

Л. С. Дышлок, С. В. Агафонова, О. В. Казимирченко

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ КСИЛАНАЗ

Калининградский государственный технический университет,  
Калининград, Россия

Поступила в редакцию 17.07.2024 г.

Принята к публикации 17.09.2024 г.

doi: 10.5922/vestniknat-2024-4-9

**Для цитирования:** Дышлок Л.С., Агафонова С.В., Казимирченко О.В. Молекулярно-генетическая идентификация изолятов бактерий – продуцентов ксиланаз // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2024. №4. С. 123–134. doi: 10.5922/vestniknat-2024-4-9.

Микробные ксиланазы широко применяются в различных отраслях промышленности, что обуславливает актуальность поиска новых микроорганизмов, способных к их продукции. Источником для выделения штаммов, обладающих ксиланолитической активностью, является растительное сырьё с высоким содержанием гемицеллюлоз – лигноцеллюлозная биомасса. В Калининградской области к такому сырью относятся шрот семян конопли технической *Cannabis sativa*, оболочка семян и семена люпина белого *Lupinus albus*, оболочка семян сои нетостированная, оболочка семян сои тостированная, оболочка семян сои гранулированная, семена каштана конского обыкновенного *Aesculus hippocastanum*. Среди 23 бактериальных изолятов, выделенных из указанного лигноцеллюлозного сырья, наибольшая ксиланолитическая активность установлена для 9 штаммов, которые по морфологическим и тинкториальным признакам отнесены к грамположительным спорообразующим палочкам. Молекулярно-генетическая идентификация методом 16S рРНК изолятов с установленной ксиланазной активностью позволила выявить принадлежность штаммов к видам *Peribacillus acanthi*, *Bacillus cereus*, *Bacillus zanthoxyli*, *Bacillus badius*. Идентифицированные штаммы микроорганизмов потенциально могут использоваться в качестве промышленных продуцентов ксиланаз с высокой активностью, позволяющих осуществлять биодеструкцию лигноцеллюлозной биомассы с получением востребованной продукции.

**Ключевые слова:** ксиланаза, лигноцеллюлозная биомасса, молекулярно-генетическая идентификация, *Bacillus*

### Введение

Ксилан является вторым по распространенности биополимером растительной клеточной стенки и представляет собой основное соединение гемицеллюлозной части лигноцеллюлозной биомассы наряду



с ксилозой, маннозой, арабинозой и галактозой. Ксиланазы – группа ферментов семейства гликозид-гидролаз, которые разрушают 1,4-β-D-ксилозидные связи в основной цепи ксилана, тем самым снижая степень его полимеризации [1; 2].

Ксиланолитические ферменты играют важную роль во многих отраслях промышленности, связанных с переработкой растительного сырья. Они применяются в животноводстве, поскольку способствуют увеличению прироста массы тела у сельскохозяйственных животных за счет повышения усвояемости кормов. В пищевой промышленности ксиланазы используются в хлебопечении для регулирования технологических свойств теста [2]. Утилизация отходов растительного происхождения, представляющих собой труднодеградируемую лигноцеллюлозную биомассу, – также потенциально широкая сфера применения ксиланаз.

Актуальным направлением пищевой промышленности, связанным с ферментативной деструкцией ксилана, является производство ксилоолигосахаридов (далее – КСОС) на его основе. КСОС обладают пребиотическим действием, проявляя способность избирательно повышать активность полезной кишечной микрофлоры. Им присущи также иммуномодулирующие, противоопухолевые, антиоксидантные свойства, благодаря которым КСОС обладают большим потенциалом для производства добавок к пище и функциональных продуктов питания на их основе [3; 4].

К продуцентам ксиланаз относится широкая группа микроорганизмов, включающая бактерии (*Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*) и микроскопические грибы (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*) [1]. При этом активность ксиланолитических ферментов различных штаммов бактерий связана с высоким содержанием в среде ксилана, этим обусловлена перспективность использования лигноцеллюлозной биомассы как сырья для выделения продуцентов ксиланаз [3; 4].

Целью настоящего исследования является выделение штаммов – продуцентов ксиланаз – из лигноцеллюлозного сырья Калининградской области и их молекулярно-генетическая идентификация.

### Объекты и методы исследования

Для выделения штаммов потенциальных продуцентов ксиланолитических ферментов было выбрано следующее растительное сырье: шрот семян конопли технической *Cannabis sativa*, оболочка семян и семена люпина белого *Lupinus albus*, оболочка семян сои нетостированная, тостированная и гранулированная, семена каштана конского обыкновенного *Aesculus hippocastanum*. Выбранные растительные источники являются вторичным и малоценным сырьем, доступным в Калининградской области. Они богаты гемицеллюлозой, следовательно, могут стать источником гидролизующих ксилан бактерий.

Для получения культур микроорганизмов в качестве питательных сред использовали рыбопептонный агар и агар Сабуро. Пробы разво-



дили в стерильном физиологическом растворе, осуществляли высев в чашки Петри с последующей заливкой агаризованной средой. Чашки с рыбопептонным агаром инкубировали при 30 °С в течение 72 ч, чашки с агаром Сабуро – при 22 °С в течение 5 сут.

Морфологические (форма клеток, наличие споры) и тинкториальные (тип клеточной стенки) признаки бактерий изучали при микроскопировании окрашенных по Граму препаратов с использованием иммерсионного объектива микроскопа ( $\times 100$ ).

Для определения ксиланолитической активности суточные культуры микроорганизмов засеивали методом штриха на поверхность питательного агара с ксиланом и инкубировали в термостате при температуре 30 °С в течение 48 ч. После этого засеянную тестируемыми культурами поверхность агара покрывали 0,5 %-ным раствором конго красного, чашки выдерживали в термостате при температуре 30 °С в течение 15 мин, после чего дважды промывали 1 М раствором хлорида натрия. Поверхность засеянного питательного агара покрывали 0,1 М раствором лимонной кислоты, чашки выдерживали в термостате в течение 5 мин, далее поверхность агара дважды промывали стерильной дистиллированной водой. Ксиланолитическую активность определяли по зонам обесцвечивания питательного агара вокруг культур микроорганизмов или по полному обесцвечиванию культуры [5].

Идентификацию штаммов микроорганизмов осуществляли с помощью анализа 16S рРНК в БРЦ ВКПМ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Для проведения полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) были выбраны консервативные праймеры 8f – aga gtt tga tcc tgg ctc ag; 926r – csg tca att cct ttr agt tt. Режимы реакции: 95 °С – 3 мин; 35 циклов: 95 °С – 30 с, 57 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин 30 с; 72 °С – 5 мин.

Для секвенирования использовали автоматический секвенатор АЕ3000. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в 1,0 %-ном агарозном геле при напряжении электрического поля 5 В/см.

Первичный скрининг осуществляли по базе данных GenBank, анализ сиквенсов проводили с использованием специализированной филогенетической компьютерной программы BLAST. При определении родства микроорганизмов критерием отнесения их к тому или иному виду считалась гомология не менее 97 % [6–12].

## Результаты

В таблице 1 представлены морфологические, тинкториальные признаки бактериальных изолятов, выделенных из лигноцеллюлозного сырья, и их ксиланолитическая активность.



Таблица 1

**Морфологические, тинкториальные признаки бактериальных изолятов,  
выделенных из лигноцеллюлозного сырья,  
и их ксиланолитическая активность**

Источник	№ изолята	Окрашивание по Граму	Споры	Форма клеток	Ксиланолитическая активность
Семена люпина белого	1	Грам (+)	+	палочки	+
	2	Грам (+)	+	палочки	-
	3	Грам (+)	+	палочки	+
	4	Грам (+)	+	палочки	-
Оболочка семян люпина белого	5	Грам (+) или Грам (-)	+	палочки	-
	6	Грам (+)	+	палочки	+
	7	Грам (+)	+	палочки	+
	8	Грам (+)	+	палочки	+
	9	Грам (+)	+	палочки	+
Семена каштана конского обыкновенного	10	Грам (+) или Грам (-)	+	палочки	+
	11	Грам (+)	+	палочки	+
Оболочка семян сои негострированная	12	Грам (+)	+	палочки	-
	13	Грам (+)	+	палочки	+
	14	Грам (+)	+	палочки	+
	15	Грам (+)	-	кокки	-
Оболочка семян сои тостированная	16	Грам (+)	+	палочки	-
	17	Грам (+)	+	палочки	+
Оболочка семян сои гранулированная	18	Грам (+)	+	палочки	-
	19	Грам (+)	+	палочки	-
Шрот семян конопли технической	20	Грам (+)	+	палочки	-
	21	Грам (+)	+	палочки	-
	22	Грам (+)	+	палочки	+
	23	Грам (+)	-	кокки	-

126

Всего из выбранного в качестве объектов исследования растительного сырья выделено 23 бактериальных изолята, преимущественно представленных спорообразующими грамположительными палочками. Ксиланолитическую активность, установленную по методике с конго красным, проявили 12 бактериальных изолятов, выделенных из всех видов лигноцеллюлозного сырья, за исключением гранулированной оболочки семян сои. Штаммы, продемонстрировавшие наибольшую ксиланолитическую активность, то есть полное обесцвечивание после окрашивания конго красным (изоляты №1, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 17, 22), были направлены на молекулярно-генетическую идентификацию.

При секвенировании переменных участков 16S рРНК штаммов №1, 6, 9, 14 и 22 были получены собранные нуклеотидные последовательности, представленные на рисунках 1–5.



```

CCAATGAYCYWCCACGGTIGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGC
GCGCTTITAGCCCAATAATTCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCCGGCTGCTGGCAGTGTGC
ACGTAGTITAGCCGTGGCTTTCGGTITAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCTTATCAACTAGCAGC
TGTGTTCCTTAACAACAGAGTITACGACCCGAAAGCCCTTATCACATCAGCCGCGGTGCT
CCGTCAGACTTTCCTATGCGGAAGATTCCTACGTCGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC
GTGTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTGCGCTACGCAATCGTGTCCCTGGTG
AGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGCACGCCGAAGC
CGCCTTCAATITCGAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCGGTTTCCGGGA
GTTATCCAGTCTTATGGGCAAGTATCCACGTGTACTCACCCTGCGCGCTAACCTTATATA
AGAGCAAGTCTTAATCCATTCGCTCGACTGCAATGATTAGGCACGCCCGCAGGTCATC
CTGAGCCAGGATCAAACCTT

```

Рис. 1. Секвенограмма штамма №1

```

CCACGKTTGAGCCGWGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGGCTTACG
CCCAATAATTCGGATAAACGCTTGCCACCTACGTATTACCCGGCTGCTGGCAGTGTAG
CCGTGGCTTTCGGTITAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCTTATCAACTAGCAGTGTTCCTCC
TAACAACAGAGTITACGACCCGAAAGCCCTTATCACATCAGCCGCGGTGCTGGCAGACT
TTCGTCATITGCGGAAGATTCCTACGTCGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCAGTTC
CCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTGCGCTACGCAATCGTGTCCCTGTTGAGCCGTTACCT
CACCACAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGCAGCCGAAGCCGCTTCAAT
TTCGAACCATGCRGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGAGTATCCCACT
CTTATGGCAGGTTACCCAGTGTACTCACCCTGCGCGCTAACCTTATAAGAGCAAGCT
CTTAATCCATTCGCTCGACTGCAATGATTAGGCACGCCCGCAGGCTTATCCGAGCCAGG
ATCAAACCTT

```

Рис. 2. Секвенограмма штамма №6

```

CTTTCCTCTGCACTCAGTCTCCAGTTCCAATGACCCTCCACGGTIGAGCCGTGGGCTTC
ACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGGCTTACGCCAATAATTCGGATAACGCTTGC
CACCTAGCTATTACCCGGCTGCTGGCAGGTAGTITAGCCGTGGCTTTCGGTITAGGTACCGTC
AAGGTGCGAGCTTATCAACTAGCAGTGTTCCTTAACAACAGAGTITACGACCCGAA
AGCCTTATCAGTACGCGCGGCTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATITGCGGAAGATTCCTAC
TGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAG
GTCCGTCAGCAATCGTGTCCCTGGTITAGCCGTTACCTCACCACCTAGCTAATGCGGAGCGGG
TCCATCCATAAGTGCAGCCGAAGCCGCTTCAATTCGAACCAATGCGGTTCAAATGTTA
TCCGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGAGTATCCCACTTATGGCAGGTTACCCAGTGTATA
CTCACCCTGCGCGCTAACCTTATAAGAGCAAGCTTAAATCCATTCGCTCGACTGCAATG
ATTAGGCACGCCCGCAGGTTATCTGAGCCAGGTTWCAAA

```

Рис. 3. Секвенограмма штамма №9

```

ACTTTCATSTTCIGTMCRCRAGWCISCCAGTKKCAATGACCCTCCACGGTIGAGCCGTGGC
TTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGGCTTACGCCAATAATTCGGATAACGCT
TGCCACCTACGTATTACCCGGCTGCTGGCAGGTAGTITAGCCGTGGCTTTCGGTITAGGTAC
GTCAAGGTGCGAGCTTATCAACTAGCAGTGTTCCTTAACAACAGAGTITACGACCCG
AAAGCCTTATCAGTACGCGCGGCTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATITGCGGAAGATTCCT
ACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCA
GGTCCGTCAGCAATCGTGTCCCTGGTITAGCCGTTACCTCACCACCTAGCTAATGCGGAGCGGG
GTCCATCCATAAGTGCAGCCGAAGCCGCTTCAATTCGAACCAATGCRGTTCAAATGTTA
TCCGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGAGTATCCCACTTATGGCAGGTTACCCAGGTTATA
CTCACCCTGCGCGCTAACCTTATAAGAGCAAGCTTAAATCCATTCGCTCGACTGCAATG
ATTAGGCACGCCCGCAGGTTATCTGAGCCAGGATCAAACCTT

```

Рис. 4. Секвенограмма штамма №14

```

AGTCTCCAGTKKCAATGACCCTCCACGGTIGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAA
ACCACCTGCGCGGCTTACGCCAATAATTCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC
GGCTGTGCGCAGTITAGCCGCTGGCTTTCGGTITAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCTTATTC
AACTAGCAGTGTTCCTTAACAACAGAGTITACGACCCGAAAGCCCTTATCAGTACCTACCGC
GGCTGTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATITGCGGAAGATTCCTACGTCGCTCCCGTAGGAG
TCTGGCCGTGTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTGCGGCTAGCAGTGTGCTG
CTTGGTITAGCCGTTACCTCACCACCTAGCTAATGCGGAGCGGGTCCATCCATAAGTGCAGC
CGAAGCCGCTTTCATITTCGAACCAATGCRGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCGGTTT
CCGGAGTATCCCACTTATGGCAGGTTACCCAGTGTACTCACCCTGCGCGCTAACCT
TATAAGAGCAAGCTTAAATCCATTCGCTCGACTGCAATGATTAGGCACGCCCGCAGGCTT
CATCTTGCAGCCAGGATCAAACCTT

```

Рис. 5. Секвенограмма штамма №22

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемые штаммы № 1, 6, 9, 14 и 22 принадлежат к следующим систематическим группам: Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Bacillus*; *Bacillus cereus* group.

Для уточняющей идентификации исследуемых штаммов проводили ПЦР с использованием видоспецифических праймеров, результаты которой представлены в таблице 2.

Таблица 2

Праймеры, использованные при проведении ПЦР для уточняющей идентификации штаммов № 1, 6, 9, 14 и 22

Вид	Праймеры
<i>Bacillus thuringiensis</i>	BТf atcggtgatacagataagact BТr ccttcatacgtatgaatattatt
<i>Bacillus cereus</i>	BCf attggtgacaccgatcaaca BCr tcatacgtatggatgttattc
<i>Bacillus anthracis</i>	BAf aatcgtaataataaactgacg BAr ccttcatacgtgtgaatgttg

128

На рисунке 6 представлены электрофореграммы, полученные в результате ПЦР штаммов № 1, 6, 9, 14 и 22 с использованием видоспецифических праймеров.

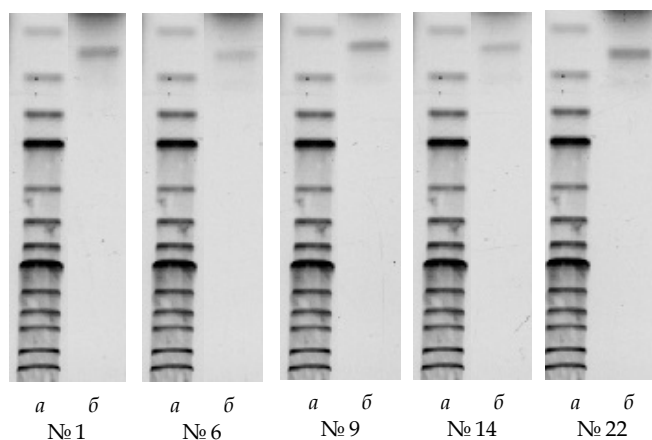


Рис. 6. Продукты ПЦР с использованием видоспецифических праймеров: а – Маркер O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п. н., сверху вниз); б – анализ исследуемых штаммов с использованием праймеров BCf и BCr, специфических для *Bacillus cereus*

Наработка фрагментов размером 364 п.н. при использовании видоспецифических праймеров BCf и BCr указывает на принадлежность штаммов № 1, 6, 9, 14, 22 к виду *Bacillus cereus* (гомология 99 %).

Секвенограммы штаммов № 7 и 8 представлены на рисунках 7 и 8 соответственно.



```

CCACKGTGAGCCGTGGGCTTCACATCAGACTAAGAAACCGCCTGCGCGCTTACGCC
AATAATCCGGATAACCGTTCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCAGTGTAGCCGT
GGCTTTCGGTATAGGTACCGTCAAGGTACRAGCAGTACICTYGTACTIGTICTTCCAA
CAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTACCGCGCGTTCCTCGTACAGACTTC
ATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCCTCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCAGT
GGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTATGCATCGTTCCTGGTGGAGCCGTACCTACCAACT
AGCTAATGCACCCGGGCCATCTGTAAGTATAGCCGAAACCATCTTCAATCATCCCAT
GAAGGAGAAGATCTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTATCCAGTCTACAGGCA
GGTTGCCACGTGTACTACCCGTCCCGCTAACGTATAGAAGCAAGCTTCAATCAGT
CGCTCGACTTGCATGATTAGGCACGCCCGCAGCGTTCATCTCGAGCCAGGATCAAATCTAA

```

Рис. 7. Секвенограмма штамма №7

```

CCACKGTGAGCCGTGGGCTTCACATCAGACTAAGAAACCGCCTGCGCGCTTACGCC
CAATAATCCGGATAACCGTTCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCAGTGTAGCC
GTGGCTTTCGGTATAGGTACCGTCAAGGTACAAGCAGTACTCTGTACTTGTCTTCCCTAA
CAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTACCGCGCGTTCCTCGTACAGACTTC
GTCCATTCGGGAAGATTCCTACTGCTGCCCTCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCC
AGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTATGCATCGTTCCTGGTGGAGCCGTACCTCA
CAAATAGCTAATGCACCCGGGCCATCTGTAAGKATAGCCGAAACCATCTTCAATCA
TCTCCATGAAGGAGAAGATCTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTATCCAGKC
TTACAGGCAGGTGCCACGTGTACTACCCGTCCCGCTAACGTATAGAAGCAAGCTT
SIAATCAGTTCGCTCGACTTGCATGATTAGGCACGCCCGCAGCGTTCATCTCGAGCCAGGT
CAAATCTAA

```

Рис. 8. Секвенограмма штамма №8

Скрининг по базе данных GenBank показал, что штаммы №7 и 8 принадлежат к следующим систематическим группам: Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Priestia*. Обработка сиквенов при помощи программы BLAST показала, что они могут быть отнесены к нескольким видам рода *Priestia*. На основе проведенных исследований, а также биохимических тестов установлено, что штамм №7 наиболее близок к виду *Peribacillus acanthi* (98%), а штамм №8 — к виду *Bacillus zanthoxyli* (98%).

Результаты секвенирования переменных участков 16S рРНК штаммов №11 и 17 представлены на рисунках 9 и 10 соответственно.

```

CTCTCTGCACTCAGTTCAGTTCCTCAATGACCCTCCCGGTGAGCCGGGGCTTCACAT
CAGACTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAATAATCCGGACAACGCTTGCACCT
ACGTATATCCCGCGCTGCGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCGGTATAGTTCACGTAAGG
GCAAGCAGTACSTTTCGACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCA
TCATCACCGCGCGTTCCTCGTACACTTTCGTCATTCGGGAAGATTCCTACTGCTGCCCT
CCGTAGGAGTCTGGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTACG
CATCGTCCGCTTGGTGGAGCGTACCTACCAACTAGCTAATGGCCCGGGTCCATCTGTAA
GTGACAGCCGAAACCGTCTTCACTCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAATATCCGTTATTAGC
TCCGGTTTCCCGGAGTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCAGGTGTACTACCCGTCCGC
CGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTCTGCTCCGCTCGACTTGCATGATTAGGCACGCCCGC
AGCTTCGCTCGAGCCAGGTCAAATC

```

Рис. 9. Секвенограмма штамма №11

```

CTCTCTGMCCTAAGCCTCCAGTTCCTCAATGACCCTCCCGGTGAGCCGTGGGCTTCACAT
CAGACTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAATAATCCGGACAACGCTTGCACCT
ACGTATATCCCGCGCTGCGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCGGTATAGTTCACGTAAGG
ACGGACAGTACTTCCGACTTGTCTTCCCTGACAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCT
TCATCACCGCGCGTTCCTCGTACACTTTCGTCATTCGGGAAGATTCCTACTGCTGCCCT
CCGTAGGAGTCTGGCCGCTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTACG
CATCGTTCGCTTGGTGGAGCGTACCTACCAACTAGCTAATGGCCCGGGTCCATCTGTAA
GYGACAGCTAAAGCCGCTTCCATCTCTTCAATGCGAAGAAAAGAAATATCCGGTATTAG
CCCGGTTTCCCGGAGTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCAGGTGTACTACCCGTCCGC
CCGCTAACATGAAACGGAAGCAAGCTCCGCTCAAGTCCGCTCGACTTGCATGATTAGGCACGC
CGCCAGCGTTCGCTC

```

Рис. 10. Секвенограмма штамма №17



Анализ штаммов №11 и 17 позволил установить их принадлежность к следующим систематическим группам: Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; *Bacillus*. Изучение гомологии для установления родства и проведение биохимических тестов показало, что микроорганизмы могут относиться к нескольким видам рода *Bacillus*, при этом штамм №11 оказался наиболее близок к виду *Peribacillus acanthi* (99%), а штамм №17 – к виду *Bacillus badius* (99%).

Таким образом, результаты проведенных молекулярно-генетических исследований позволили идентифицировать следующие виды бактерий, изолированных из микрофлоры растительного сырья Калининградской области (табл. 3).

Таблица 3

**Идентифицированные виды бактерий,  
выделенные из растительного сырья**

Вид	Источник
<i>Bacillus badius</i>	Оболочка семян сои тостированная
<i>Bacillus cereus</i>	Шрот семян конопли технической, оболочка семян и семена люпина белого, оболочка семян сои нетостированная
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	Оболочка семян люпина белого
<i>Peribacillus acanthi</i>	Оболочка семян люпина белого, семена каштана конского обыкновенного

Бактерии рода *Bacillus* являются известными продуцентами ферментов, в том числе, ксиланолитических. Их удобство использования в качестве промышленных продуцентов обусловлено непатогенностью, высокой скоростью роста, способностью выделять белки во внеклеточную среду [1; 2].

В работах [1; 2; 13–21] представлены исследования по получению ксиланазы с высокой ферментативной активностью с использованием таких видов *Bacillus*, как *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B. australimaris*, *B. tequilensis*, *B. thermoamylovorans*, *B. halotolerans*. В исследовании [1] представлены данные по скринингу 67 бактериальных изолятов, выделенных из гнилой соломы, почвы, пшеничных отрубей, нутового сырья, пшеничной соломы, яблочных выжимок, скорлупы арахиса и других растительных отходов. Восемь изолятов с наиболее высокой активностью ксиланазы были идентифицированы методом 16S рРНК как бактерии вида *Bacillus*.

В работе [22] сообщается о выделении из почвы штамма *Bacillus cereus*, продуцирующего внеклеточную ксиланазу. Оптимальная температура и рН очищенной ксиланазы составили 40 °С и 6,0 соответственно. Ксиланаза не проявляла целлюлазную активность. В публикации [23] также описано получение ксиланазы из штамма *Bacillus cereus* L-1, которая проявляла наибольшую активность при температуре 60 °С и рН 6,5. В ис-





следовании [24] представлены данные о термостабильной ксиланазе, полученной при культивировании штамма *Bacillus cereus* на кукурузной шелухе с продуктивностью 2,2019 Ед/мл.

В работе [25] сообщается о выделении трех штаммов рода *Bacillus*, наиболее активных продуцентов ксиланаз, один из которых — *Bacillus badius* — производил щелочную ксиланазу с оптимальной температурой действия 50 °С. Ее выделение из штамма *Bacillus badius* описывается также в работе [26]. Штаммы *Bacillus zanthoxyli* и *Peribacillus acanthi* не были описаны как широко известные продуценты ксиланолитических ферментов.

### Выводы

131

Лигноцеллюлозное сырье, представляющее собой отходы и малоценное растительное сырье, такое как оболочка семян сои, шрот семян конопли технической, оболочка семян и семена люпина белого, семена каштана конского обыкновенного, является источником микроорганизмов, продуцирующих ксиланолитические ферменты. К синтезу наиболее активных ксиланаз оказались способны микроорганизмы, идентифицированные как *Bacillus badius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus zanthoxyli*, *Peribacillus acanthi*. Выделенные штаммы потенциально могут использоваться для промышленного синтеза ксиланаз, предназначенных для различных отраслей промышленности.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00091, <https://rscf.ru/project/23-26-00091/>.

### Список литературы

1. Güler F., Özçelik F. Screening of xylanase producing *Bacillus* species and optimization of xylanase process parameters in submerged fermentation // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2023. №51. P. 102801. doi: 10.1016/j.bcab.2023.102801.
2. Ammoneh H., Harba M., Akeed Y. et al. Isolation and identification of local *Bacillus* isolates for xylanase biosynthesis // *Iran J Microbiol*. 2014. №6(2). P. 127–132.
3. Dyshlyuk L., Ulrikh E., Agafonova S., Kazimirchenko O. Xylooligosaccharides from biomass lignocellulose: Properties, sources and production methods // *Reviews in Agricultural Science*. 2024. №12. P. 1–12. doi: 10.7831/ras.12.0\_1.
4. Dong C.-D., Tsai M.-L., Nargotra P. et al. Bioprocess development for the production of xylooligosaccharide prebiotics from agro-industrial lignocellulosic waste // *Heliyon*. 2023. №9 (7). P. 18316. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18316.
5. Калинина А.Н., Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Синеокий С.П. Скрининг и таксономическая характеристика бактериальных продуцентов ксиланаз // *Биотехнология*. 2017. №33 (6) С. 37–41. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-37-41. EDN: YMVDYR.
6. *PCR protocols – a guide to methods and applications* // ed. by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. L., 1990. P. 482.
7. *Каталог MBI Fermentas 1998/1999*. P. 146–157.
8. Pavlicek A., Hrdá S., Flegr J. Fre-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap / jackknife analysis of tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia* // *Praha*. 1999. №45 (3). P. 97–99.



9. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. №51. P. 1671 – 1679.
10. *Ribosomal Database Project II*. URL: <http://www.cme.msu.edu> (дата обращения: 05.07.2024).
11. *Subhashbhai P. A.* Isolation, identification and bioefficacy of native entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* from soil : diss. Anand, 2013.
12. *Vos P., Garrity G. M., Jones D. et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3 : The Firmicutes. Luxembourg, 2011.
13. *Ho L. H., Heng K. L.* Xylanase production by *Bacillus subtilis* in cost-effective medium using soybean hull as part of medium composition under submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SsF) // *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*. 2015. №2 (1). doi: 10.4172/2376-0214.1000143.
14. *Naz S., Irfan M., Farooq M. U.* Xylanase production from *Bacillus subtilis* in submerged fermentation using Box-Behnken design // *Pakistan J. Biotechnol.* 2017. №14. P. 151 – 156.
15. *Raj A., Kumar S., Singh S. K., Prakash J.* Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2018. №15. P. 199 – 209. doi: 10.1016/j.bcab.2018.06.018.
16. *Yardimci G. O., Cekmecelioglu D.* Assessment and optimization of xylanase production using co-cultures of *Bacillus subtilis* and *Kluyveromyces marxianus* // *3 Biotech.* 2018. №8 (7). P. 290. doi: 10.1007/2Fs13205-018-1315-y.
17. *Zhang Z., Raza M. F., Zheng Z. et al.* Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* ZY-1-1 reveals the genetic basis for its hemicellulosic/cellulosic substrate-inducible xylanase and cellulase activities // *3 Biotech.* 2018. №8. P. 465. doi: 10.1007/2Fs13205-018-1490-x.
18. *Ghosh A., Sutradhar S., Baishya D.* Delineating thermophilic xylanase from *Bacillus licheniformis* DM5 towards its potential application in xylooligosaccharides production // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. №35 (2). P. 34. doi: 10.1007/s11274-019-2605-1.
19. *Dutta P. D., Neog B., Goswami T.* Xylanase enzyme production from *Bacillus australimaris* P5 for prebleaching of bamboo (*Bambusa tulda*) pulp // *Mater. Chem. Phys.* 2020. №243. P. 122227. doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122227.
20. *Malhotra G., Chapadgaonkar S. S.* Taguchi optimization and scale up of xylanase from *Bacillus licheniformis* isolated from hot water geyser // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2020. №18. P. 0 – 8. doi: 10.1186/s43141-020-00084-0.
21. *Patel K., Dudhagara P.* Optimization of xylanase production by *Bacillus tequilensis* strain UD-3 using economical agricultural substrate and its application in rice straw pulp bleaching // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020. №30. P. 101846. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101846.
22. *Roy N., Rowshanul Habib M.* Isolation and characterization of xylanase producing strain of *Bacillus cereus* from soil // *Iranian Journal of Microbiology*. 2009. №1 (2). P. 49 – 53.
23. *Zhang G., Li Z., Chen G., et. al* Purification and characterization of the low molecular weight xylanase from *Bacillus cereus* L-1 // *Braz J Microbiol.* 2023. №54 (4). P. 2951 – 2959. doi: 10.1007/s42770-023-01129-5.
24. *Ayishal Begam M., Annu A., Shameera Banu S., Vishnu Priya D.* Comparison and optimization of thermostable xylanase production by *Bacillus pumilus* and *Bacillus cereus* using corn husk // *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*. 2015. №2 (9). P. 30 – 35. doi: 10.17148/IARJSET.2015.2907.



25. *Bhuvnesh Y., Khushboo C.* Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by three species of bacillus under submerged fermentation conditions // *Journal of Applied and Natural Science*. 2016. №8 (3). P. 1210–1213. doi: 1031018/jans.v8i3.942.

26. *Masngut N., Rajandran P., Damanhuri N.A.* Ultrasonic assisted fermentation for production of xylanase enzyme using locally isolated strain of *Bacillus badius* // *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2020. №991. P. 012008. doi: 10.1088/1757-899X/991/1/012008.

### Об авторах

Любовь Сергеевна Дышлок — д-р техн. наук, доц., Калининградский государственный технический университет, ведущий научный сотрудник УНИД, Россия.

E-mail: lyubov.dyshlyuk@klgtu.ru

ORCID: 0000-0002-7333-8411

SPIN-код: 4572-6823

Светлана Викторовна Агафонова — канд. техн. наук, доц., Калининградский государственный технический университет, Россия.

E-mail: svetlana.agafonova@klgtu.ru

ORCID: 0000-0002-5992-414X

SPIN-код: 2505-4522

Оксана Владимировна Казимирченко — канд. биол. наук, доц., Калининградский государственный технический университет, Россия.

E-mail: oksana.kazimirchenko@klgtu.ru

ORCID: 0009-0005-7197-0287

SPIN-код: 4671-6960

*L. S. Dyshlyuk, S. V. Agafonova, O. V. Kazimirchenko*

## MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF BACTERIAL ISOLATES – XYLANASE PRODUCERS

Kaliningrad State Technical University, Russia

Received 17 July 2024

Accepted 17 September 2024

doi: 10.5922/vestniknat-2024-4-9

**To cite this article:** Dyshlyuk L.S., Agafonova S.V., Kazimirchenko O.V., 2024, Molecular genetic identification of bacterial isolates – xylanase producers, *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №4. P. 123 – 134. doi: 10.5922/vestniknat-2024-4-9.

*Microbial xylanases are widely used across various industries, making the search for new microorganisms capable of producing these enzymes a highly relevant task. A source for isolating strains with xylanolytic activity is plant-based materials rich in hemicelluloses, such as lignocellulosic biomass. In the Kaliningrad region, such materials include the meal of industrial*



*hemp seeds (Cannabis sativa), seed hulls and seeds of white lupine (Lupinus albus), unroasted soybean hulls, roasted soybean hulls, granulated soybean hulls, and seeds of common horse chestnut (Aesculus hippocastanum). Among the 23 bacterial isolates obtained from the mentioned lignocellulosic materials, the highest xylanolytic activity was observed in nine strains. Based on morphological and staining characteristics, these strains were identified as Gram-positive spore-forming rods. Molecular genetic identification using the 16S rRNA method revealed that the strains belong to the species Peribacillus acanthi, Bacillus cereus, Bacillus zanthoxyli, and Bacillusadius. The identified microbial strains have the potential to be used as industrial producers of highly active xylanases, enabling the biodestruction of lignocellulosic biomass to produce valuable products.*

134

**Keywords:** xylanase, lignocellulose biomass, molecular genetic identification, *Bacillus*

#### The authors

Prof. Lyubov S. Dyshlyuk, Kaliningrad State Technical University, Russia.

E-mail: lyubov.dyshlyuk@klgtu.ru

ORCID: 0000-0002-7333-8411

SPIN-код: 4572-6823

Dr Svetlana. V. Agafonova, Associate Professor, Kaliningrad State Technical University, Russia.

E-mail: svetlana.agafonova@klgtu.ru

ORCID: 0000-0002-5992-414

SPIN-код: 2505-4522

Dr Oksana V. Kazimirchenko, Associate Professor, Kaliningrad State Technical University, Russia.

E-mail: oksana.kazimirchenko@klgtu.ru

ORCID: 0009-0005-7197-0287

SPIN-код: 4671-6960