pH от 4.2 до 5.3, что также свидетельствовало об увеличении доли различных β -структур при одновременном уменьшении доли α -спиралей.



Спектры КД ПГК при pH раствора 2.5 (A); pH 4.2 (B); pH 5.3 (C) (цвет online)
Circular dichroism spectra of the PGA solutions at pH 2.5 (A); pH 4.2 (B); pH 5.3 (C) (color online)

Для выявления вклада отдельных компонентов вторичной структуры в результирующий аналитический сигнал в спектрах КД было проведено математическое разложение (деконволюция) спектральных полос на отдельные составляющие. Результаты деконволюции спектров КД представлены в табл. 2.

Сравнивая полученные результаты с литературными данными, можно отметить, что ПГК штамма *B. subtilis* EG5QL12, выделенная в данных условиях культивирования, существенно отличается от ПГК других продуцентов, в частности от наиболее часто используемого в биотехнологии [7, 11]. β -Антипараллельные слои преобладают у полученного нами полимера, в отличие от *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A, что наделяет полимер способностью к образованию гидрогелей. Такого потенциала у иных продуцентов нет из-за преобладания нерегулярных структур и большой доли α -спиралей. Также стоит отметить большую долю β -петель – структур, отрицательно заряженные диссоциированные карбоксильные группы которых направлены наружу, – что позволяет в большей степени связывать воду и катионы металлов. Таким образом, анализ компонентов вторичной структуры ПГК при различных pH методом спектроскопии КД показывает преобладание β -организации полимерной цепи.



Таблица 2 / Table 2

Динамика изменения вторичных структур при изменении pH
Dynamic of secondary structures changes at different pH values

Вторичная структура / Secondary structure	Доля вторичной структуры при разных значениях pH, % Percentage of secondary structure at different pH, %					
	pH 2,5		pH 4,2		pH 5,3	
	B.s.	B.l.	B.s.	B.l.	B.s.	B.l.
β-антипараллельные слои / β-antiparallel sheets	47,5	10-12	46,3	11-13	48,0	13-15
Нерегулярная структура / Unregular structure	27,5	35-38	28,5	37-40	27,5	42-44
β-петли / β-turn	15,1	17-19	15,5	17-19	15,5	17-19
α-спираль / α-helix	6,2	20-25	6,1	17-19	5,5	10-15
β-параллельные слои / β-parallel sheets	3,7	12-15	3,6	13-15	3,5	16

Примечание: B. s. – *Bacillus subtilis* EGP5QL12; B.l. – *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A (данные литературы).
 Note. B. s. – *Bacillus subtilis* EGP5QL12; B.l. – *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A (reference data).

Заключение

С применением КД-спектроскопии проведена оценка вторичной структуры полиглутаминовой кислоты, продуцируемой в культуральную среду штаммом *B. subtilis* EGP5QL12. Преобладающий вклад в формирование вторичной структуры данного биополимера вносят β-антипараллельные слои и β-петли, что отличает исследуемый препарат от других, исследованных в данном аспекте другими авторами. Выявленные особенности вторичной структуры ПГК обуславливают склонность данного полимера к формированию гидрогелей и способность к связыванию катионов металлов, что открывает перспективы его использования в медицине и косметологии.

Список литературы

- Liu C., Kingsley Baffoe D., Zhan Y., Zhang M., Li Y., Zhang G. Halophile, an essential platform for bioproduction // *J. Microbiol. Methods*. 2019. Vol. 166. A. 105704.
- Dahiya D., Chettri R., Nigam P. S. Biosynthesis of polyglutamic acid (γ-PGA), a biodegradable and economical polyamide biopolymer for industrial applications // *Microbial and Natural Macromolecules* / eds. Das S., Ranjan Dash H. London : Academic Press, 2020. P. 681–988.
- Ибрагим И. М., Коннова С. А., Сигида Е. Н., Федоненко Ю. П., Сафронова В. И., Елбанна К. А. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы – продуценты экзополисахаридов, выделенные из соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия) // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 345–353. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-3-345-353>

- Sehgal S. N., Gibbons N. E. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum* // *Can. J. Microbiol.* 1960. Vol. 6, iss. 2. P. 165–169.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* 1956. Vol. 28. P. 350–356.
- Скоупс Р. Методы очистки белков. М. : Мир, 1985. 358 с.
- Wang L. L. Conformations and molecular interactions of poly-γ-glutamic acid as a soluble microbial product in aqueous solutions // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, iss. 1. P. 1–11.
- Nevskaya N. A., Chirgadze Y. N. Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibration of alpha-helix // *Biopolymers*. 1976. Vol. 15, iss. 4. P. 637–648.
- Ho G. H. γ-Polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (Natto): Structural characteristics, chemical properties and biological functionalities // *J. Chin. Chem. Soc.* 2006. Vol. 53, iss. 6. P. 1363–1384.
- Brahms S., Brahms J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 138, № 2. P. 149–178.
- Wang L. Complexation and conformation of lead ion with poly-γ-glutamic acid in soluble state // *PLoS One*. 2019. Vol. 14, iss. 9. A. e0218742.

References

- Liu C., Kingsley Baffoe D., Zhan Y., Zhang M., Li Y., Zhang G. Halophile, an essential platform for bioproduction. *J. Microbiol. Methods*, 2019, vol. 166, A. 105704.
- Dahiya D., Chettri R., Nigam P. S. Biosynthesis of polyglutamic acid (γ-PGA), a biodegradable and economical polyamide biopolymer for industrial applications. In: Das S., Ranjan Dash H., eds. *Microbial and Natural Macromolecules*. London, Academic Press, 2020, pp. 681–988.



3. Ibrahim I. M., Konnova S. A., Sigida E. N., Fedonenko Yu. P., Safronova V. I., Elbanna K. A. Exopolysaccharide-Producing Halophilic and Halotolerant Microorganisms Isolated from the Saline Lakes Qarun (Egypt) and Elton (Russia). *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 345–353 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-3-345-353>
4. Sehgal S. N., Gibbons N. E. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.*, 1960, vol. 6, iss. 2, pp. 165–169.
5. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 1956, vol. 28, pp. 350–356.
6. Scopes R. K. *Protein Purification: Principles and Practice*. New York, Springer, 1982. 358 p.
7. Wang L. L. Conformations and molecular interactions of poly- γ -glutamic acid as a soluble microbial product in aqueous solutions. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, iss. 1, pp. 1–11.
8. Nevskaya N. A., Chirgadze Y. N. Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibration of alpha-helix. *Biopolymers*, 1976, vol. 15, iss. 4, pp. 637–648.
9. Ho G. H. γ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (Natto): Structural characteristics, chemical properties and biological functionalities. *J. Chin. Chem. Soc.*, 2006, vol. 53, iss. 6, pp. 1363–1384.
10. Brahm S., Brahm J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.*, 1980, vol. 138, no. 2, pp. 149–178.
11. Wang L. Complexation and conformation of lead ion with poly- γ -glutamic acid in soluble state. *PLoS One*, 2019, vol. 14, iss. 9, A. e0218742.

Поступила в редакцию 03.05.21, после рецензирования 11.05.21, принята к публикации 14.05.21
Received 03.05.21, revised 11.05.21, accepted 14.05.21