



УДК 579.22

ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* БИМ В-813Д С ТРАНСГЛИКОЗИЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Морозова А.Н., Головнева Н.А., Рябая Н.Е., Сафонова М.Е.

Институт микробиологии НАН Беларуси
ул. Купревича, 2, Минск 220141, Республика Беларусь
biochem_lab@mbio.bas-net.by

АБСТРАКТ

Исследована способность бифидобактерий *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д синтезировать α - и β -галактозидазы. Результаты полногеномного секвенирования и биохимического анализа позволили выявить изоферменты с α - и β -галактозидазной активностью, которые наряду с гидролитическим действием способны осуществлять реакции трансгликозилирования с образованием галактоолигосахаридов. Полученные данные позволяют рекомендовать бифидобактерии *B. longum* БИМ В-813Д для использования в составе пробиотических продуктов.

Ключевые слова: α -галактозидаза, β -галактозидаза, бифидобактерии, пробиотики, пребиотики.

ВВЕДЕНИЕ

Бифидобактерии обитают преимущественно в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта в условиях с невысоким содержанием моно- и дисахаридов [1]. Проведенные в последние годы молекулярно-генетические исследования показали, что способность этих микроорганизмов ферментировать различные растительные волокна шире, чем ранее предполагалось, и отражает их адаптацию к занимаемой экологической нише [2]. Установлено, что бифидобактерии могут синтезировать такие ферменты, как α -арабинофуранозидаза, β -глюкозидаза, ксиланаза, арабинозидаза, α - и β -галактозидаза, неопулланаза, изомальтаза, мальтаза, инулиназа (β -фруктофуранозидаза), и пермеазы углеводов, которые обеспечивают транспорт, гидролиз и потребление олигосахаридов различной структуры [3]. Сведения, полученные в результате секвенирования, свидетельствуют, что в геноме *B. longum* присутствуют более 40 гликозилгидролаз и 8 транслоказ олигосахаридов, характеризующихся высоким сродством к субстратам – больше, чем в других известных геномах прокариотов [3]. Особый интерес представляют α - и β -галактозидазы. α -Галактозидаза (α -D-галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.22) и β -галактозидаза (β -D-галактозид-галактогидролаза, ЕС 3.2.1.23.) осуществляют гидролиз α -D-галактозидной или β -галактозидной связи олиго-, полисахаридов, гликолипидов, гликопептидов, гликопротеинов, мукополисахаридов [4,5]. Активность этих ферментов обеспечивает пробиотическое действие бифидобактерий, в том числе штаммы бифидобактерий с высокой β -галактозидазной активностью могут использоваться в составе заквасок для эффективной ферментации лактозы при производстве низколактозных молочных продуктов [6]. Актуально исследование пребиотиков – соединений, которые избирательно стимулируют рост и (или) биологическую активность микробиома кишечника человека и животных, способствуют поддержанию его нормальной структуры [7,8].

Цель работы – исследование α - и β -галактозидазной активности бифидобактерий *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д.

Материалы и методы



Объектом исследований служил штамм *B. longum* БИМ В-813Д, полученный в результате индуцированного мутагенеза [9], реклассифицирован из *Bifidobacterium adolescentis* БИМ В-813Д в результате полногеномного секвенирования [10].

Культуры бифидобактерий поддерживали на среде MRS [11] методом субкультивирования, хранили при температуре плюс 5-6°C.

Биомассу бактерий определяли нефелометрически, путем измерения оптической плотности OD_{590nm} суспензии бактерий.

Активность α - и β -галактозидаз оценивали колориметрически. Для α - галактозидазы определяли активность по количеству освободившегося о-нитрофенола из о-нитрофенил- α -D-галактопиранозиды, в случае β -галактозидазы – о-нитрофенил- β -D-галактопиранозиды, согласно модифицированному методу Миллера. Активность α - и β -галактозидазы рассчитывали в единицах Миллера по следующей формуле:

$$\text{Единицы Миллера} = [1000 * OD_{420}] / [V * T * OD_{595}]$$

где OD_{420} - измеренные значения для реакционной смеси;

OD_{590} - отражает плотность клеточной суспензии;

T - время реакции в минутах;

V - объем пробы, взятой для определения, в мл [12].

При проведении экспериментов применяли статистические методы обработки данных. Повторность опытов принята трехкратная.

Для определения локализации α - и β -галактозидазы использовали культуры бифидобактерий в стационарной фазе роста. Клетки отделяли центрифугированием при 10000 g, 4°C, в течение 10 мин., дважды отмывали от остатков среды 0,05M Na-фосфатным буфером (pH 6,8) при центрифугировании в тех же условиях. Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05M Na-фосфатном буфере и обрабатывали ультразвуком на установке «УЗДН-2Т» (44 кГц, 3 мин пятикратно при охлаждении). Гомогенат клеток центрифугировали при 10000 g, 4°C. В бесклеточном центрифугате определяли активность ферментов.

Аналитический электрофорез проводили в пластинах 7,5% ПААГ, используя Tris-HCl буфер pH 6,7 и 8,9 для концентрирующего и разделяющего гелей, соответственно [13]. Для окрашивания гелей использовали раствор Кумасси G-250 в 3,5% хлорной кислоте.

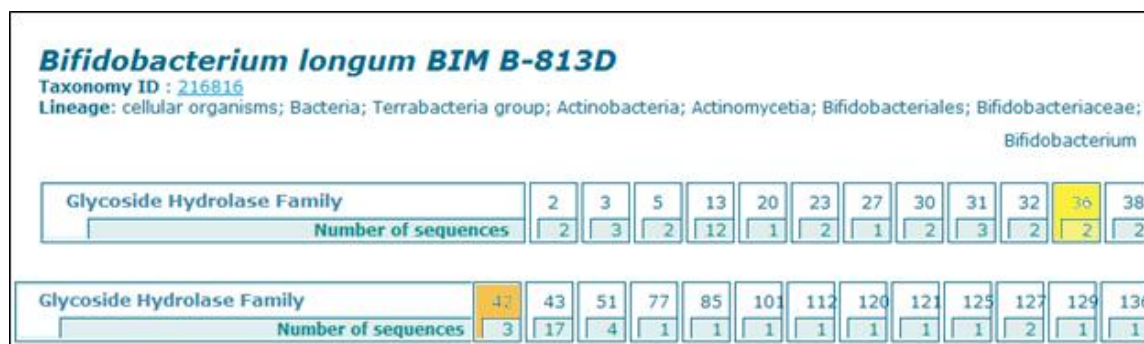
Реакционная смесь для определения трансгликозилирующего действия α -галактозидазы содержала 1,0 мл раствора раффинозы (30%) в 0,05M Na-фосфатном буфере, в случае определения β -галактозидазы – раствор лактозы (30%) в 0,05M Na-фосфатном буфере pH 7,5 и 0,5 мл фермента. Реакцию проводили в течение 18 ч, останавливали кипячением на водяной бане в течение 10 мин.

Для анализа продукции галактоолигосахаридов использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), которую проводили на пластинках силикагеля с алюминиевой подложкой марки Silufol. В качестве разделительной смеси использовали систему растворителей бутанол : этанол : вода (5:3:2). Хроматографическое разделение выполняли в камере 21,5x17x7см, насыщенной парами элюирующей системы; длина пробега фронта подвижной фазы – 12 см. Для расчета R_f использовали результаты трех измерений. Соединения обнаруживали по окрашиванию после опрыскивания реактивом с 1,0% раствором нафторезорцина в этиловом спирте, смешанном с фосфорной кислотой в соотношении 1:10. Для развития окраски пластинку прогревали 5 мин при температуре 105°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью базы данных CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) [14], классифицирующей ферменты по средству аминокислотных последовательностей и механизму гидролиза гликозидной связи, нами установлен спектр гликозидаз

бифидобактерий *B. longum* БИМ В-813Д и их принадлежность к определенным семействам гликозил-гидролаз GH (рисунок 1) [15].



Желтым цветом обозначены α -галактозидазы, оранжевым – β -галактозидазы

Рис. 1. Семейства гликозил-гидролаз *B. longum* БИМ В-813Д.

У *B. longum* БИМ В-813Д выявлены последовательности, потенциально кодирующие две α -галактозидазы семейства мелибиаз GH36 (H8S96_09200, H8S96_09265) и три β -галактозидазы семейства GH42 (H8S96_05555, H8S96_06560, H8S96_07185).

Проведен анализ способности продуцировать α - и β -галактозидазы на средах с различными источниками углерода в питательной среде. С этой целью бактерии культивировали на среде MRS с галактозосодержащими углеводами с α - и β -галактозидной связью – мелибиозой, лактозой, раффинозой и глюкозой (1%). Активность ферментов определяли после 18 ч роста.

Показана высокая активность α - и β -галактозидаз в данных условиях при культивировании *B. longum* БИМ В-813Д на средах с лактозой и мелибиозой. Максимум продукции α -галактозидазы установлен на среде с мелибиозой (рисунок 2). Для продукции β -галактозидазы наиболее эффективным источником углеродного питания является лактоза (рисунок 2).

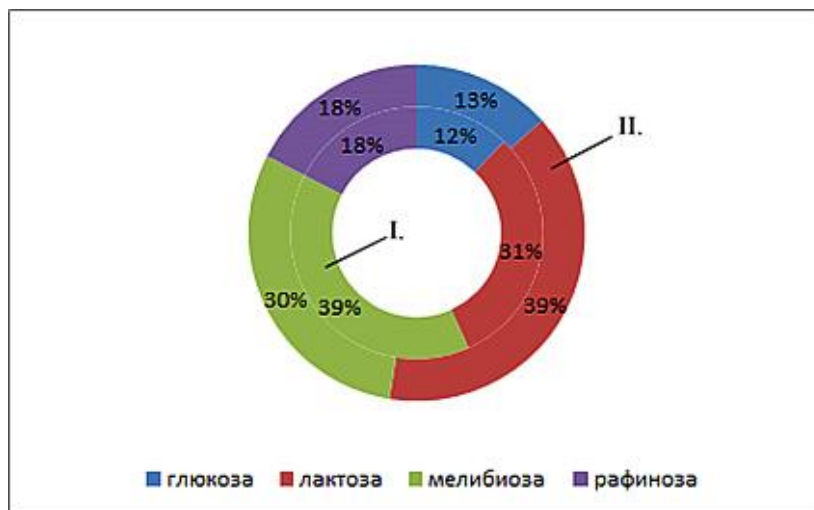


Рис. 2. Продукция α -галактозидазы (I – внутренний круг диаграммы) и β -галактозидазы (II – внешний круг диаграммы) в зависимости от источника углерода в среде культивирования

Для определения локализации ферментов исследована активность α - и β -галактозидаз *B. longum* БИМ В-813Д в бесклеточном супернатанте культуральной жидкости, суспензии клеток бифидобактерий в буфере, а также гомогенате клеток, разрушенных ультразвуком.

Таблица 1. Распределение α - и β -галактозидазной активности при фракционировании клеток *B. longum* БИМ В-813Д

Фракция	алактозидаза, д.Миллера	алактозидаза, д.Миллера

Бесклеточный супернатант	0	25
Интактные клетки	327	826
Надосадок гомогената после УЗ	817	2065
Белков с молекулярной массой < 30000 Da	0	0
Белков с молекулярной массой > 30000 Da	2451	6200

В бесклеточном супернатанте культуральной жидкости активность ферментов не обнаружена. Установлено, что α - и β -галактозидазы *B. longum* БИМ В-813Д являются внутриклеточными ферментами, максимальная активность определяется во фракции белков с молекулярной массой более 30 кДа, полученных методом ультрафильтрации с использованием центрифужных пробирок Milipore с пределом исключения 30 кДа (таблица 1).

Электрофоретический анализ в ПААГ в нативных условиях подтвердил наличие белков с α - и β -галактозидазной активностью в гомогенатах клеток бифидобактерий.

Электрофоретическую подвижность (Rf) белков с α -галактозидазной активностью определяли, выдерживая пластину ПААГ в растворе о-нитрофенил- α -D-галактопиранозида. В результате обнаружено ярко-желтое окрашивание белка с Rf 0,38 (рисунок 3).

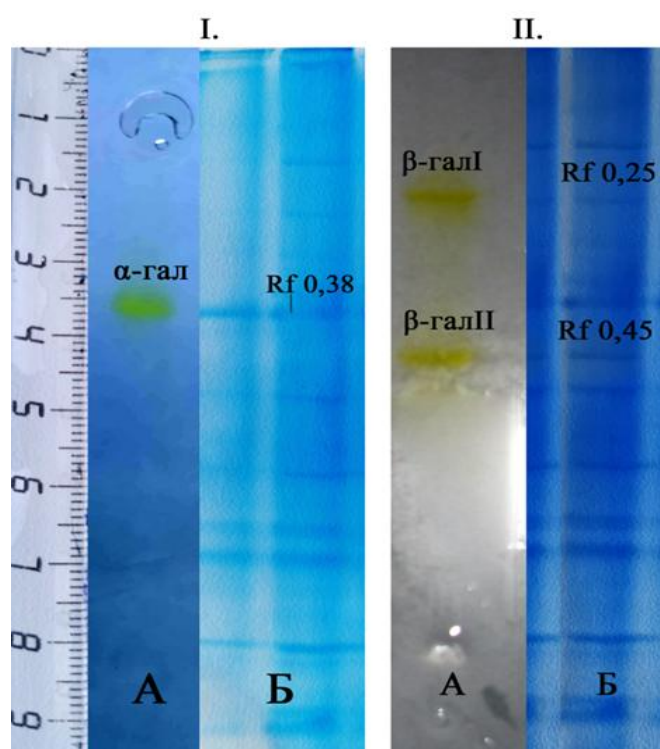
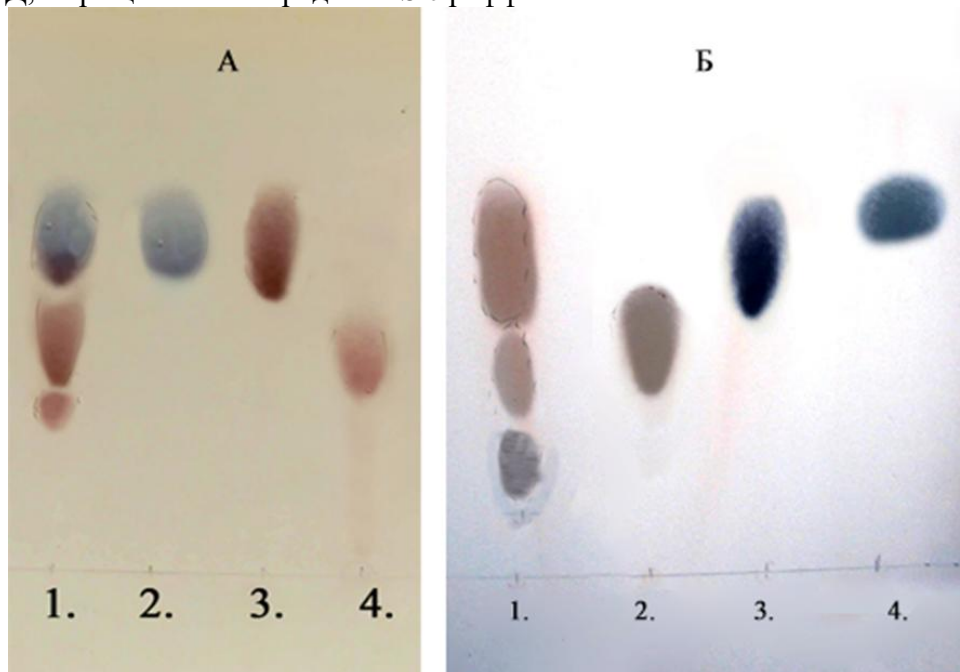


Рис. 3. Энзимограмма (А) и электрофореграмма (Б) белков *B. longum* БИМ В-813Д с α -галактозидазной (I) и β -галактозидазной активностью (II)

α -

Также выявлены белки, обладающие β -галактозидазной активностью – β -галI и β -галII с Rf 0,25 и 0,45, соответственно. Таким образом, установлено наличие двух белков с β -галактозидазной активностью, что согласуется с результатами полногеномного секвенирования и указывает на существование изоферментов β -галактозидазы.

В определенных условиях наряду с гидролитической активностью, галактозидазы бифидобактерий проявляют трансгликозилирующее действие [16]. Исследовано накопление галактоолигосахаридов в условиях *in vitro* при использовании в реакционной фракции белков (>30000 Da) с α - и β -галактозидазной активностью, изолированных из клеток *B. longum* БИМ В-813Д, выращенных на среде MRS с раффинозой и лактозой.



А - 1. Продукты реакции трансгликозилирования α -галактозидаз; 2. галактоза; 3. лактоза; 4. раффиноза

Б - 1. продукты трансгликозилирования β -галактозидаз; 2. раффиноза; 3 – лактоза; 4 - галактоза

Рис. 4. Трансгликозилирующее действие белков с α -галактозидазной (А) и β -галактозидазной активностью (Б)

Эффективность трансгликозилирования оценивали по хроматографической подвижности и интенсивности окрашивания продуктов реакции. Установлено, что в реакционной смеси, включающей белки с α - и β -галактозидазной активностью, выявлены фракции олигосахаридов, хроматографическая подвижность которых (0,18) ниже, чем у галактозы (0,62), лактозы (0,52) и раффинозы (0,26), использованных в качестве метчиков при проведении реакции (рисунок 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что *B. longum* БИМ В-813Д продуцирует α - и β -галактозидазы, которые обладают гидролитическим и трансгликозилирующим действием.

ВЫВОДЫ

Исследована продукция α - и β -галактозидаз у бифидобактерий *B. longum* БИМ В-813Д. Максимум продукции α -галактозидазы установлен на среде с мелибиозой, для продукции β -галактозидазы наиболее эффективным источником углеродного питания является лактоза. Результаты полногеномного секвенирования и биохимического анализа позволили выявить изоферменты с α - и β -галактозидазной активностью, которые, наряду с гидролитическим действием способны осуществлять реакции трансгликозилирования с образованием галактоолигосахаридов. Полученные данные позволяют рекомендовать



бифидобактерии *B. longum* БИМ В-813Д для использования в составе пробиотических продуктов.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках задания подпрограммы «Микробные биотехнологии» Государственной программы научных исследований «Биотехнологии» Республики Беларусь на 2016-2020 годы (задание 3.31).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dyachkova M.S., Chekalin E.V., Danilenko V.N. Positive Selection in Bifidobacterium Genes Drives Species-Specific Host-Bacteria Communication // Front. Microbiol. -2019. - Vol. 10. e:2374. [http://doi: 10.3389/fmicb.2019.02374](http://doi:10.3389/fmicb.2019.02374).
2. Pokusaeva K., Fitzgerald G. F., Sinderen D. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria* // Genes Nutr. - 2011. - Vol. 6. - P. 285-306
3. Bondue P., Delcenserie V. Genome of Bifidobacteria and Carbohydrate Metabolism // Korean J. Food Sci. Anim. Resour. - 2015. - Vol. 35, № 1. - P. 1-9.
4. Taborda P. C., Cardoso L. A. C., Karp S. G. α -Galactosidases: characteristics, production and immobilization // J. Food Nutr. Res. -2016. - Vol. 55 - P.195-204.
5. Xu X., X Fan, Fan Ch, Qin X, Liu B, Nie Ch., Sun N, Yao C, Y Zhang, Zhang W. Production Optimization of an Active β -Galactosidase of *Bifidobacterium animalis* in Heterologous Expression Systems // BioMed Res. Int. - 2019.- Vol.2019. - ID 8010635. [http://doi: 10.1155/2019/8010635](http://doi:10.1155/2019/8010635)
6. Vandenplas Y. Lactose Intolerance // Asia Pac. J. Clin. Nutr. - 2015. - Vol. 24, № S1. - P.9-13
7. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli Ch.J., Cotter P. D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E. J., Hutkins R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond // Curr. Opin. Biotechnol. -2017. - Vol. 44 - P. 94-102
8. Corzo, N., Alonso J. L., Azpiroz F., Calvo M. A., Cirici M., Leis R., Lombón F., Mateos-Aparicio I., Plou F. J., Ruas-Madiedo P., Rúperez P., Redondo-Cuenca A., Sanz M. L., Clemente A. Prebiotics: concept, properties and beneficial effects // Nutr. Hosp. – 2015. - № 1. - P. 98-118.
9. Использование химического мутагенеза для получения штамма бифидобактерий с повышенной продукцией β -галактозидазы / А. Н. Морозова, Н. А. Головнева // Молодежь в науке – 2011: прил. к журн. «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». В 5 ч. Ч 3. - 2012.- С.132-135.
10. Морозова А.Н., Охремчук А.Э., Головнева Н.А. Особенности генома *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д, отражающие адаптацию бактерий к среде обитания // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / редкол: Э.И. Коломиец [и др.]. - Минск, 2021. - Т. 13. - С. 66-76
11. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. - 1960. - Vol. 23, № 1. - P. 130-135.
12. Miller J. H. A short course in bacterial genetics. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1992.
13. Davis B.J. Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins // Ann. N.Y.Acad. Sci. - 1964. - Vol.121. - P.404.
14. Lombard V., Ramulu H.G., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013// Nucl. Acids Res. - 2014 (Database issue), D490–D495. (<http://www.cazy.org/>)
15. Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз// Биохимия. - 2011. - Т. 76. - С.764-780.



16. Ambrogi V., Bottacini F., O'Callaghan J., Casey E., Breen J., Schoemaker B., Cao L., Kuipers B. O'Connell Motherway M., Schoterman M., van Sinderen D. Infant-Associated Bifidobacterial β -Galactosidases and Their Ability to Synthesize Galacto-Oligosaccharides // *Frontiers in Microbiology*. - 2021. -Vol.12. - e: 662959. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662959>

REFERENCES

1. Dyachkova M.S. Chekalin E.V., Danilenko V.N. Positive Selection in Bifidobacterium Genes Drives Species-Specific Host-Bacteria Communication. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10. e:2374. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02374>.
2. Pokusaeva K., Fitzgerald G. F., Sinderen D. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr.*, 2011, vol. 6, pp. 285-306
3. Bondue P., Delcenserie V. Genome of Bifidobacteria and Carbohydrate Metabolism. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, 2015, vol. 35, no. 1, pp. 1-9.
4. Tabora P. C., Cardoso L. A. C., Karp S. G. α -Galactosidases: characteristics, production and immobilization. *J. Food Nutr. Res.*, 2016, vol. 55, pp. 195-204.
5. Xu X., X Fan, Fan Ch, Qin X, Liu B, Nie Ch., Sun N, Yao C, Y Zhang, Zhang W. Production Optimization of an Active β -Galactosidase of *Bifidobacterium animalis* in Heterologous Expression Systems. *BioMed Res. Int.*, 2019, vol.2019. - ID 8010635. <http://doi.org/10.1155/2019/8010635>
6. Vandenplas Y. Lactose Intolerance. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2015, vol. 24, no. S1, pp.9-13.
7. Marco M.L. Heeney D., Binda S., Cifelli Ch.J., Cotter P. D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E. J., Hutkins R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2017, vol. 44, pp. 94-102
8. Corzo, N., Alonso J. L., Azpiroz F., Calvo M. A., Cirici M., Leis R., Lombón F., Mateos-Aparicio I., Plou F. J., Ruas-Madiedo P., Rúperez P., Redondo-Cuenca A., Sanz M. L., Clemente A. Prebiotics: concept, properties and beneficial effects. *Nutr. Hosp.*, 2015, no. 1, pp. 98-118.
9. Ispol'zovanie himicheskogo mutageneza dlya polucheniya shtamma bifidobakterij s povyshennoj produkciej β -galaktozidazy / A. N. Morozova, N. A. Golovneva. *Molodezh' v nauke*, 2011: pril. k zhurn. «Vesci Nacyyanal'naj akademii navuk Belarusi». V 5 ch. CH 3, 2012, S.132-135.
10. Morozova A.N., Ohremchuk A.E., Golovneva N.A. Osobennosti genoma Bifidobacterium longum BIM B-813D, otrazhayushchie adaptaciyu bakterij k srede obitaniya // Mikrobnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sb. nauch. tr. / redkol: E.I. Kolomic [i dr.]. - Minsk, 2021, t. 13, s. 66-76
11. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 1960, vol. 23, no.1, pp. 130-135.
12. Miller J. H. A short course in bacterial genetics. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1992.
13. Davis B.J. Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 1964, vol.121, pp.404.
14. Lombard V., Ramulu H.G., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucl. Acids Res.*, 2014 (Database issue), D490–D495. (<http://www.cazy.org/>)
15. Naumov D.G. Ierarhicheskaya klassifikaciya glikozil-gidrolaz. *Biohimiya*, 2011, t. 76, s.764-780.
16. Ambrogi V., Bottacini F., O'Callaghan J., Casey E., Breen J., Schoemaker B., Cao L., Kuipers B. O'Connell Motherway M., Schoterman M., van Sinderen D. Infant-Associated Bifidobacterial β -Galactosidases and Their Ability to Synthesize Galacto-Oligosaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 2021, vol.12, e: 662959. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662959>



ТРАНСГЛИКОЗДАУ БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ИЕ *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* БИМ В-813Д ГАЛАКТОЗИДАЗАЛАРЫ

Морозова А.Н., Головнева Н.А., Рябая Н.Е., Сафонова М.Е.

Беларусь ҰҒА Микробиология институты

Купревич көш., 2, Минск қ., 220141, Беларусь Республикасы

biochem_lab@mbio.bas-net.by

АБСТРАКТ

B. longum БИМ В-813Д бифидобактерияларының α - мен β -галактозидазаларын синтездеу қабілеті зерттеп танылды. Толықгеномды секвенирлеу мен биохимиялық талдау нәтижелерінің арқасында изоферменттердің α - және β -галактозидаза белсенділігі бар екенін анықтауға мүмкін болды, олар гидролитикалық әрекеттерімен қатар галактоолигосахаридтер түзе отырып, трансгликоздау реакциясын жүзеге асыру қабілеті бар екені анықталды. Қол жеткізілген деректер *B. longum* БИМ В-813Д бифидобактерияларын пробиотикалық өнімдердің құрамында пайдалану үшін ұсынуға мүмкіндік береді.

Негізгі сөздер: α -галактозидаза, β -галактозидаза, бифидобактериялар, пробиотиктер, пребиотиктер.

GALACTOSIDASES OF STRAIN *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* BIM B-813D WITH TRANSGLYCOSYLATING ACTIVITY

Morozova A.N., Golovnyova N.A., Ryabaya N.E., Safonova M.E.

Institute of Microbiology, NAS of Belarus

2, Kuprevich str., Minsk, 220141, Republic of Belarus

biochem_lab@mbio.bas-net.by

ABSTRACT

Activity of bifidobacterial culture *B. longum* BIM B-813D to synthesize α - and β -galactosidases was investigated. Full genome sequencing and biochemical analysis have revealed isoenzymes with α - and β -galactosidase activities capable in addition to hydrolytic action to carry out transglycosylation reactions yielding galactooligosaccharides.

The obtained data enable to recommend bifidobacteria *B. longum* BIM B-813D as a key ingredient of probiotic products.

Key words: α - galactosidase, β - galactosidase, probiotics, prebiotics.