

На правах рукописи



Букуру Лиз Криста

**β-ГАЛАКТОЗИДАЗА БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA FERGUSONII*: ВЫДЕЛЕНИЕ И
ХАРАКТЕРИСТИКА**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2020

Работа выполнена на кафедре биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор,
Багаева Татьяна Вадимовна

Официальные оппоненты:

Доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБИУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (г. Казань).

Фаизов Тагир Хадиевич

Кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии КГМА «Казанская государственная медицинская академия» (г. Казань).

Кипенская Лариса Викторовна

Ведущая организация :

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет». 424000, Республика Марий Эл (г. Иошкра-Ола).

Защита диссертации состоится «26» марта 2020 г. в 14.00 ч на заседании диссертационного совета КФУ.03.07 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18. (аудитория № 211).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу г. Казань, ул. Кремлевская 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «__» 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



О.А. Кравцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время, ферменты микроорганизмов широко используются во многих отраслях промышленности. Особенно актуально их применение в пищевой, фармацевтической и других биотехнологических производствах. Одним из таких ферментов является β -галактозидаза или β -D-галактозид-галактогидролаза или лактаза, (КФ 3.2.1.23). Данный фермент катализирует гидролиз лактозы с образованием двух сахаров: галактозы и глюкозы (Jayashree et al., 2012). β -галактозидаза (ЕС 3.2.1.2.3), участвует в углеводном обмене различных микроорганизмов, растений, животных и человека (Gopal et al., 2015, Swati et al., 2012). Основная его функция в организме млекопитающих - это гидролиз молочного сахара (лактозы) на моносахариды, которые затем легко усваиваются в кишечнике (Maksimainen et al., 2011; Maity et al., 2013; Gopalakrishnan et al., 2014). β -галактозидаза способна также выполнять трансферазную функцию, катализировать реакции трансгалактозилирования трансформируя лактозу в смесь галактоолигосахаридов различного состава (Nguyen et al., 2006, Liu et al., 2017). β -галактозидазы находят применение при решении экологических проблем, связанных с загрязнением окружающей среды отходами молочной промышленности (Maity et al., 2013).

Кроме того, значительное число отходов молочной промышленности после ферментативного гидролиза при участии β -галактозидаз могут быть использованы в качестве источников замены сахарозы в питательных средах, на глюкозу благодаря действию фермента. Продолжают оставаться актуальными и исследования, направленные на получение клинического препарата β -галактозидазы для людей с непереносимостью лактозы, а также работы по использованию, переработке и оптимизации процессов гидролиза лактозы молочных продуктов, в том числе с использованием ферментов различных кластеров.

В биотехнологическом производстве разработаны методы выделения и изучения данных ферментов из различных микроорганизмов (Princely et al., 2013; Omar et al., 2016). Однако вопрос поиска новых изолятов, в том числе среди патогенных и условно-патогенных штаммов, продуцирующих β -галактозидазу с высокой активностью и с необычными свойствами, остается актуальным направлением исследований.

Одним из источников новых продуцентов β -галактозидаз, можно рассматривать микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Разнообразное микробное сообщество, обитающее ЖКТ человека, обладает обширным метаболическим ресурсом. Активность данного микробного сообщества значительно возрастает при воспалительных заболеваниях.

Недавние исследования показали, что в основе воспалительных заболеваний ЖКТ, включая язвенный колит и заболевание Крона, лежит глобальное изменение состава кишечной микрофлоры, при этом, происходит характерное увеличение факультативных анаэробов за счет облигатных анаэробов, нарушаются процессы транскрипции, меняется пул метаболитов, уровень антител в сыворотке крови хозяина, наблюдаются значительные биохимические изменения (Lloed-Price et al., 2019). В случае с заболеванием Крона установлено также увеличение содержания патогенных и условно-патогенных бактерий, главным образом, семейства *Enterobacteriaceae* (Siniagina et al., 2019). Можно предположить, что при столь значительных не регулируемых условиях функционирования ЖКТ, включая язвенный колит и заболевание Крона, может наблюдаться процесс селекции ферментов, в сторону белков, обладающих стабильностью, устойчивостью к повышенной температуре и кислотности среды.

Такие свойства ферментов, включая β -галактозидазу, могут быть полезны и удовлетворять требованиям современных биотехнологических производств.

Целью данного исследования был поиск и выделение микроорганизмов с высокой β -галактозидазной активностью из микробиоты пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника: выделение, очистка и характеристика фермента.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать состав микрофлоры ЖКТ в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника, включая язвенный колит и Болезнь Крона;
2. Выделить и идентифицировать изолят бактерий из доминирующих видов микробиоты ЖКТ больного с заболеванием Крона;
3. Определить активность ферментов углеводного обмена у выделенного изолята и сравнить активность β -галактозидазы изолята с β -галактозидазой других микроорганизмов;
4. Оптимизировать условия роста выделенного изолята бактерий для максимальной продукции β -галактозидазы;
5. Получить высокоочищенную β -галактозидазу и изучить ее физико-химические свойства.

Научная новизна

Из желудочно-кишечного тракта больных с заболеванием Крона, впервые выделен новый штамм бактерий рода *Escherichia*, отнесенный на основании результатов молекулярно-генетического анализа к виду *Escherichia fergusonii* G2. Полученный изолят (*Escherichia fergusonii* E3), обладал высокой активностью ферментов углеводного обмена, по сравнению с другими штаммами микроорганизмов, в том числе, желудочно-кишечного тракта здоровых людей. Среди ферментов углеводного обмена у бактерии *Escherichia fergusonii* E3 была установлена наиболее высокая активность для фермента - β -галактозидазы.

В работе впервые проведены исследования динамики роста и образования β -галактозидазы бактериями *Escherichia fergusonii* E3. Осуществлен подбор питательной среды, обеспечивающий рост бактерий и синтез фермента. Разработана схема выделения и очистки β -галактозидазы.

Впервые показано, что бактерии *Escherichia fergusonii* E3 синтезируют фермент β -галактозидазу, активно гидролизующую лактозу и отличающуюся от β -галактозидаз других бактерий по молекулярной массе и ряду других показателей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в рамках диссертационной работы результаты по сравнительной характеристике ферментов углеводного обмена штаммов микроорганизмов ЖКТ здоровых людей и при воспалительных процессах, о динамике образования и физико-химических свойствах новых ферментов ЖКТ позволят расширить знания о биохимических процессах, протекающих в организме человека при патологиях ЖКТ.

Новый штамм бактерий *Escherichia fergusonii* E3 может быть использован для дальнейшего сравнительного изучения его взаимосвязи с воспалительными процессами, а также в качестве продуцента β -галактозидазы.

Предложенные в диссертации методы экстракции β -галактозидазы *Escherichia fergusonii* E3 и ее очистка, будут способствовать дальнейшей разработке схем получения β -галактозидаз других бактерий.

Полученная β -галактозидаза *Escherichia fergusonii* E3 активно гидролизует лактозу и может быть использована для очистки сточных вод молочной промышленности.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Желудочно-кишечный тракт пациентов с заболеванием Крона может быть источником новых термоустойчивых штаммов микроорганизмов и ферментов, отличающихся по физико-химическим свойствам от свойств ферментов микроорганизмов, выделенных из других природных источников.

2. Получен новый термотolerантный штамм *Escherichia fergusonii* E3 из ЖКТ больных с заболеванием Крона и β -галактозидаза *Escherichia fergusonii* E3, отличающееся от β -галактозидаз других бактерий по молекулярной массе, температурному оптимуму и способности активно гидролизовать лактозу.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается значительным объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и проанализированных с использованием современных высокоточных приборов, а также опубликованием полученных результатов в международных и отечественных журналах с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены на международных и всероссийских конгрессах и конференциях: 72-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых: конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород 23–26 апреля 2019 г), Итоговая научная конференция кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии (Казань, КФУ, 6 февраля 2019г). III Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (г. Казань, 29-31 октября 2018г). X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2017» (Казань, 25-28 октября 2017г). II Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (г. Казань, 20-23 сентября 2016г).

Место выполнения работы и личный вклад диссертанта

Работа выполнена на кафедре биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (2015-2019). Молекулярно-генетические исследования были проведены на базе междисциплинарного центра геномных и протеомных исследований Казанского федерального университета. Научным руководителем совместно с диссертантом была поставлена основная цель исследования, определены задачи, сформулированы выводы. Автором диссертации лично проанализированы и обработаны данные литературы, выполнены лабораторные исследования, проведены анализ и статистическая обработка полученных результатов, подготовлены публикации.

Связь работы с научными программами

Исследования данной работы были выполнены в соответствии с тематическим планом НИР Казанского (Приволжского) федерального университета «Проведение идентификации культивируемых на плотных средах микроорганизмов (Биотайпер-16)» на период 2016-2018 годы.

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 статьи в научных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации и входящих

в перечень базы данных WOS/Scopus, а также 6 тезисов и материалов докладов, представленных на Международных и Всероссийских конференциях и конгрессах.

Структура и объем диссертационной работы

Материалы диссертационной работы изложены на 146 страницах машинописного текста. Работа содержит 25 рисунков и 12 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, и списка литературы. Список литературы включает 212 источников, среди которых 36 отечественных и 176 зарубежных источников.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору Т.В. Багаевой; заведующей кафедрой биохимии, биотехнологии и фармакологии д.б.н., профессору Р.Г. Киямовой и всем сотрудникам кафедры. Автор очень благодарен своим родным и близким.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. В работе использовали образцы фекалий 3 условно-здоровых людей без признаков воспалительных заболеваний, 3 пациентов, страдающих неспецифическим язвенным колитом и 3 образцов от пациентов с подтвержденным диагнозом болезнь Крона. Образцы были отобраны врачами-гастроэнтерологами Университетской клиники КФУ (г. Казань) и переданы в лабораторию Института фундаментальной медицины и биологии в замороженном виде (при -20 °C) для дальнейшего изучения.

В работе также использовали культуры микроорганизмов, полученные из Всесоюзной коллекции музейных культур микроорганизмов (г. Пущино) -анаэробные бактерии *Clostridium pasteurianum BKM-B-1774*; бактерии и микромицеты, полученные из музея кафедры Биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ, КФУ - *Escherichia Coli*, *Trichoderma asperellum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium steckii*; микромицеты, полученные из музея кафедры аллергологии и микологии МГУ - *Alternaria alternata* и *Alternaria solani*, а также коммерческие препараты бактерий рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*.

В работе также использовали семена посевного гороха сорта Альбумен, и молоко «Очень важная корова 2,5%, ЗМК», Россия.

Микробиологические методы исследования. Культивирование микроорганизмов и количественный анализ анаэробной микрофлоры ЖКТ в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника, включая язвенный колит и Болезнь Крона, а также изучение ряда морфологических и физико-химических свойств выделенного изолята, осуществляли по принятым микробиологическим методам (Нетрусев и др., 2007).

Масс-спектрометрические и молекулярно-генетические анализы. Идентификация доминирующих изолятов бактерий, выделенных из микрофлоры ЖКТ при воспалительных заболеваниях кишечника, проводили с помощью масс-спектрометрического анализа, при использовании масс-спектрометра Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

Определение видовой принадлежности изолята из ЖКТ больного с заболеванием Крона осуществляли с помощью молекулярно-генетического анализа структуры нуклеотидной последовательности консервативных участков 16 S рРНК с использованием синтезированных универсальных прокариотических праймеров: прямого - (fD1) – 5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3' и обратного- (Rs16) – 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'

(James et al., 2006). Таксономическую принадлежность штамма устанавливали при помощи анализа нуклеотидных последовательностей консервативных фрагментов генов 16S рРНК, сравнивая их с аналогичными нуклеотидными участками эталонных организмов из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью программы BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Секвенирование полученного ампликона 16S рРНК выполнялось компанией «Евроген» г.Москва.

Физиолого-биохимические методы исследования. Сравнительный анализ активности ферментов углеводного обмена, таких как: α - и β -амилазы, α - и β -глюкозидазы, β -галактозидаза, целлюлаза и сахараз, осуществляли по методам Кенинга и Бисхангера (König et al., 2002; Биссвангер, 2010) Активность ферментов определялась, как в культуральной жидкости, так и в клеточных экстрактах штаммов бактерий.

Внутриклеточные ферменты получали по методу Прасада (Prasad et al., 2013). Общее содержание белков определяли по стандартному методу Лоури с использованием альбумина бычьей сыворотки (BSA) в качестве стандарта для построения калибровочного графика (Lowry et al., 1951).

β -галактозидазы *Escherichia fergusonii* E3 получали модифицируя методы, предложенные Стирсом и Хайруллиным с соавторами (Steers et al., 1971; Хайруллин и др., 2018).

Определение рН-оптимума β -галактозидазы проводили путем инкубации очищенного фермента с раствором 1% лактозы в буферных растворах с различными значениями рН от 3,0 до 10,0 при температуре 40 °С в течение 20 мин. В качестве буферных растворов использовали: 0,05 М глицин-HCl буфер, рН 3,0; 0,05 М ацетатный буфер, рН 4,0-6,0; 0,05 М натрий-фосфатный буфер рН 6,2-6,8; 0,05 М Tris-HCl буфер, рН 7,0 - 9,0 и 0,05 М глицин-NaOH буфер, рН 10,0 (Hsu et al., 2004; Princely et al., 2013). Диапазон стабильности фермента устанавливали при инкубации очищенного препарата β -галактозидазы в буфере с различными значениями рН (в диапазоне 3,0-10,0) в течение 20 минут при оптимальной температуре.

Оптимальную температуру фермента определяли путем инкубации очищенного фермента β -галактозидазы при температуре от 20 - 80 °С в течение 20 мин, при оптимальном значении рН 7,0. Диапазон термостабильности β -галактозидазы устанавливали определяя изменения активности фермента в течение 20 мин при температуре 20°C - 80°C.

Влияние ионов металлов на фермент определяли по изменения активности β -галактозидазы в присутствии различных металлов и хелатирующего соединения ЭДТА (натриевая соль) в концентрациях 5 - 20 мМ на основе 0,05M Tris-HCl буферного раствора (рН 7,0 -7,2) (Hsu et al., 2004; Chen et al., 2008).

Определение оптимальной концентрации субстрата при котором наблюдается максимальная активность фермента осуществляли с использованием лактозы в концентрации от 5 до 65 мМ в 0,05M Tris-HCl буферном растворе (рН 7,0 -7,2) в качестве субстрата. Для определения значений K_m и V_{max} , был использован метод двойных обратных величин по графику Лайнуивера-Берка для определения K_m и V_{max} (Princely et al., 2013).

Хроматографическая очистка препарата β -галактозидазы. Для проведения очистки β -галактозидазы *Escherichia fergusonii* E3 использовали хроматографическую систему низкого давления Bio-Rad BioLogic LP, включая хроматографические катриджи/колонки Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q объемом 5 мл производства компании Bio-Rad («Bio-Rad», США), предварительно уравновешенную 50 мМ Tris-буфером (рН 7,0). Элюировали β -

галактозидазу с колонки линейным градиентом концентрации NaCl 0→1М. Скорость элюирирующего потока 1 мл/мин.

Чистота полученной фракции β -галактозидазы была определена методом электрофореза в 10 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэммли (Laemmli, 1970).

Определение молекулярной массы β -галактозидазы. Молекулярную массу белка на электрофорограммах определяли с помощью сравнения подвижности фермента при электрофорезе с подвижностью стандартных маркерных белков с молекулярной массой от 10 - 250 кДа. Для определение молекулярной массы β -галактозидазы в нативных условиях была использована гель-фильтрация на колонке Superose 12 10/300 GL.

Ферментативный гидролиз лактозы молока. Определение эффективности гидролиза лактозы в молоке β -галактозидазой проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Хроматография проводилась на колонке Supelcosil LC-NH₂ 58338 25cm × 3.0cm. Элюент – ацетонитрил - вода(об/об). Регистрацию фракций моносахаридов осуществляли рефракционным детектором Refractive Index Detector Waters.

Математическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов осуществляли в программе электронных таблиц. В таблицах и на графиках представлены среднее арифметические данные ± 2 стандартных отклонений (mean \pm 2SD), т.е 95% доверительный интервал для генеральных среднего. Для сравнения вариантов использовали критерий Стьюдента, принятый в работе уровень значимости $p < 0,05$. Для выявления связи применяли корреляционный анализ, рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена и оценивали его значимость (Акберова и др., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение общего содержания анаэробных бактерий микрофлоры ЖКТ в норме, при неспецифическом Язвенном колите и при болезни Крона

Для выделения нового продуцента из ЖКТ, первоначально необходимо было охарактеризовать объекты изучения по общему содержанию анаэробных бактерий в норме и при патологии.

Изучение образцов микрофлоры ЖКТ в норме, при неспецифическом язвенном колите и при болезни Крона на общее содержание анаэробных микроорганизмов показало, что исследуемые образцы отличаются по численности микроорганизмов (табл.1).

Таблица 1. Определение общего количества анаэробных бактерий в образцах фекалий в норме и при патологии

№	Варианты опыта	Общее количество КОЕ/г образца $\times 10^{10}$
1.	Норма	$6,42 \pm 1,4$
2.	Неспецифический язвенный колит	$7,1 \pm 2,1$
3.	Болезнь Крона	$11,0 \pm 2,8^*$

Сравнительный корреляционный анализ показал, что при воспалительных заболеваниях ЖКТ в образцах фекальных масс наблюдается значимое повышение численности анаэробной микрофлоры, причем, чем тяжелее был воспалительный процесс, тем большее число бактерий обнаруживалось в образцах ЖКТ ($r_s=0,92$, $p<0,01$). Таким образом, чем

интенсивнее в организме человека происходит воспалительный процесс, тем большее количество микроорганизмов обнаруживается в ЖКТ.

2. Определение доминирующих видов микроорганизмов при воспалительных заболеваниях ЖКТ

Среди выросших колоний, полученных в результате посева образцов фекалий больных с неспецифическим язвенным колитом и с заболеванием Крона, были выбраны наиболее распространенные по морфологическим признакам колонии для выделения изолятов микроорганизмов. Их дальнейший многократный пересев позволил получить 30 штаммов бактерий, которые исследовали с помощью масс-спектрометрического анализа (табл. 2).

Таблица 2. Масс-спектрометрический анализ изолятов бактерий ЖКТ с использованием масс-спектрометра Bruker Daltonik MALDI Biotyper

Название изолята	ID изолята	Организм (лучшее совпадение)	Значение Score Value	Организм (второе лучшее совпадение)	Значение Score Value
<u>C1</u> (+++)(A)	C1	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.435</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.364</u>
<u>C2</u> (+++)(A)	C2	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.632</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.518</u>
<u>C3</u> (+++)(A)	C3	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.44</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.298</u>
<u>C4</u> (+++)(A)	C4	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.425</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.423</u>
<u>C5</u> (+++)(A)	C5	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.433</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.332</u>
<u>C6</u> (+++)(A)	C6	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.519</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.508</u>
<u>C7</u> (+++)(A)	C7	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.316</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.255</u>
<u>C8</u> (+)(B)	C8	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.919</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.918</u>
<u>C9</u> (-)(C)	C9	пики не найдены	<u><0</u>	пики не найдены	<u><0</u>
<u>C10</u> (+++)(A)	C10	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.466</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.365</u>
<u>C11</u> (++)(A)	C11	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.131</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.11</u>
<u>C12</u> (+)(B)	C12	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.976</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>1.902</u>
<u>D2</u> (+++)(A)	D2	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.447</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.397</u>

<u>D3</u> (++) (A)	D3	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.297</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.291</u>
<u>D4</u> (-) (C)	D4	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>D5</u> (++) (A)	D5	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.286</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.237</u>
<u>D6</u> (+++) (A)	D6	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.502</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.494</u>
<u>D7</u> (++) (A)	D7	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.293</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.253</u>
<u>D8</u> (+++) (A)	D8	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.478</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.456</u>
<u>D9</u> (+++) (A)	D9	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.411</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.394</u>
<u>D10</u> (+++) (A)	D10	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.323</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.319</u>
<u>E2</u> (-) (C)	E2	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>E3</u> (-) (C)	E3	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>E4</u> (-) (C)	E4	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>E5</u> (-) (C)	E5	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>E6</u> (-) (C)	E6	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>E7</u> (-) (C)	E7	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>E8</u> (-) (C)	E8	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>E9</u> (-) (C)	E9	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>
<u>E10</u> (-) (C)	E10	пики не найдены	<u>≤0</u>	пики не найдены	<u>≤0</u>

Использовали следующие критерии оценки результата MALDI-TOF масс-спектрометрии: коэффициент < 2 – вид и род определены с точностью 100%; 1,8–1,99 – 100% определение рода, неуверенное определение вида; $> 1,79$ – сомнительное определение рода.

Результаты исследований показали, что из 30 выделенных проанализированных штаммов более 57-59 % принадлежат к виду *E.coli*, как для больных с заболеванием язвенного

колита, так и для больных с заболеванием Крона. Значительное увеличение числа клеток кишечной палочки в процессе воспалительных заболеваниях ЖКТ отмечалось и в ранее проведенных исследованиях (Zhou et al., 2016; Zuo et al., 2018).

3. Выделение и идентификация изолята из доминирующих бактерий больных с заболеванием Крона

Поскольку, большинство штаммов *E.coli* являются условно-патогенными микроорганизмами, их использование в качестве биотехнологических продуцентов затруднено, поэтому было решено исследовать один из не идентифицированных, но наиболее активно растущий в факультативно анаэробных условиях изолят бактерий (Е3), выделенный из ЖКТ больных с заболеванием Крона.

Микробиологическое исследование изолята показало, что это короткие грамотрицательные палочки, с закругленными концами, не образующие спор, подвижные, имеющие капсулу. Несмотря на отсутствие спор, изолят выдерживал кипячение в течение 15-20 мин. Активный рост бактерий наблюдался, как при 37°C, так и при температуре 50°C. Таким образом, было установлено, что выделенный изолят является термотоллерантным штаммом.

Исследование гемолитической активности изолята на кровяном агаре при температурах 37°C и 50°C показало, что изолят обладает гемолизирующей активностью.

Выделенный изолят не синтезировал токсические соединения, поскольку культуральная жидкость и клеточный экстракт после роста изолята в течение 48 часов не оказывал влияние на всхожесть семян (Фокина и др., 2012).

Исследование физиологических свойств исследуемого изолята Е3 показало, что он проявлял каталазную активность, но был оксидазо-негативным видом. Изолят проявлял положительную реакцию на глюкозу, сахарозу, мальтозу, арабинозу, лактозу целобиозу, сорбит и ксилозу.

С целью дальнейшей идентификации изучаемого штамма было проведено определение его видовой принадлежности на основании молекулярно-генетического анализа консервативных участков 16 S рРНК. Видовую принадлежность выделенного изолята определяли путем анализа полученной нуклеотидной последовательности с помощью пакета программ BLAST, сравнивая с известными последовательностями из международного банка данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Процент гомологии нуклеотидных последовательностей выделенного изолята с видами микроорганизмов, представленными в базе данных NCBI, показал, что наибольшее сходство изучаемого изолята Е3, соответствует виду *Escherichia fergusonii* G2 (рис.1). Процент соответствия составил 99.34 единицы.

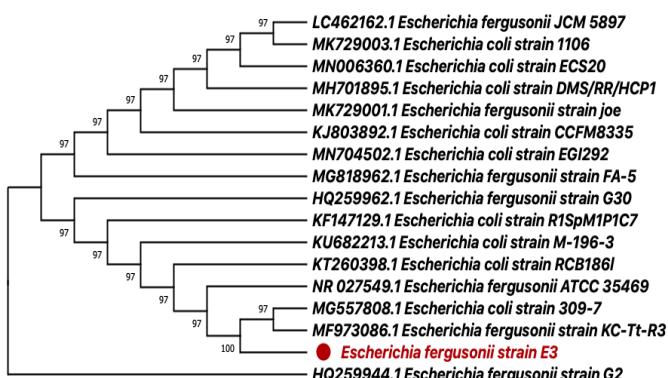


Рисунок 1. Филогенетическое древо, построенное на основании последовательности гена 16S рРНК, показывающее связь между *Escherichia fergusonii* E3 и другими микроорганизмами с использованием программы MEGA- Maximum parsimony.

Таким образом, из фекальных масс больных с заболеванием Крона был выделен новый штамм, который принадлежал к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia* и виду *Escherichia fergusonii*, штамм - E3.

По структуре нуклеотидной последовательности гена 16S рибосомальной РНК (16S пРНК) штамм *Escherichia fergusonii* E3 был депонирован под номером MN897670 в базе данных GenBank.

Из литературы известно несколько штаммов *Escherichia fergusonii*, выделенных из крови, мочи и фекалий здоровых людей, а также при воспалительном заболевании из мочевыводящих путей (Farmer et a., 1985; Glover et al., 2017; Parin et al., 2018). Однако выделение *Escherichia fergusonii* из ЖКТ больных с заболеванием Крона проведено впервые. Особенностью данного изолята является его термоустойчивость по сравнению с известными бактериями рода *Escherichia*.

4. Сравнительное определение активности ферментов углеводного обмена у бактерий *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli*

Поскольку изолят бактерий был получен из образцов ЖКТ больных с заболеванием Крона, представляло интерес исследовать его некоторые физиологические особенности по сравнению с известным и широко распространенным видом нормальной микробиоты ЖКТ, а именно *Escherichia coli*. Одним из главных метаболических процессов клеток является углеводный обмен, поэтому характеризую данный штамм, было решено исследовать ферменты углеводного обмена. В экспериментах было исследовано 7 различных ферментов, таких как α - и β -амилазы, α - и β -глюкозидазы, β -галактозидаза, целлюлаза и сахараза. Активность ферментов определялась, как в культуральной жидкости, так и в клеточных экстрактах штаммов бактерий.

Как показали исследования активность большинства ферментов углеводного обмена у изолята *Escherichia fergusonii* E3, выделенного из ЖКТ больных с заболеванием Крона, была значительно выше активности ферментов углеводного обмена штамма *Escherichia coli*, выделенного из ЖКТ здоровых людей (рис.2).

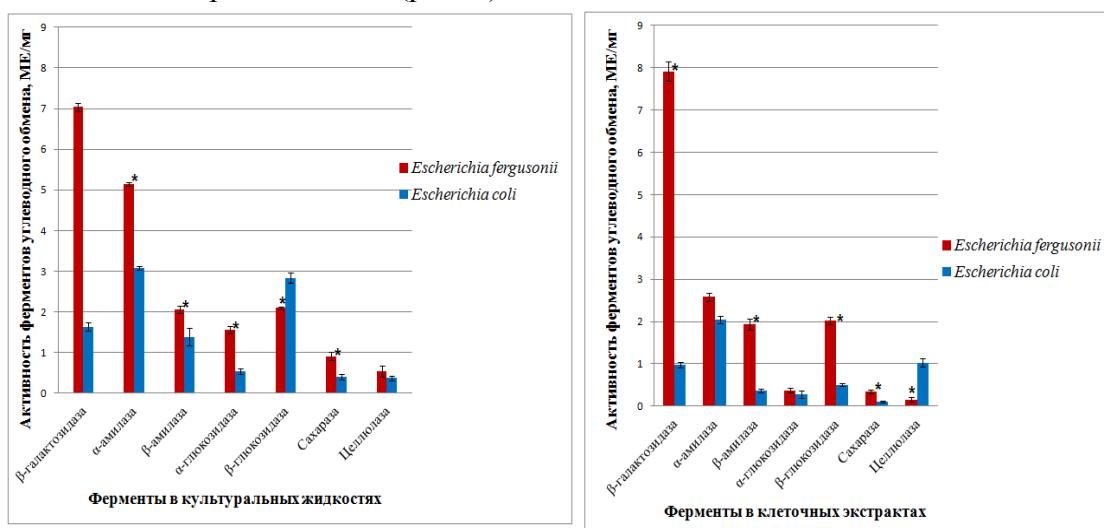


Рисунок 2. Определение активности ферментов углеводного обмена у *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli*. Результаты представлены в виде среднего значения \pm 2 стандартных отклонения, (n = 3), * p < 0,05

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что среди изученных ферментов наибольшая удельная активность наблюдалась у фермента β -галактозидазы

Escherichia fergusonii E3 ($7,92\pm0,22$ МЕ/мг), поэтому далее было решено провести сравнительное изучение активности данного фермента с другими известными продуцентами β -галактозидаз.

5. Скрининг микроорганизмов по способности к синтезу β -галактозидаз

В сравнительных экспериментах по скринингу способности различных микроорганизмов синтезировать активную β -галактозидазу использовали музейные культуры бактерий и микромицетов и выделенные из природных источников (табл.3).

Таблица 3. Определение β -галактозидазной активности в различных штаммах бактерий и микромицетов

Вид	Активность β -галактозидазы, МЕ/мл	
	Культуральная жидкость	В клеточных экстрактах
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	$2,85\pm0,07$	$3,17\pm0,15$
<i>Bifidobacterium spp.</i>	$3,03\pm0,07$	$3,67\pm0,23$
<i>Escherichia fergusonii</i>	$5,49\pm0,32^*$	$5,65\pm0,05^*$
<i>Escherichia coli</i>	$1,72\pm0,03$	$0,89\pm0,20$
<i>Clostridium pasteurianum BKM-B-1774</i>	$4,18\pm0,17^*$	$4,65\pm0,05^*$
<i>Lactobacillus spp.</i>	$2,83\pm0,12$	$3,25\pm0,01$
<i>Alternaria alternata</i>	$3,25\pm0,19^*$	$2,12\pm0,11^*$
<i>Alternaria solani</i>	$0,47\pm0,07$	$0,26\pm0,03$
<i>Trichoderma Asperellum</i>	$0,42\pm0,02$	$0,26\pm0,09$
<i>Penicillium crustosum</i>	$1,32\pm0,06$	$0,68\pm0,04$
<i>Penicillium steckii</i>	$2,03\pm0,11$	$1,25\pm0,06$

Результаты представлены в виде среднего значения ± 2 стандартных отклонения, ($n = 3$), $^* p < 0,05$

Результаты исследований показали, что практически все исследуемые штаммы способны к синтезу данного фермента. Среди исследуемых бактерий наиболее высокой β -галактозидазной активностью обладали бактерии выделенного изолята *Escherichia fergusonii E3*, после суточного роста которых активность фермента составляла $5,49\pm0,32$ МЕ/мл в культуральной жидкости и $5,65\pm0,05$ МЕ/мл в клеточном экстракте. Достаточно высокая активность β -галактозидазы в культуральной жидкости и в клеточном экстракте наблюдалась у анаэробной бактерии *Clostridium pasteurianum BKM-B-1774*. Однако активность фермента данных бактерий была в 1,2-1,3 значительно ниже ($p < 0,05$), чем у представителя семейства *Enterobacteriaceae*. Наиболее низкая β -галактозидазной активность была выявлена у бактерий *Escherichia coli*, бактерии рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus spp.*, как в клеточных экстрактах, так и в культуральной жидкости. Микромицеты также синтезируют β -галактозидазы, но активность их была ниже, чем у бактерий. Наибольшая β -галактозидазная активность была

установлена у *Alternaria alternata*, которая составляла $3,25 \pm 0,19$ МЕ/мл после 5 суточного роста культуры.

Таким образом, скрининг микроорганизмов показал, что наиболее перспективными продуцентами β -галактозидаз являются бактерии рода *Escherichia*, именно *Escherichia fergusonii E3*.

6. Динамика роста и образования β -галактозидазы бактериями *Escherichia fergusonii E3*

Изучение динамики образования β -галактозидазы бактериями рода *Escherichia fergusonii E3* проводили на среде МПБ, поскольку данная среда наиболее благоприятна для роста бактерий рода *Escherichia*. Активный прирост биомассы наблюдался, после 12 часов культивирования бактерий и достигал максимальных значений на 24 часа (рис. 3). Количество биомассы в этот период составило $6,33 \pm 0,24$ г/л. Параллельно с ростом биомассы происходит значительное увеличение β -галактозидазной активности, которая на 24 часа составляет $5,49 \pm 0,32$ МЕ/мл (рис. 3). Через 36 часов культивирования бактерии рост популяции клеток начинал уменьшаться ($p < 0,05$), а через 48 часов снижался в 1,6 раз по сравнению с показателями, полученными на 24 часа культивирования. По мере снижения роста бактерий на 36 часов и 48 часов частично наблюдается и значимое снижение активности фермента, которая в данные периоды времени составляет $4,16 \pm 0,17$ МЕ/мл ($p < 0,05$) и $3,79 \pm 0,02$ МЕ/мл ($p = 0,496388$, $p > 0,05$).

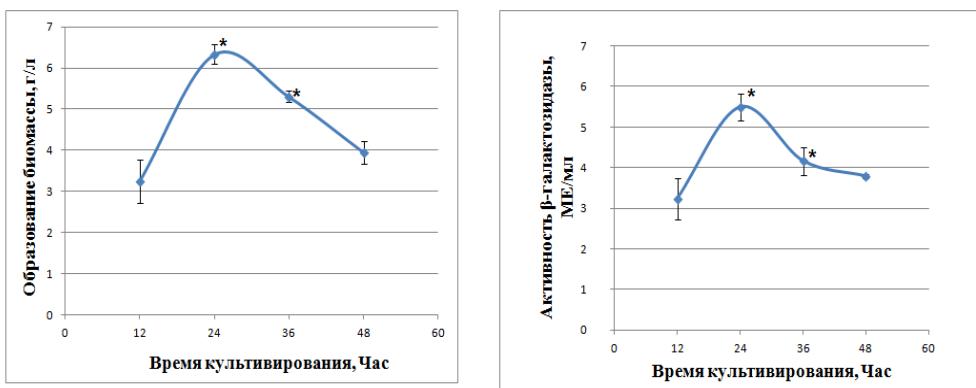


Рисунок 3. Динамика роста и синтеза фермента β -галактозидазы бактерии *Escherichia fergusonii E3*. Результаты представлены в виде среднего значения ± 2 стандартных отклонения, ($n = 3$), * $p < 0,05$

Таким образом, было установлено, что динамика образования β -галактозидазы бактерией *Escherichia fergusonii E3* связана с процессом роста бактерий и накоплением ими биомассы.

7. Подбор оптимальной среды для роста и образования β -галактозидазы бактериями *Escherichia fergusonii E3*

Несмотря на то, что бактерии хорошо росли и синтезировали β -галактозидазу на МПБ, необходимо было подобрать наиболее оптимальные условия для повышения данных показателей. С этой целью проводилось исследование по влиянию внесения в питательную среду дополнительных соединений.

Первоначально было исследовано действие различных сахаров, которые вносились в среду культивирования в концентрациях (15-25 г/л).

Результаты исследования, показали, что наиболее активный рост бактерий и накопление β -галактозидазы наблюдалось на среде с добавлением лактозы. Наибольший

прирост биомассы (в 2 раза), $p < 0,05$, наблюдался при концентрации углевода 20,0 г/л, по сравнению с контролем. Однако удельная активность фермента значительно увеличивалась, $p < 0,05$. Снижение или повышение концентрации лактозы в среде культивирования приводило к понижению активности β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* ($p < 0,05$).

Внесение глюкозы в среду культивирования приводило также к значительному повышению прироста биомассы при концентрации углевода 20 г/л ($p < 0,05$), но активность β -галактозидазы снижалась в 1,3 раза ($p < 0,05$). Снижение активности β -галактозидазы наблюдалось также и при добавлении в среду культивирования бактерий и других сахаров, таких как галактоза и сахароза. Снижение активности β -галактозидазы при внесении глюкозы и галактозы, по-видимому, связано с негативной регуляцией активности фермента, конечными продуктами его гидролиза, а именно глюкозой и галактозой. Действие сахарозы, по-видимому, также связано гидролизом углевода с образованием глюкозы и фруктозы. Таким образом, глюкоза способствовала росту бактерий *Escherichia fergusonii E3*, но снижала активность фермента ($p < 0,05$).

Кроме углеродного питания, значительное влияние на рост микроорганизмов оказывает присутствие в питательной среде различных источников азота. В наших экспериментах мы изучали дополнительное внесение в питательную среду нитрата аммония, нитрата натрия и сульфата аммония в различных концентрациях. Однако результаты наших исследований показали, что добавление в среду дополнительных источников неорганического азота, в виде сульфата аммония и азотокислого натрия, незначительно повышало рост клеток и накопление биомассы ($p > 0,05$), однако значительно снижала β -галактозидазную активность ($p < 0,05$). Дополнительное внесение в питательную среду азотокислого кальция в концентрациях 10-20 г/л также значительно снижало, как рост клеток, так и β -галактозидазную активность ($p < 0,05$).

Для многих микроорганизмов отмечается увеличение роста и накопления биомассы при внесении таких факторов роста как аминокислоты. В наших экспериментах мы проверили влияние аминокислот на рост и активность β -галактозидазы бактериями *Escherichia fergusonii E3*. Аминокислоты вносили в питательную среду в концентрации (100 – 200 мкг/мл).

Результаты исследований показали, что прирост биомассы *Escherichia fergusonii E3* наблюдался при внесении аспарагина в концентрации 150 мкг/мл ($p < 0,05$) и глицина и метионина в концентрации 200 мкг/мл ($p > 0,05$). Однако активность β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* при внесении аспарагина оставалась на уровне близком к контролю ($p > 0,05$), а при внесении глицина и метионина – снижалась ($p < 0,05$).

Таким образом, для культивирования бактерий *Escherichia fergusonii E3* и образования ими активной β -галактозидазы можно рекомендовать использовать питательную среду МПБ с добавлением лактозы 20 г/л, а в качестве дополнительного фактора роста – аспарагин в концентрации 150 мг/л.

8. Выделение и очистка β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*

Для получения фермента необходимо было разработать и стандартизировать схему выделения данного белка.

Поскольку более высокая активность фермента наблюдалась в клеточных экстрактах, необходимо было подобрать условия разрушения клеток *Escherichia fergusonii E3*, которые позволили бы выделить фермент без потери активности. В работе использовали разрушение клеток лизоцимом, лизоцимом с ЭДТА, лизоцимом и ультразвуком, твином 20 и стеклянными бусами.

Самая высокая активность фермента β -галактозидазы сохранялась когда разрушение клеток проводилось в буферном 50 мМ растворе Tris-HCl (pH 8,0) с использованием лизоцима и с последующей обработкой ультразвуком. Активность фермента оставалась на высоком уровне и составляла $5,87 \pm 0,06$ МЕ/мл.

Следующим этапом выделения и очистки фермента было осаждение белков клеточного экстракта насыщением водной фракции сульфатом аммония до концентрации соли 50% и последующим диализом в течение 24 часов при 4°C. Степень очистки фермента составила – 5,78 ед (табл.4).

После осаждения белков и диализа против 50мМ буферного раствора далее фермент наносили на анионообменную колонку с Mini Macro-Prep High Q наполнителем (Bio-Rad,США) (рис. 4.)

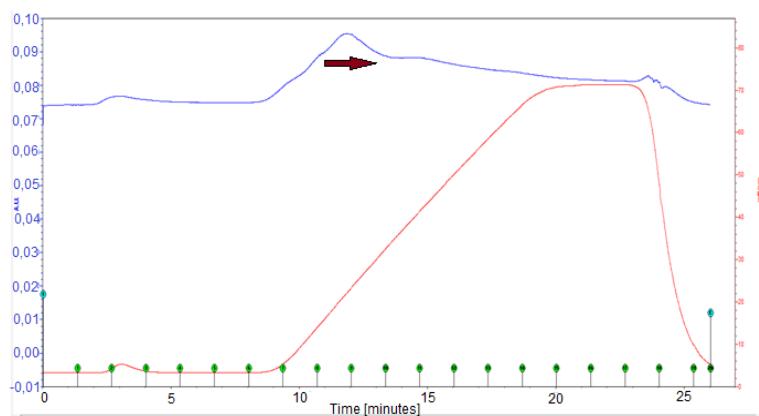


Рисунок 4. Хроматограмма β -галактозидазы бактерии *Escherichia fergusonii* E3 после ионообменной хроматографии на колонке Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q, уравновешенной 0,05M Tris-HCl буфером. Стрелкой показана фракция, обладающая β -галактозидазной активностью.

Проведенная хроматографическая очистка фермента позволила получить β -галактозидазу со степенью очистки 20,78 ед. и удельной активностью $9,35 \pm 0,13$ МЕ /мг, выход фермента составил 15,3% (табл.4).

Таблица 4. Выделение и очистка β -галактозидазы из сырого экстракта бактерии *Escherichia fergusonii*

Очистка	Объем, мл	Белок мг/мл	Общий белок, мг	Активность, МЕ/мл	Общая активность, МЕ	Удельная активность, МЕ/мг	Степень очистки	Выход, %
Сырой экстракт	20	12,96	259,20	5,87	117,4	0,45	1	100
Высаливание 50%(NH_4) ₂ SO_4	3,65	2,96	10,80	5,13	18,72	1,73	3,84	15,95
Диализ	3,5	2,04	7,14	5,30	18,55	2,60	5,78	15,8
Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q	3	0,64	1,92	5,98	17,94	9,35	20,78	15,28

9. Определение степени чистоты и молекулярной массы β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*

Степень чистоты выделенной β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* была подтверждена наличием одной полосы на электрофореграммах, полученных методом электрофореза в 10 % полиакриламидном геле, в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) (рис.5).

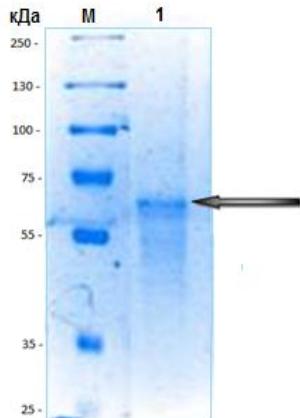


Рисунок 5. Электрофореграмма очищенного препарата β -галактозидазы окрашенного красителем Кумасси R – 250: M - маркерные белки Benchmark™ PageRuler Prestained Protein Ladder фирмы e.invitrogen с молекулярной массой от 10 до 250 kDa; 1 - β -галактозидаза после ионообменной хроматографии (колонка Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q). Стрелкой показана β -галактозидаза изолята *Escherichia fergusonii E3*.

Молекулярная масса полученного белка на электрофореграммах составила $73,58 \pm 1,62$ кДа. Поскольку молекулярная масса определялась в денатурирующих условиях, необходимо было уточнить данные показатели в нативных условиях. С этой целью была проведена гельфильтрация белка на Superose 12 10/300 GL, которая показала, что масса нативного белка β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* составляет $147,38 \pm 1,07$ кДа (рис.6).

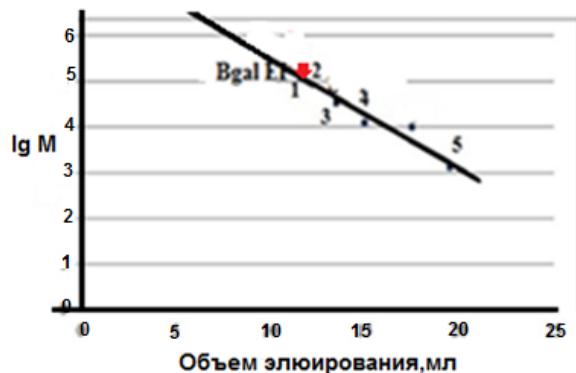


Рисунок 6. Определение молекулярной массы β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*: 1- IgG (150,0 кДа), 2 -бычий сывороточный альбумин (67,0 кДа), 3-лактальбумин (35,0 кДа), 4-цитохром С (12,7 кДа), 5-витамин В12 (1,35 кДа).

Поскольку в нативных условиях молекулярная масса β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* находилась в пределах $147,38 \pm 1,07$ кДа, а в денатурирующих - $73,58 \pm 1,62$ кДа, то можно утверждать, что изучаемый фермент имеет димерную структуру.

10. Исследование физико-химических свойств β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*

10.1. Определение рН-оптимума и диапазона стабильности β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*

Активность многих ферментов зависит от значений рН окружающей среды. В наших экспериментах было показано, что оптимальное значение рН для активности β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* соответствовало значениям 7,0-7,2 (рис. 7.-А.). При рН 6,5 и 7,5 β -галактозидазная активность незначительно снижалась на 18% и 5,8%, $p>0,05$, а при рН 6,0 и рН 8,0 - на 48% и 50% $p<0,05$, соответственно.

Определение рН-стабильности β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* показало, что фермент имеет достаточно узкий диапазон рН стабильности от 6,2 до 7,2 (рис. 7.-Б.).

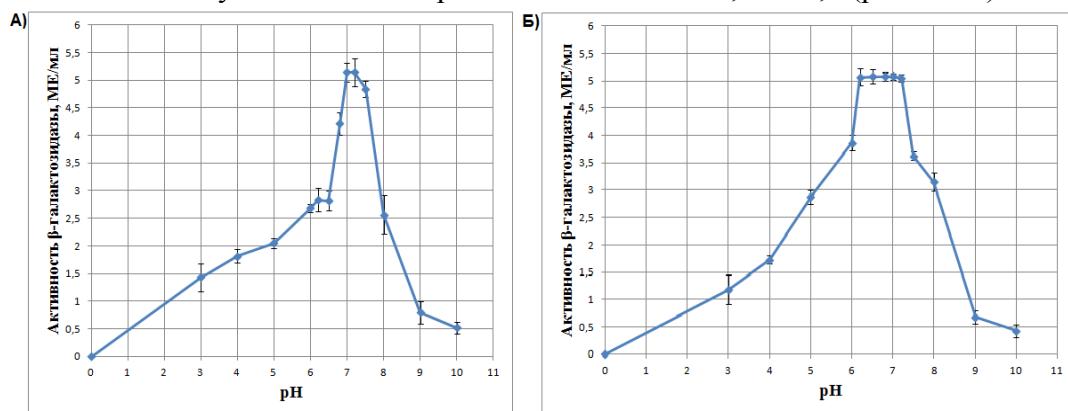


Рисунок 7. Определение рН-оптимума (А) и рН-стабильности (Б) β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*

Таким образом, результаты исследования показали, что β -галактозидаза бактерий *Escherichia fergusonii E3* обладает оптимумом рН 7,0-7,2 и диапазоном стабильности рН 6,2 - 7,2.

10.2. Определение температурного оптимума и термостабильности β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*

Определение температурного оптимума и термостабильности β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* показало, что ее максимальная активность наблюдалась при температуре 50°C (рис. 8.А.). Достаточно высокая активность фермента сохранялась и в диапазоне температур 40°C - 50°C (рис. 8. Б.)

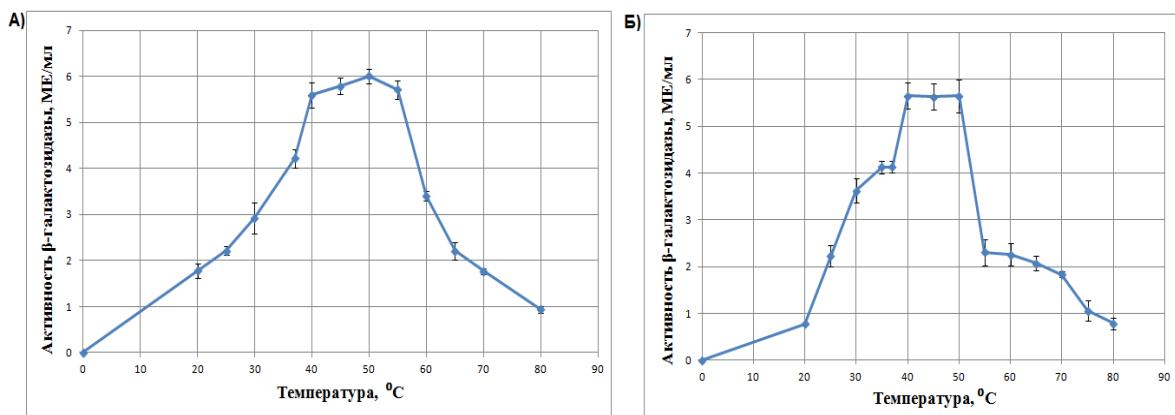


Рисунок 8. Температурный оптимум (А) и термостабильность (Б) фермента β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*

Данный показатель отличался от оптимальных значений температурного оптимума β -галактозидаз установленных для разных штаммов *E.coli*, который находился в пределах 30-35°C. В нашем варианте опыта дальнейшее снижение и повышение температуры приводило к значительной потери активности фермента ($p<0,05$). Необходимо отметить, что при температуре 37°C, т.е. нормальной температуре организма человека, активность фермента снижалась на 27%, $p<0,05$. Можно предположить, что при воспалительном процессе ЖКТ температура повышается, и начинают размножаться микроорганизмы и синтезироваться ферменты более устойчивые к температуре.

Таким образом, результаты исследования показали, что β -галактозидаза бактерий *Escherichia fergusonii E3* обладает оптимумом температуры 50°C и диапазоном стабильности (40 - 50°C).

10.3 Влияние ионов металлов на активность β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3*

Известно, что активность β -галактозидаз многих бактерий, и грибов зависит от присутствия ионов металлов в реакционной среде. Изучение влияния ионов металлов на активность β -галактозидазы проводили при внесении в реакционную смесь солей различных металлов в концентрациях от 5 до 20 мМ и хелатирующего соединения ЭДТА (рис.9).

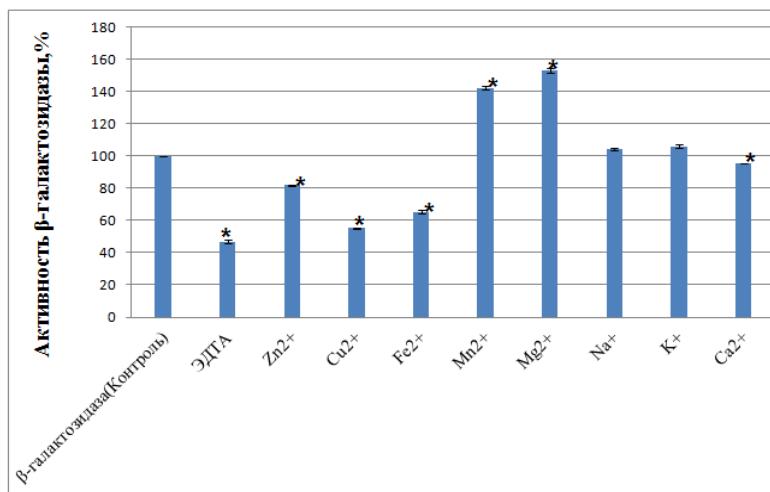


Рисунок 9. Влияние ионов металлов и ЭДТА в концентрации 20 мМ на активность очищенной β -галактозидазы бактерии *Escherichia fergusonii E3*. Результаты представлены в виде среднего значения ± 2 стандартных отклонения, ($n = 3$), * $p < 0,05$

Результаты исследований показали, что внесение в реакционную среду Mn^{2+} и Mg^{2+} в концентрации 20 мМ повышало активность β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* в 1,42 раза и 1,53 раза, соответственно, по сравнению с контролем ($p<0,05$). Внесение других двухвалентных металлов, таких как Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} в концентрации 10 - 20 мМ приводило к снижению активности фермента на 20-43% ($p<0,05$), а ионы Na^+ и K^+ незначительно повышали ее, ($p>0,05$). Значительное снижение активности β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* наблюдалось при внесение ЭДТА в реакционную смесь, в концентрации 5 - 15 мМ, активность β -галактозидазы понижалась в 2,0 раз ($p<0,05$).

Таким образом, результаты исследований показали, что β -галактозидаза *Escherichia fergusonii E3* является металлизависимым ферментом, поскольку двухвалентные ионы металлов Mn^{2+} и Mg^{2+} активировали его активность на 42% и 53% по сравнению с контролем, а ЭДТА снижала активность на 59%.

10.4 Оптимизация концентрации субстрата и определение K_m и V_{max} *Escherichia fergusonii E3*

Одним из важных этапов при получении безлактозных продуктов является оптимизации концентрации субстрата при использовании β -галактозидаз, а также выяснение максимальной скорости гидролиза и константы Михаэлиса. Исходная концентрация лактозы в 0,05M Tris-HCl буферном растворе (рН 7,0 - 7,2) составляла 5 - 65 мМ (рис.10).

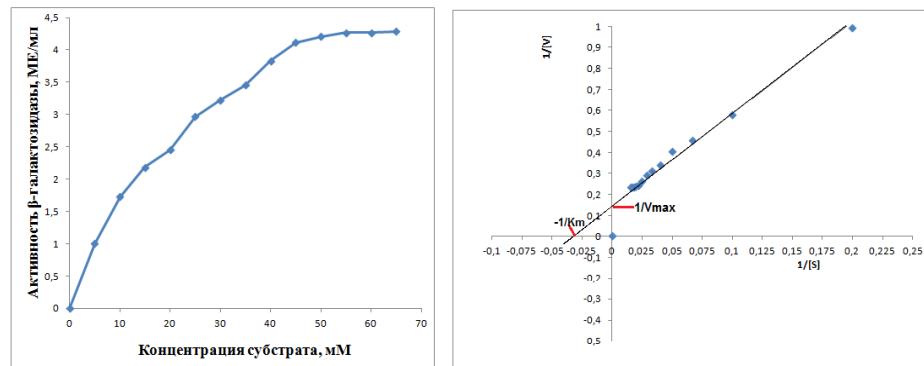


Рисунок 10. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и определение значений K_m и V_{max} .

Полученные нами результаты показали, что оптимальная концентрацией субстрата при которой активность β -галактозидазы максимальна, составляла 56 мМ. K_m при данном значении лактозы - $27,75 \pm 2,48$ мМ, а V_{max} - $8,18 \pm 0,43$ МЕ/мл.

11. Гидролиз лактозы молока β -галактозидазой *Escherichia fergusonii E3* Хроматографическое исследование гидролизатов молока

Анализ данных литературы показывает, что β -галактозидаза обладает способностью расщеплять лактозу молочных продуктов, это необходимо для людей, которые обладают непереносимостью лактозы. Это одно из главных свойств данных ферментов, поэтому было решено исследовать действие β -галактозидазы *Escherichia fergusonii E3* на лактозу молока (рис.11).

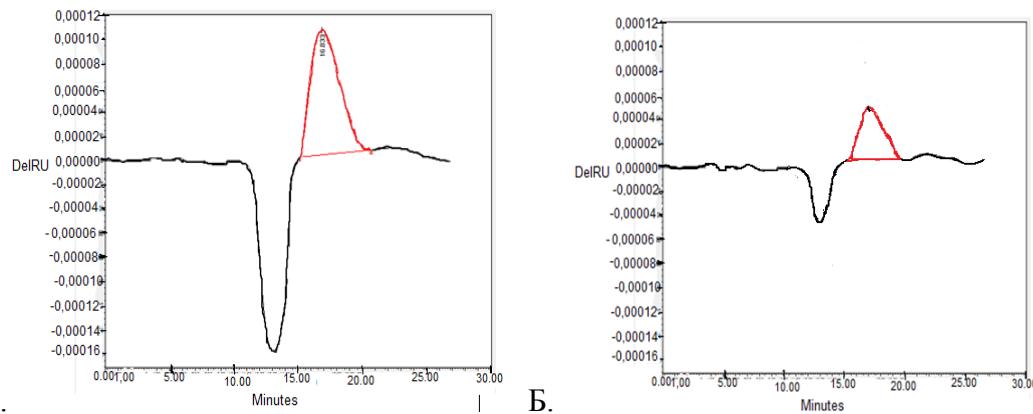


Рисунок 11. Хроматограмма гидролизата исходного молока (А); гидролизата молока очищенной β -галактозидазой *Escherichia fergusonii E3* (Б).

Результаты хроматографического анализа гидролизатов показали, что в исходном молоке концентрация лактозы составляет 4,73 г/л. Молоко в данными показателями подвергалось гидролизу β -галактозидазой *Escherichia fergusonii E3*. Соотношение молока и фермента было 10:1. Время гидролиза 24 часа. Хроматографический анализ гидролизата молока после действия очищенного фермента показал, что концентрация лактозы снизилась до 2,4 г/л.

Эффективность гидролиза лактозы составила 49,3 %. Даная степень гидролиза была несколько выше, чем у β -галактозидазы *Streptococcus thermophilus* (47,8%), сопоставимо с активностью β -галактозидазы *Bacillus circulans* (50%) и значительно выше, чем при использовании β -галактозидазы *Aspergillus oryzae* (30-41%) (Yang et al., 1993; Rodriguez-Colinas et al., 2014; Bosso et al., 2016).

Таким образом, очищенный фермент β -галактозидаза *Escherichia fergusonii* E3 обладает эффективной способностью гидролизовать лактозу не только в реакционной смеси, но и натуральном продукте, содержащим значительное число других соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные результаты подтверждают данные предыдущих авторов о повышении численности микроорганизмов в ЖКТ при воспалительных заболеваниях и что это увеличение, главным образом, связано с развитием бактерий рода *Escherichia*. В ходе работы был выделенный новый изолят бактерий из ЖКТ больных с заболеванием Крона и проведена его идентификация. Изолят *Escherichia fergusonii* E3, обладал, более высокой активностью ферментов углеводного обмена, по сравнению с активностью данных ферментов у штамма *E. coli* нормальной микрофлоры ЖКТ и других бактерий, что дает возможность рекомендовать данный штамм для дальнейшего сравнительного изучения изменения биохимического потенциала клеток при воспалительных заболеваниях. Следует отметить, что ферментативная активность β -галактозидазы *Escherichia fergusonii* E3 была значительно выше β -галактозидазной активности других микроорганизмов и поэтому несмотря на то, что данный штамм, по-видимому, относится к условно-патогенным микроорганизмам, он является эффективным продуцентом β -галактозидазы.

Выделенный и очищенный фермент β -галактозидаза *Escherichia fergusonii* E3, обладает высоким гидролизующим лактозу потенциалом и способностью функционировать при высоких температурах.

По работе были сделаны следующие **выводы**:

1. При воспалительных заболеваниях ЖКТ наблюдается значительное повышение общей численности анаэробной микрофлоры, в том числе за счет увеличения количества патогенных штаммов рода *Escherichia*;

2. Из ЖКТ больных с заболеванием Крона выделен и охарактеризан изолят, который по структуре нуклеотидной последовательности 16S рРНК был идентифицирован как *Escherichia fergusonii*, штамм - E3;

3. Изолят *Escherichia fergusonii* E3 синтезирует активные ферменты углеводного обмена, среди которых наибольшую активность имел фермент- β -галактозидаза, удельная активность которой, в культуральной жидкости и клеточном экстракте, была $7,04 \pm 0,11$ МЕ/мг и $7,92 \pm 0,22$ МЕ/мг. Данная активность была в 1,3- 4,5 раз выше активности β -галактозидаз других микроорганизмов.

4. Максимальный рост *Escherichia fergusonii* E3 и биосинтез активной β -галактозидазы наблюдался на среде МПБ с дополнительным внесением лактозы в концентрации (20г/л) в качестве индуктора.

5. Выделена и очищена β -галактозидаза *Escherichia fergusonii* E3. Удельная активность фермента - $9,35$ МЕ/мг и степень очистки 20,78 ед. Фермент является, металлизированным (ионы Mg^{2+} и Mn^{2+}) белком, имеющим димерное строение, с молекулярной массой $147,38 \pm 1,07$ кДа. Фермент активен в диапазоне рН 6,2 - 7,2 и стабилен при температуре

40 - 50 ° С. Оптимальная концентрация лактозы при которой активность β -галактозидазы максимальна, составляет 56 мМ. K_m - $27,75 \pm 2,48$ мМ, а V_{max} - $8,18 \pm 0,43$ МЕ/мл. Эффективность гидролиза лактозы молока - 49,3 %.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи в научных изданиях, включенных в список ВАК и Scopus:

1. **Christa B. L.** Analysis of changes in the gastrointestinal microflora in normal and abnormal state and identification of individual strains of possible inflammatory disease agents / B.L. Christa, A.R.Gizdataullina, E.E. Zinurova, T.V. Bagaeva // Eurasia J Biosci. – 2019. - V.13.-P.1419-1422.

2. **Букуру Л.К.** Эффективность применения β -галактозидазы для получения низколактозного напитка на основе молочной сыворотки / Л.К Букуру, Е.В. Скворцов, Т.В. Багаева, З.А. Канарская // Вестник Казанского технологического университета.-2017.- Т.20, №13, .С.117 - 119.

3. **Букуру Л.К.** Сравнительная характеристика ферментов углеводного обмена у бактерий *Escherichia fergusonii* и *Escherichia coli* / Л.К Букуру, Т.В. Багаева // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии» имени Ю.А. Овчинникова.-2019.-Т.15. -№4. - С.22 - 26.

Другие статьи и тезисы в сборниках материалов конференций:

1. **Букуру Л.К.** Эффективность применения β -галактозидазы для получения безлактозного напитка на основе молочной сыворотки // Л.К Букуру, Е.В. Скворцов / Сборник тезисов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века», г. Казань, 20-23 сентября 2016г. - С.18.

2. **Букуру Л.К.** Внеклеточные β -галактозидазы природных грибов // Л.К. Букуру, Е.В. Скворцов, Т.В. Багаева / Сборник тезисов X Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2017», Казань, 25-28 октября 2017г. –с.282-284.

3. **Букуру Л.К.** Внеклеточная и внутриклеточная β -галактозидазы бактерий рода *Clostridium* // Л.К. Букуру, Д.А. Аббах, Т.В. Багаева / III Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». г. Казань, 29-31 октября 2018г. - С.18

4. **Букуру Л.К.** Биохимическая характеристика и частичная очистка внутриклеточной β -галактозидазы бактерии рода *Clostridium* // Л.К. Букуру, Т.В. Багаева / III Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века»/ г. Казань, 29-31 октября 2018г. - С.114-115

5. **Букуру Л.К.** Сравнительная характеристика ферментов углеводного обмена у бактерий рода *Clostridium* в норме и в патологии.// Л.К. Букуру, Т.В. Багаева / Итоговая научная конференция_Кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии 6 февраля 2019г.

6. **Букуру Л.К.** Ферменты углеводного обмена анаэробных спорообразующих бактерий желудочно-кишечного тракта// Л.К. Букуру, Т.В. Багаева / Сборник тезисов конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление»: 72-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых. Нижний Новгород, 23–26 апреля 2019 г. – С.50.

E-mail адрес автора: blysechrista@yahoo.fr