

Выделение и характеристика штамма *Pantoea syripedii* 4A, продуцирующего высокомолекулярный экзополисахарид

Сазонова Олеся Ивановна^{1,2}, Ветрова Анна Андрьяновна^{1,2}, Гафаров Арслан Булатович², Шарова Мария Вадимовна^{1,3}, Соколов Сергей Львович^{1,2}

¹ ООО «Научно-производственная фирма ЭКОБИОТЕХ», Москва, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино Московская обл., Россия

³ Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

Корреспонденция, касающаяся этой статьи, должна быть адресована Сазонова О.И., ООО «Научно-производственная фирма ЭКОБИОТЕХ» Россия, 127238, город Москва, шоссе Дмитровское, дом 85, офис 148, e-mail: sazonova_oi@rambler.ru

В условиях потребности отдельных отраслей промышленности в биополимерах с различными характеристиками поиск новых микроорганизмов, обладающих высоким потенциалом в отношении синтеза высокомолекулярных экзополисахаридов, имеет первостепенное значение. В работе исследован бактериальный штамм *Pantoea syripedii* 4A, выделенный методом прямого посева на богатой агаризованной питательной среде, как потенциальный продуцент внеклеточных полисахаридов. Данный штамм был выделен из лесной подстилки, смешанной с верхним слоем почвы Приокско-Террасного заповедника им. М.А. Заблочно. Штамм *Pantoea syripedii* 4A способен к синтезу ЭПС на среде с 5%-ой сахарозой, что было подтверждено реакцией Подобедова – Молиша (качественной реакцией на углеводы в среде). Гель-проникающая хроматография позволила установить, что изолированный микроорганизм на среде с 5%-ой сахарозой продуцирует экзополисахарид с молекулярной массой около 1,69 МДа. Однако, наличие двух более низкомолекулярных пиков, может свидетельствовать о том, что получаемый продукт по составу может быть неоднороден. Выход сухого биополимера при выращивании штамма на минеральной среде с сахарозой в конечной концентрации 5% без добавления дополнительных компонентов, как то микроэлементы, составлял 8,5 г/л. Одной из важных характеристик ЭПС является вязкость их водных растворов. Измеренная динамическая вязкость 10%-го раствора ЭПС, синтезируемого *Pantoea syripedii* 4A, была 1,728 мПа·с. Несмотря на то, что продукция внеклеточных полисахаридов может стимулироваться в стрессовых условиях, ни при пониженном доступе кислорода, ни при пониженной температуре биосинтеза ЭПС исследуемым штаммом не наблюдается.

Ключевые слова: экзополисахариды, *Pantoea syripedii*, гель-проникающая хроматография, динамическая вязкость, биотехнологии

Введение

Экзополисахариды (ЭПС) – это большой класс природных высокомолекулярных углеводных биополимеров с уникальными физическими, химическими, механическими и биологическими свойствами. Они являются экологически чистым продуктом благодаря своей биоразлагаемости, биосовместимости и нетоксичности. Кроме того, при их естественном распаде также не образуется загрязняющих агентов, что приводит к снижению техногенной нагрузки на окружающую среду. Они способны растворяться в воде, создавая растворы с высокой вязкостью, обладают такими свойствами

как студнеобразование, загущение, влагоудержание, стабилизация, эмульгирование и др. (Елинов, 1984). ЭПС возобновляемы и могут быть переработаны в волокна, гидрогели, пленки и каркасы, которые имеют решающее значение при разработке функциональных биоматериалов (Castellane, M.Lemos, & E.Lemos, 2018). Именно все эти вышеперечисленные свойства способствовали широкому применению данных биополимеров в пищевой и нефтяной промышленности, фармацевтике и медицине (Guezennec, 2016; Leroy & De Vuyst, 2016; Leung, Liu, Koon, & Fung, 2006; Matsumoto & Kuroyanaqi, 2010; Silva, Lopes Neto, & Cardarelli, 2019).

Как цитировать

Сазонова, О. И., Ветрова, А. А., Гафаров, А. Б., Шарова, М. В., & Соколов, С. Л. (2020). Выделение и характеристика штамма *Pantoea syripedii* 4A, продуцирующего высокомолекулярный экзополисахарид. *Health, Food & Biotechnology*, 2(4). <https://doi.org/10.36107/hfb.2020.i4.s90>

Внеклеточные полисахариды, продуцируемые бактериями, по сравнению с растительными и животными ЭПС, являются наиболее перспективными для промышленных нужд, поскольку свойства образуемых ЭПС можно регулировать изменением условий культивирования штаммов-продуцентов, а также выращиванием их на дешевых субстратах, таких как отходы производств (Barcelos, Vespermann, Pelissari, & Molina, 2020; Sutherland, 2005; Середа и др., 2019). Бактериальные ЭПС представляют собой огромное разнообразие химических структур и имеют как гомополимерный, так и гетерополимерный состав. Биосинтез ЭПС связан с первичным углеводным обменом продуцирующих их клеток (De Vuyst & Degeest, 1999). Продукция данных соединений характерна для множества микроорганизмов из различных экологических ниш, включая условно-патогенные и патогенные для человека штаммы (Banerjee, Rudra, Mazumder, Nigam, & Bandopadhyay, 2018; Benit & Roslin, 2018; Ostapska, Howell, & Sheppard, 2018). Количество внеклеточных полисахаридов, производимых многими микроорганизмами, слишком мало для их практического использования. Известно лишь несколько видов бактерий, обладающих способностью синтезировать ЭПС в количествах достаточных для биотехнологического производства. Среди них штаммы *Xanthomonas campestris*, *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Sfingomonas elodea* являются наиболее изученными. Это подтолкнуло ученых в последние годы к открытию новых микроорганизмов-продуцентов ЭПС, тестированию состава, структуры и характеристик новых ЭПС (Andhare, Chauhan, Dave, & Pathak, 2014; Roca, Alves, Freitas, & Reis, 2015; Trabelsi, Slima, Chaabane, & Riadh, 2015; Мелентьев, 2017), что также способствовало созданию баз данных известных экзополисахаридов (Birch, Van Calsteren, Pérez, & Svensson, 2019). Поскольку для каждой отрасли требуются биополимеры с различными характеристиками, то поиск новых бактерий, обладающих высоким потенциалом в отношении синтеза высокомолекулярных биополимеров, имеет первостепенное значение для промышленности.

Целью данной работы являлся поиск, выделение и характеристика бактериального штамма, способного к продукции высокомолекулярных экзополисахаридов.

Материалы и методы

В работе использовали бактериальный штамм *Pantoea cypripedii* 4A, полученный методом прямого высева на среду R2A («Panreac», Испания) как

потенциальный продуцент экзополисахаридов. Микроорганизм был выделен из лесной подстилки, смешанной с верхним слоем почвы глубиной 3-5 см. Образцы подстилки были отобраны методом конверта в Приокско-Террасном заповеднике имени М.А. Заблоцкого (54.911542, 37.572082) в июле 2019г., температура окружающей среды на момент отбора проб составляла 23°C, относительная влажность воздуха – 72%.

Способность штамма продуцировать экзополисахариды проверяли в жидкой питательной среде следующего состава: пептон – 0,2%, K_2HPO_4 – 0,2%, NaCl – 0,2%, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,04%, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001%, сахароза – 5%. Культивирование вели в течение 24 часов на качалке при 28°C. Экзополисахариды из культуральной жидкости осаждали тремя объемами изопропанола; полученный осадок промывали 96%-ным этанолом и высушивали до постоянной массы. С полученным препаратом проводили качественную реакцию на углеводы с α -нафтолом (реакция Подобедова – Молиша). Для этого навеску препарата (10-20 мг) растворяли в 0,5 – 1 мл деионизованной воды. К полученному раствору добавляли 1-2 капли 0,1%-ного спиртового раствора α -нафтола после чего по стенке пробирки осторожно приливали 0,5 – 2 мл концентрированной серной кислоты. Появление фиолетового кольца на границе раздела фаз свидетельствовало о наличии углевода в растворе. В качестве положительного контроля использовали 1%-ый раствор глюкозы, отрицательным контролем служила деионизованная вода (фиолетовое кольцо не образовывалось).

Измерение динамической вязкости проводили с использованием экспресс-анализатора консистенции ЭАК-2М (Украина) по протоколу фирмы-изготовителя.

Для анализа способности штамма *Pantoea cypripedii* 4A синтезировать ЭПС в микроаэрофильных условиях в стерильную колбу объемом 50 мл вносили 45 мл стерильной питательной среды и инокулят ночной культуры (в соотношении 1 объем инокулята к 100 объемам среды). Инкубацию вели при 28°C в течение 7 суток без использования качалки. Эксперимент проводили в трех повторях.

Для выделения геномной ДНК штамм выращивали на среде 1/10 TSB (Tryptic Soy Broth) фирмы «Sigma-Aldrich» (США) при 28°C на качалке при 180 об/мин в течение 14-16 часов. Геномную ДНК микроорганизмов выделяли с использованием GeneJET Genomic DNA Purification Kit («Thermo Scientific», США) по протоколу фирмы-изготовителя.

Видовую идентификацию выделенного микроорганизма-продуцента ЭПС осуществляли на основании определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК, а также, с использованием системы MALDI Biotyper (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) по протоколу фирмы-изготовителя («Bruker Daltonics», Германия). Идентификация микроорганизмов с помощью MALDI Biotyper основана на сравнении масс-спектров рибосомальных белков исследуемого штамма с базой спектров референсных микроорганизмов известных видов. Пробы для анализа готовили согласно (De Bruyne et al., 2011).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США). Реакцию проводили в стандартных условиях, при конечной концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов 200 мкМ и 1,5 мМ MgCl₂ и 1.5-2.5 единицы DreamTaq полимеразы фирмы «Thermo Scientific», Литва. Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК использовали олигонуклеотидные праймеры 8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') и 1492r (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg, Barnes, Pelletier, & Lane, 1991). Размер амплифицированного фрагмента составлял около 1484 п.н. Программа амплификации состояла из начальной денатурации (94°C 5 мин), и 30 циклов (94°C 30 сек, 55°C 30 сек, 72°C 1 мин) с финальной достройкой в течение 7 мин при 72°C.

Электрофорез ДНК проводили в 0,8% агарозном геле в 0,5× трис-боратном буфере по стандартной методике (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). Визуализацию ДНК проводили путем окрашивания геля в растворе бромистого этидия (конечная

концентрация 0,0005%) при покачивании в течение 5 минут.

Нуклеотидную последовательность ДНК определяли с помощью генетического анализатора ABI 3130 xl Analysis System («Applied Biosystem», США) по протоколу фирмы производителя. Анализ идентичности нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Молекулярно-массовое распределение и среднюю молекулярную массу экзополисахаридов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при помощи системы Agilent 1100 («Agilent Technologies», США) с рефрактометрическим детектором по протоколу фирмы-изготовителя. В работе использовали колонку BioSil TSK 50xl (7,5 × 300 мм) фирмы Bio-Rad (США); элюент – 0,05М буфер Tris/HCl со скоростью потока 0,5 мл/мин. Калибровка хроматографической колонки осуществлялась по декстранам («Serva», Германия, «Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) с молекулярными массами 4000, 500, 110, 40 и 20 кДа, декстринам с массами 1620, 1400, 900 Да («Sigma», США), глюкозе и этанолу с молекулярными массами 180 и 46 Да, соответственно. Результаты калибровки представлены на Рисунке 1 и в Таблице 1.

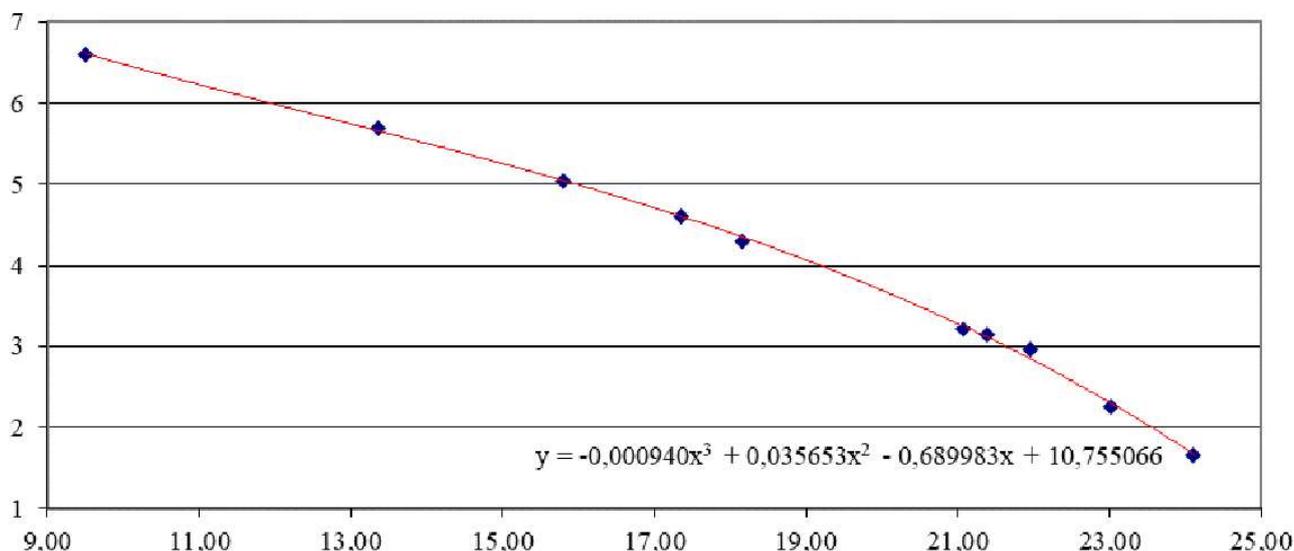
Пробоподготовку образца ЭПС для анализа проводили следующим образом: навеску ЭПС растворяли в течение 2 часов в буфере Трис-НCl (0.05М, pH 6,9) с добавлением 0.2М хлорида натрия. В результате конечная концентрация навески оказалась 1 мг/мл. Чтобы избавиться от вероятного осадка, образец перед анализом в течение 5 минут был подвергнут центрифугированию при 13300 об/мин на настольной центрифуге PICO17 («Thermo Scientific», США).

Таблица 1
Времена Удерживания Максимумы Пика Калибровочных Полимеров

Калибровочный полимер	Молекулярная масса, Да	Время удерживания, мин	Логарифм молекулярной массы
Декстран 4000	4000000	9,50	6,60206
Декстран T500	500000	13,35	5,69897
Декстран T110	110000	15,80	5,041393
Декстран T40	40000	17,35	4,60206
Декстран T20	20000	18,16	4,30103
Декстрин 10	1620	21,07	3,209515
Декстрин 15	1400	21,38	3,146128
Декстрин 20	900	21,95	2,954243
Глюкоза	180	23,02	2,255273
Этанол	46	24,10	1,662758

Рисунок 1

Калибровочный график зависимости времени удерживания от логарифма молекулярной массы полисахарида для хроматографической колонки Bio-Rad TSK50xl (7,5 * 300мм)



Уравнение калибровочной кривой имело вид:

$$Y = -0,000940x^3 + 0,035653x^2 - 0,689983x + 10,755066,$$

где x – время удерживания (RT).

Результаты и их обсуждение

Объектом нашего исследования был бактериальный штамм 4А, выделенный из лесной подстилки, смешанной с верхним слоем почвы методом прямого высева на среду R2А. Данный микроорганизм на среде R2А образовывал слизистые колонии, что являлось косвенным свидетельством возможности продуцировать внеклеточные полисахариды.

Видовую принадлежность исследуемого штамма определяли, используя масс-спектрометрическую систему MALDI Biotyper, а также путем секвенирования фрагмента гена 16S рРНК. Данные методы позволили отнести выделенный микроорганизм к виду *Pantoea cypripedii*. Нуклеотидная последовательность гена 16S рДНК штамма *Pantoea cypripedii* 4А депонирована в базе данных GenBank под номером MW585400. На Рисунке 2 представлена диаграмма эволюционных взаимоотношений штамма *Pantoea cypripedii* 4А с другими представителями рода *Pantoea* на основе нуклеотидных последовательностей их генов 16S рДНК.

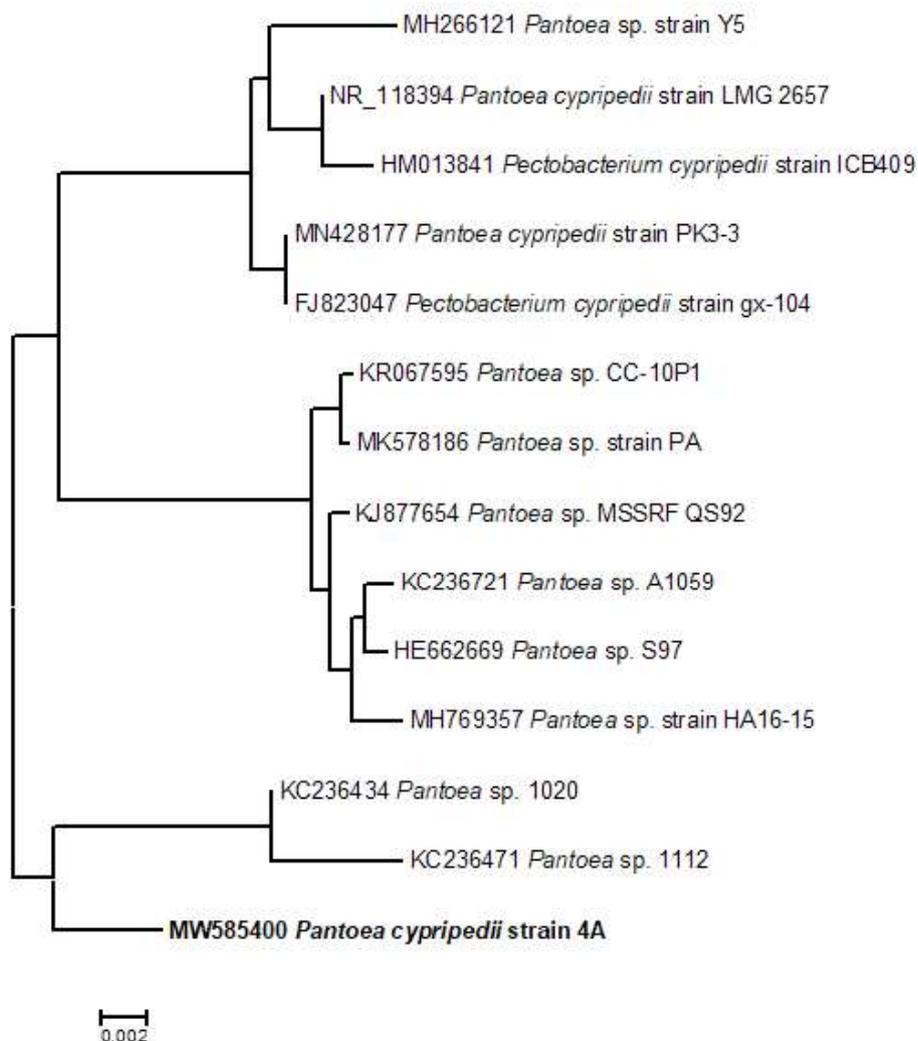
Pantoea spp. широко распространены в природе, они были выделены из почв, различных водо-

емов, растений (как эпифитная, так и эндофитная микрофлора) и других источников (Amellal, Burtin, Bartoli, & Heulin, 1998; Silvi, Barghini, Aquilanti, Juarez-Jimenez, & Fenice, 2013; Niknezhad, Morowvat, Najafpour, Iraj, & Ghasemi, 2018; Sun et al., 2020). В последние годы бактерии *Pantoea* вызывают все больший интерес исследователей благодаря своей способности продуцировать высокомолекулярные ЭПС (Silvi et al., 2013; Niknezhad et al., 2018).

Для изучения способности изолированного в ходе данной работы *Pantoea cypripedii* 4А продуцировать экзополисахариды, штамм выращивали в течение 24 часов в жидкой питательной среде (см. раздел «Материалы и методы») с сахарозой в качестве единственного источника углерода и энергии. Образование внеклеточных полисахаридов при выращивании на данной среде было подтверждено реакцией Подобедова-Молиша (общая качественная реакция на углеводы). Выход сухого продукта при выращивании микроорганизма в питательной среде с 5%-ной сахарозой составлял 8,5 г/л, что являлось экономически более выгодным по сравнению с продукцией ЭПС штаммом *Pantoea* sp. VM39, выделенного из седиментов Средиземного моря. Данный штамм характеризуется высоким уровнем синтеза ЭПС, порядка 12 г/л на среде с 10%-ной сахарозой (Silvi et al., 2013). Кроме более высокого уровня углевода в среде, *Pantoea* sp. VM39 требуется и более многокомпонентная среда для культивирования.

Рисунок 2

Диаграмма эволюционных взаимоотношений штамма *Pantoea cypripedii* 4A с другими представителями рода *Pantoea* на основе нуклеотидных последовательностей их генов 16S рДНК. Приведены номера последовательностей в GenBank, полужирным шрифтом выделен штамм *Pantoea cypripedii* 4A. Диаграмма построена с использованием алгоритма Neighbor Join и множественного выравнивания методом MUSCLE в программном пакете UGene v.37 (Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & UGENE team, 2012)



Гель-проникающая хроматография высокого разрешения позволила установить молекулярно-массовое распределение и среднюю молекулярную массу полученного препарата внеклеточного полисахарида. Образец ЭПС имел высокомолекулярный пик

(около 1,69 млн Дальтон) на уровне 23% от общей площади пиков, а также пик с максимумом в районе 1750 Да – около 55% площади. Хроматографический профиль образца представлен на Рисунке 3, результат обработки хроматограммы в Таблице 2.

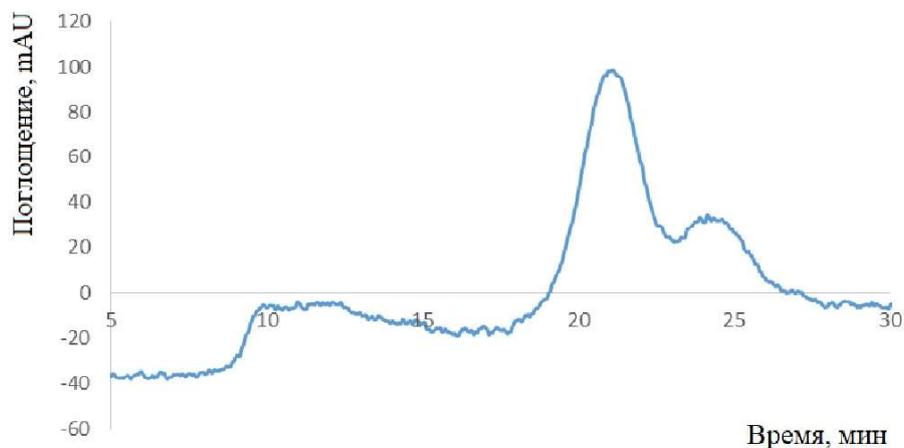
Таблица 2

Результаты Обработки Хроматограммы Образца Экзополисахарида, Синтезируемого *Pantoea cypripedii* 4A

Образец	Пик	Время удерживания, мин	% площади	Молекулярная масса, Да
<i>Pantoea cypripedii</i> 4A	1	11,00	23	1690602
	2	21,09	55	1749
	3	24,14	22	44

Рисунок 3

Хроматограмма молекулярно-массового распределения в образце биополимера, синтезируемого штаммом *Pantoea cypripedii* 4A



Одним из основных показателей в описании свойств ЭПС является вязкость их растворов. Данная характеристика зависит от штамма, синтезирующего биополимер, химического состава, структуры молекулы ЭПС и таких факторов, как количество вещества, температура культивирования, pH среды, возможность аэрации и т.д. (Гвоздяк, 1989). Измеренная динамическая вязкость 10%-ного водного раствора экзополисахарида продуцируемого исследуемым микроорганизмом при температуре 30°C составляла 1.728 мПа×с, в то время как динамическая вязкость 5%-ного и 1%-ного водных растворов при тех же условиях составляла 0.831 и 0.559 мПа×с, соответственно.

Известно, что экзополисахариды выполняют защитные функции для бактериальных штаммов-продуцентов в отношении неблагоприятных факторов окружающей среды (повышение и снижение значений pH, температуры, степень аэрации и т.д.) (Пирог, 1997). Поскольку микроорганизмы рода *Pantoea* являются факультативными анаэробами, то интерес представляло установить следующее: как влияют микроаэрофильные условия культивирования на биосинтез внеклеточных полисахаридов используемым в работе штаммом. Проведенный эксперимент показал, что в условиях низкого доступа кислорода биосинтез ЭПС штаммом *Pantoea cypripedii* 4A не наблюдается.

Установлено, что психрофильные штаммы родов *Colwellia* sp., *Pseudomonas* sp. и *Phormidesmis* sp. синтезируют биополимеры при низких температурах окружающей среды, которые проявляют криопротекторные свойства не только в отноше-

нии самих бактерий-продуцентов, но и для других микроорганизмов (Marx, Carpenter, & Deming, 2009; Carrion, Delgado, & Mercade, 2015; Christmas, Barker, & Anesio, 2016). Исходя из вышесказанного, исследуемый в работе штамм *Pantoea cypripedii* 4A был проверен на способность к синтезу внеклеточных полисахаридов при низких значениях температуры окружающей среды (+6°C) как в аэробных, так и в микроаэрофильных условиях. Однако в обоих случаях синтеза ЭПС штаммом *Pantoea cypripedii* 4A при низкой температуре не наблюдалось.

Заключение

Таким образом, в ходе работы из лесной подстилки, смешанной с верхним слоем почвы, был выделен штамм *Pantoea cypripedii* 4A, продуцирующий экзополисахарид с молекулярной массой 1,69 МДа на культуральной среде с 5%-ой сахарозой в качестве основного источника углерода. Наличие двух низкомолекулярных пиков на хроматограмме молекулярно-массового распределения свидетельствует о том, что получаемый продукт по составу является неоднородным. Выход сухого продукта биополимера при данных условиях культивирования составлял 8,5 г/л. Динамическая вязкость 10%-го раствора данного продукта была 1,728 мПа×с, что в два раза больше вязкости 5%-ного раствора этого биополимера и в три раза больше соответствующего показателя 1%-ного раствора. Полученные в ходе работы данные позволяют рассматривать ЭПС, продуцируемый *Pantoea cypripedii* 4A, как потенциальный продукт для применения в различных отраслях промышленности.

Литература

- Гвоздяк, Р. И. (1989). *Микробный полисахарид ксантан*. Наукова думка.
- Елинов, Н. П. (1984) *Химия микробных полисахаридов*. Высшая школа.
- Мелентьев, А. И. (2017). Уникальный природный штамм *Raenibacillus ehimensis* IB-739. В *Нарочанские чтения - 11*, (с. 58-63). Белорусский государственный университет, Северо-Кавказский федеральный университет.
- Пирог, Т. П., Гринберг, Т. А., & Малащенко, Ю. Р. (1997). Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter* sp. *Микробиология*, 66(3), 335 – 340.
- Середа, А. С., Костылева, Е. В., Великорецкая, И. А., Цурикова, Н. В., Хабибулина, Н. В., Бикбов, Т. М., Бубнова, Т. В. & Немашкалов, В. А. (2019). Использование препарата на основе низкомолекулярных веществ сои для повышения активности ксиланазы и эндоглюканазы мутантного штамма *Trichoderma reesei* Co-44. *Биотехнология*, 35(5), 70 – 79. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-70-79>
- Andhare, P., Chauhan, K., Dave, M., & Pathak, H. (2014). Microbial exopolysaccharides: advances in applications and future prospects. *Biotechnology*, 3, 1–25. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3518.4484>
- Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F., & Heulin, T. (1998). Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation *Applied Environmental Microbiology*, 64, 3740–3747.
- Banerjee, A., Rudra, S. G., Mazumder, K., Nigam, V., & Bandopadhyay, R. (2018). Structural and functional properties of exopolysaccharide excreted by a novel *Bacillus anthracis* (Strain PFAB2) of hot spring. *Original Indian Journal of Microbiology*, 58(1), 39–50. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0699-4>
- Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari F. M., & Molina G. (2020). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1475-1495, <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1575791>
- Benit, N., & Roslin, A. S. (2018). Isolation and characterization of larvicidal extracellular polysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* B01. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 109-120, <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.013>
- Birch, J., Van Calsteren, M.-R., Pérez, S. & Svensson, B. (2019). The exopolysaccharide properties and structures database: EPS-DB. Application to bacterial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 205, 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.063>
- De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., & Vandamme, P. (2011). Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.003>
- Carrion, O., Delgado, L., & Mercade, E. (2015). New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. *Carbohydrate polymers*, 117, 1028 – 1034. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.060>
- Castellane, T. C., Lemos, M., & Lemos, E. (2018). Exploring and utilization of some bacterial exopolysaccharides. *Biopolymers Research*, 2(1), 1000106
- Christmas, N., Barker, A. G., & Anesio, A.M. (2016). Genomic mechanisms for cold tolerance and production of exopolysaccharides in the Arctic cyanobacterium *Phormidesmis priestleyi* BC1401. *BMC Genomics*, 17(1), 533. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2846-4>
- Guezennec, J. (2016). Bacterial exopolysaccharides from unusual environments and their applications. In H.C. Flemming, T.R. Neu, J. Wingender (Eds.), *The Perfect Slime: Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS)* (p.135). Springer.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 3229 – 3238. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9936>
- Leung, M. Y., Liu, C., Koon, J. C., & Fung, K. P. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letter*, 105(2), 101-114. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.01.009>
- Marx, J. G., Carpenter, S. D., & Deming, J. W. (2009). Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(1), 63 –72. <https://doi.org/10.1139/W08-130>
- Matsumoto, Y., & Kuroyanaqi, Y. (2010). Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor. *Journal of Biomaterials Science Polymer*, 21, 715–726. <https://doi.org/10.1163/092050611X555687>
- Niknezhad, S. V., Morowvat, M. H., Najafpour D., G., Iraj, A., & Ghasemi, Y. (2018). Exopolysaccharide from *Pantoea* sp. BCCS 001 GH isolated from nectarine fruit: production in submerged culture and preliminary physicochemical characterizations. *Food Science and Biotechnology*, 27, 1735–1746. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0409-y>

- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & UGENE team (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* (Oxford, England), *28*(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Ostapska, H., Howell, P. L., & Sheppard, D. C. (2018). Deacetylated microbial biofilm exopolysaccharides: It pays to be positive. *PLOS Pathogens*, *14*(12), e1007411. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007411>
- Roca, C., Alves, V.D., Freitas, F., & Reis, M.A. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in microbiology*, *6*, 288 – 291. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00288>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silva, L. A., Lopes Neto, J. H. P. & Cardarelli, H. R. (2019). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annual Microbiology*, *69*, 321–328 <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01456-9>
- Silvi, S., Barghini, P., Aquilanti, A., Juarez-Jimenez, B., & Fenice, M. (2013). Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide. *Microbial Cell Factories*, *12*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-10>
- Sun, L., Lei, P., Wang, Q., Ma, J., Zhan, Y., Jiang, K., Xu, Z. & Xu, H. (2020). The endophyte *Pantoea alhagi* NX-11 alleviates salt stress damage to rice seedlings by secreting exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3112. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03112>
- Sutherland, I.W. (2005). Microbial exopolysaccharides. In *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, (pp. 431-457). Marcel Dekker, Inc.
- Trabelsi, I., Slima, S. B., Chaabane, H., & Riadh, B. S. (2015). Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, *74*, 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.045>
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *23*, 153–177. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(98\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(98)00042-4)
- Weisburg, W. G., Barnes, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, *73*, 697–703.

Isolation and Characterization of the *Pantoea cyripedii* 4A Strain Producing High Molecular Weight Exopolysaccharide

Olesya I. Sazonova^{1,2}, Anna A. Vetrova^{1,2}, Arslan B. Gafarov²,
Maria V. Sharova^{1,3}, Sergey L. Sokolov^{1,2}

¹ LLC “Scientific and Production Company ECOBIOTECH”

² G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, FRC PSCBI RAS

³ Moscow State University of Food Production

Correspondence concerning this article should be addressed to O.I. Sazonova, Scientific and Production Company ECOBIOTECH LLC, 127238, Moscow, Dmitrovskoe chaussees, 85, office 148, e-mail: sazonova_oi@rambler.ru

Searching for new microorganisms with great potential for the synthesis of high-molecular exopolysaccharides possessing some useful traits is very important in the scope of certain industries. The bacterial strain *Pantoea cyripedii* 4A isolated by direct plating on a rich agar medium was studied in this work as a potential producer of extracellular polysaccharides. This strain was isolated from forest litter mixed with the topsoil of the M.A. Zablotsky Prioksko-Terrasny Reserve. The *Pantoea cyripedii* 4A strain is capable of synthesizing EPS that was confirmed by the Podobedov-Molish reaction (a qualitative reaction to carbohydrates in the medium) on a medium supplemented with 5% sucrose. Gel permeation chromatography confirmed that the isolated strain produces an exopolysaccharide with a molecular weight of about 1.69 MDa on a medium supplemented with 5% sucrose. However, the presence of two lower molecular weight peaks may indicate that the resulting product has heterogeneous structure. The yield of dry biopolymer when growing the strain on a mineral medium with sucrose at a final concentration of 5% without adding additional components, such as microelements, was 8.5 g/l. One of the important characteristics of EPS is the viscosity of their aqueous solutions. The measured dynamic viscosity of a 10% EPS solution synthesized by *Pantoea cyripedii* 4A was 1.728 mPa s. Despite the fact that the production of extracellular polysaccharides is often enhanced under stress conditions, neither reduced oxygen concentration, nor low temperature conditions did affect the EPS biosynthesis by the studied strain.

Key words: exopolysaccharides, *Pantoea cyripedii*, gel permeation chromatography, dynamic viscosity, biotechnologies

References

- Gvozdyak, R. I. (1989). *Mikrobnij polisaharid ksantan* [Microbial polysaccharide xanthan]. Naukova dumka.
- Elinov, N. P. (Ed.) (1984). *Himiya mikrobnih polisaharidov* [Chemistry of microbial polysaccharides]. Vysshaya shkola.
- Melent'ev A. I. (2017). The unique environmental strain *Paenibacillus ehimensis* IB-739. In *Narochanskije chteniya – 11* [Naroch readings – 11], (pp. 58-63). Belorussian State University, North-Caucasian Federal University.
- Pirog, T. P., Grinberg, T. A., & Malashenko, Yu. R. (1997). Protective functions of exopolysaccharides synthesized by *Acinetobacter* sp. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 66(3), 335 - 340.
- Sereda, A. S., Kostyleva, E. V., Velikoretskaya, I. A., Tsurikova, N. V., Khabibulina, N. V., Bikbov, T. M., Bubnova, T. V. & Nemashkalov, V. A. (2019). Use of a preparation based on low molecular weight soybean substances to increase the activity of xylanase and endoglucanase of the mutant *Trichoderma reesei* Co-44 strain. *Biotechnologiya* [Biotechnology], 35(5), 70 - 79. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-70-79>
- Andhare, P., Chauhan, K., Dave, M., & Pathak, H. (2014). Microbial exopolysaccharides: advances in applications and future prospects. *Biotechnology*, 3, 1-25. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3518.4484>
- Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F., & Heulin, T. (1998). Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation

How to Cite

Sazonova, O. I., Vetrova, A. A., Gafarov, A. B., Sharova, M. V., & Sokolov, S. L. (2020). Isolation and characterization of the *Pantoea cyripedii* 4A strain producing high molecular weight exopolysaccharide. *Health, Food & Biotechnology*, 2(4). <https://doi.org/10.36107/hfb.2020.i4.s90>

- Applied Environmental Microbiology*, 64, 3740–3747.
- Banerjee, A., Rudra, S. G., Mazumder, K., Nigam, V., & Bandopadhyay, R. (2018). Structural and functional properties of exopolysaccharide excreted by a novel *Bacillus anthracis* (Strain PFAB2) of hot spring. *Original Indian Journal of Microbiology*, 58(1), 39–50. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0699-4>
- Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari F. M., & Molina G. (2020). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1475–1495, <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1575791>
- Benit, N., & Roslin, A. S. (2018). Isolation and characterization of larvicidal extracellular polysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* B01. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 109–120, <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.013>
- Birch, J., Van Calsteren, M.-R., Pérez, S. & Svensson, B. (2019). The exopolysaccharide properties and structures database: EPS-DB. Application to bacterial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 205, 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.063>
- De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., & Vandamme, P. (2011). Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 20 – 29. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.003>
- Carrion, O., Delgado, L., & Mercade, E. (2015). New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. *Carbohydrate polymers*, 117, 1028 – 1034. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.060>
- Castellane, T. C., Lemos, M., & Lemos, E. (2018). Exploring and utilization of some bacterial exopolysaccharides. *Biopolymers Research*, 2(1), 1000106
- Christmas, N., Barker, A. G., & Anesio, A.M. (2016). Genomic mechanisms for cold tolerance and production of exopolysaccharides in the Arctic cyanobacterium *Phormidesmis priestleyi* BC1401. *BMC Genomics*, 17(1), 533. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2846-4>
- Guezennec, J. (2016). Bacterial exopolysaccharides from unusual environments and their applications. In H.C. Flemming, T.R. Neu, J. Wingender (Eds.), *The Perfect Slime: Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS)* (p.135). Springer.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 3229 – 3238. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9936>
- Leung, M. Y., Liu, C., Koon, J. C., & Fung, K. P. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letter*, 105(2), 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.01.009>
- Marx, J. G., Carpenter, S. D., & Deming, J. W. (2009). Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(1), 63 –72. <https://doi.org/10.1139/W08-130>
- Matsumoto, Y., & Kuroyanaqi, Y. (2010). Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor. *Journal of Biomaterials Science Polymer*, 21, 715–726. <https://doi.org/10.1163/092050611X555687>
- Niknezhad, S. V., Morowvat, M. H., Najafpour D., G., Iraj, A., & Ghasemi, Y. (2018). Exopolysaccharide from *Pantoea* sp. BCCS 001 GH isolated from nectarine fruit: production in submerged culture and preliminary physicochemical characterizations. *Food Science and Biotechnology*, 27, 1735–1746. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0409-y>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & UGENE team (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Ostapska, H., Howell, P. L., & Sheppard, D. C. (2018) Deacetylated microbial biofilm exopolysaccharides: It pays to be positive. *PLOS Pathogens*, 14(12), e1007411. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007411>
- Roca, C., Alves, V.D., Freitas, F., & Reis, M.A. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in microbiology*, 6, 288 – 291. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00288>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silva, L. A., Lopes Neto, J. H. P. & Cardarelli, H. R. (2019). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annual Microbiology*, 69, 321–328 <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01456-9>
- Silvi, S., Barghini, P., Aquilanti, A., Juarez-Jimenez, B., & Fenice, M. (2013). Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-10>

- Sun, L., Lei, P., Wang, Q., Ma, J., Zhan, Y., Jiang, K., Xu, Z. & Xu, H. (2020). The endophyte *Pantoea alhagi* NX-11 alleviates salt stress damage to rice seedlings by secreting exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3112. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03112>
- Sutherland, I.W. (2005). Microbial exopolysaccharides. In *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, (pp. 431-457). Marcel Dekker, Inc.
- Trabelsi, I., Slima, S. B., Chaabane, H., & Riadh, B. S. (2015). Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, *74*, 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.045>
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *23*, 153–177. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(98\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(98)00042-4)
- Weisburg, W. G., Barnes, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, *73*, 697–703.