

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра генетики

ГУРИНА
Анастасия Викторовна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ШИКИМОВОЙ
КИСЛОТЫ**

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
к.б.н., доцент
А. В. Лагодич

Минск, 2018

РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает: страниц – 60, рисунков – 13, таблиц – 21, источников – 44.

Ключевые слова: шикимовая кислота, экзоферментативная активность, природные изоляты, *Bacillus subtilis*, мутагенез.

Объект исследования: природные изоляты, *B. subtilis* 168t, *B. subtilis* 168wt, *B. subtilis* 168trpC2.

Цель: выделение и характеристика природных изолятов спорообразующих микроорганизмов, обладающих ценными для биотехнологического использования свойствами.

Методы: культивирование бактерий на различных питательных средах, определение экзоферментативной активности, спектрофотометрический анализ, химический мутагенез, ауксографический тест.

Микроорганизмы широко используются в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства. Они являются ценными продуцентами различных первичных и вторичных метаболитов, среди которых наиболее востребованными являются различные аминокислоты, моно- и полисахариды, структурные белки и ферменты (амилазы, липазы, протеазы и др.). Эти соединения выступают ключевыми веществами, используемыми в различных отраслях промышленности, служат для производства широкого спектра биотехнологических продуктов, могут выступать в роли катализаторов для различных органических превращений. Одним из таких ценных соединений, секретируемых бактериями рода *Bacillus*, является шикимовая кислота и ее производные. Поскольку шикимовая кислота используется в качестве реагента в органическом синтезе, как в областях фундаментальной науки, так и в прикладных областях (органическая химия и медицина).

Из различных образцов почвы и грунта были выделены грамположительные спорообразующие микроорганизмы, предположительно относящихся к роду *Bacillus*. Для полученных изолятов была определена экзоферментативная активность и уровень синтеза ароматических аминокислот, достаточный для подращивания ауксотрофного триптофанзависимого маркерного штамма. Однако, только два изолята обеспечивали рост маркерного штамма на приемлемом уровне и были отобраны для дальнейшей работы. Кроме того, подобраны условия для химического мутагенеза клеток бактерий *B. subtilis* с целью получения мутантов, устойчивых к действию ацетилтриптофана. По данным ауксографического теста уровень продукции триптофана у таких мутантов был увеличен в два-три раза.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа ўключае: старонак – 60, малюнкаў – 13, табліц – 21, крыніц – 44.

Ключавыя словы: шыкімавая кіслата, экзаферментатыўная актыўнасць, прыродныя ізаляты, *Bacillus subtilis*, мутагенэз.

Аб'ект даследавання: прыродныя ізаляты, *B. subtilis* 168t, *B. subtilis* 168wt, *B. subtilis* 168trpC2.

Мэта: вылучэнне і характарыстыка прыродных ізалятаў спораўтваральных мікраарганізмаў, якія валодаюць каштоўнымі для біятэхналагічнага выкарыстання ўласцівасцямі.

Метады: культываванне бактэрый на розных пажыўных асяроддзях, вызначэнне экзаферментатыўнай актыўнасці, спектрафотаметрычны аналіз, хімічны мутагенэз, аўксаграфічны тэст.

Мікраарганізмы шырока выкарыстоўваюцца ў розных галінах прамысловасці і сельскай гаспадаркі. Яны з'яўляюцца каштоўнымі прадукцэнтамі розных першасных і другасных метабалітаў, сярод якіх найбольш запатрабаванымі з'яўляюцца розныя амінакіслоты, мона- і поліцукрыды, структурныя бялкі, ферменты (амілаза, ліпазы, пратэазы і інш.). Гэтыя злучэнні выступаюць ключавымі рэчывамі, што выкарыстоўваюцца ў розных галінах прамысловасці, служаць для вытворчасці шырокага спектру біятэхналагічных прадуктаў, могуць выступаць у ролі каталізатараў для розных арганічных ператварэнняў.

Адным з такіх каштоўных злучэнняў, сінтэзаваным бактэрыямі роду *Bacillus*, з'яўляецца шыкімовая кіслата і яе вытворныя. Паколькі шыкімовая кіслата выкарыстоўваецца ў якасці рэагента ў арганічным сінтэзе, як у галінах фундаментальнай навукі, так і ў прыкладных галінах (арганічная хімія і медыцына).

З розных абразцоў глебы і грунта былі вылучаны грамдадатныя спораўтваральныя мікраарганізмы, як мяркуецца, якія адносяцца да роду *Bacillus*. Для атрыманых ізалятаў была вызначана экзаферментатыўная актыўнасць і ўзровень сінтэзу араматычных амінакіслот, дастатковы для падрашчвання аўксатрофнага трыптафанзалежнага маркерага штаму. Аднак, толькі два ізалята забяспечвалі рост маркерага штаму на прымальным узроўні і былі адабраны для далейшай працы. Акрамя таго, падабраныя ўмовы для хімічнага мутагенэзу клетак бактэрый *B. subtilis* з мэтай атрымання мутантаў, устойлівых да дзеяння ацэтыл-трыптафану. Па дадзеных аўксаграфічнага тэсту ўзровень прадукцыі трыптафану ў такіх мутантаў быў павялічаны ў два-тры разы.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Diplomarbeit umfasst: Seite-60, Zeichnungen-13, Tabelle 21, Quellen-44.

Schlüsselwörter: shikimasäure, exoenzymatische Aktivität, Natürliche Isolate, *Bacillus subtilis*, Mutagenese.

Objekt der Forschung: Natürliche Isolate, *B. subtilis* 168t, *B. subtilis* 168wt, *B. subtilis* 168trpC2.

Zweck: die Freisetzung und Charakterisierung von natürlichen kontroversen Isolate über visuelle Mikroorganismen, die für die biotechnologische Verwendung von Eigenschaften wertvoll sind.

Methoden: Kultivierung der Bakterien auf verschiedenen Nährböden, Definition exoenzymatische Aktivität, Spektralphotometer, Chemische Mutagenese, auxografischer Test.

Mikroorganismen sind weit verbreitet in verschiedenen Branchen und Landwirtschaft. Sie sind wertvolle Produkte verschiedener primär- und sekundärmetaboliten, unter denen verschiedene Aminosäuren, Mono- und Polysaccharide, strukturelle Proteine und Enzyme (Amylase, Lipase, Protease, etc.) am meisten gefragt sind. Diese Verbindungen sind die wichtigsten Substanzen, die in verschiedenen Branchen verwendet werden, dienen zur Herstellung einer breiten Palette von biotechnologischen Produkten, können als Katalysatoren für verschiedene organische Transformationen fungieren. Eine solche wertvolle Verbindung, die durch Bakterien der Art *Bacillus* absondert werden, ist shikimova Säure und seine Derivate. Da shikimasäure als Reagenz in der organischen Synthese verwendet wird, sowohl in den Bereichen der grundlegenden Wissenschaft als auch in den angewandten Bereichen (organische Chemie und Medizin).

Aus verschiedenen Boden- und Bodenproben wurden grampositive Mikroorganismen hervorgehoben, die angeblich mit der Gattung *Bacillus* verbunden sind. Für die erhaltenen Isolate wurde die exoenzymatische Aktivität und die Synthese von aromatischen Aminosäuren bestimmt, die für die inkrementelle auxotrophen triptophanabhängige markerstamm ausreicht. Jedoch, nur zwei Isolate haben Wachstum eines markierungsstammes auf dem annehmbaren Niveau zur Verfügung gestellt und wurden für die weitere Arbeit ausgewählt. Darüber hinaus sind die Bedingungen für die Chemische Mutagenese von Bakterien *B. subtilis* ausgewählt. *subtilis* mit dem Ziel, Mutanten zu erhalten, die gegen die Wirkung von Acetyl-Tryptophan resistent sind. Laut auxographischen Tests wurde das Niveau der Produktion von Tryptophan bei solchen Mutanten um zwei bis drei mal erhöht.