

- P. 4539–4543.
7. Agüero G. et al. Beneficial immunomodulatory activity of *Lactobacillus casei* in malnourished mice pneumonia: effect on inflammation and coagulation // *Nutrition*. – 2006. – Т. 22. – №. 7-8. – С. 810-819.
 8. Haro C. et al. *Lactobacillus casei* modulates the inflammation-coagulation interaction in a pneumococcal pneumonia experimental model // *Journal of Inflammation*. – 2009. – Т. 6. – №. 1. – С. 28.
 9. Bengmark, S. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* - 2003. – V.17. – P. 833-848.
 10. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. - М.: МГУ. - 1995. - 186 с.
 11. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. – М.: Академия. - 2005. – 119 с.
 12. Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров Н.А., Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.:Изографъ. - 2005. – 656 с.
 13. Clayton R. A. et al. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1995. – Т. 45. – №. 3. – С. 595-599.
 14. Clarridge J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // *Clinical microbiology reviews*. – 2004. – Т. 17. – №. 4. – С. 840-862.
 15. Todorov S., Vaz-Velho M., Gibbs P. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2004. – Т. 35. – №. 1-2. – С. 157-160.
 16. Vastano V. et al. Identification of binding sites of *Lactobacillus plantarum* enolase involved in the interaction with human plasminogen // *Microbiological research*. – 2013. – Т. 168. – №. 2. – С. 65-72.

УДК 579.6

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОЛАЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Абилхадиров Арман Сабырович¹, Исаева Динара Арстановна²
dinaro4ka1996@mail.ru

1 – Научный сотрудник Республиканской коллекции микроорганизмов, Нур-Султан, Казахстан; 2 – Магистрант Евразийского национального университета имени Л. Н. Гумилёва, Нур-Султан, Казахстан

Научные руководители – С. М. Шайхин, Т. Д. Укбаева

Аннотация. Лактобактерии, благодаря ряду свойств, которые принято относить к пробиотическим, поддерживают желудочно-кишечную экосистему в благоприятном состоянии. Препараты на основе пробиотических лактобактерий оказывают иммуномодулирующие и противоопухолевые действия, а также оказывают благоприятное воздействие на здоровье человека при различных заболеваниях, снижая содержание холестерина, частоту аллергических реакций, синтезируя витамины и другие биологически активные субстанции. Внеклеточные белки Msp1 и Msp2 обладают ферментативными активностями пептидогликановых гидролаз, которые необходимы в биосинтезе, распаде, модификации клеточной стенки. Белок Msp2 имеет особое значение поскольку были получены экспериментальные доказательства о том, что он трансактивирует передачу сигналов рецептору EGFR для ослабления апоптоза, вызванного цитокинами, и разрушения эпителиального барьера в клетках эпителия кишечника *in vitro* и у мышей [1].

Ключевые слова: Пробиотики, молочнокислые бактерии, лактобактерии, внеклеточные белки, пептидогликан, пептидогликан гидролазы, белки Msp1 и Msp2, зимограмма.

Введение. Внеклеточные белки (ВБ) – это те белки, которые активно транспортируются в бактериальное окружение через цитоплазматические мембраны, а также те, которые просто сбрасываются с бактериальной поверхности. В настоящее время выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе полезных эффектов пробиотиков, является привлекательным полем деятельности в микробиологии кишечника. Среди различных внеклеточных факторов, ответственных за эти процессы, белки, секретируемые в окружающую среду пробиотическими бактериями, (ВБ) могут быть посредниками в определенных взаимодействиях, так как они могут напрямую взаимодействовать с клетками слизистой ткани, например, эпителиальными и иммунными клетками [2].

Внеклеточные белки Msp1 и Msp2, впервые выделенные из *Lactobacillus rhamnosus* GG, являются наиболее изученными. Белок Msp2 гомологичен охарактеризованному поверхностному антигену *Lactobacillus casei* ATCC 334 (GI | 116493594), в то время как Msp1 является гомологом гидролазы клеточной стенки той же бактерии (GI | 116493849) [3]. Ян и соотрудники показали, что оба белка Msp1 и Msp2 эффективные стимуляторы роста, так как они индуцируют пролиферацию эпителиальных клеток толстой кишки молодых и взрослых мышей (YAMC) [4].

Геномы штаммов *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus* имеют два гена, кодирующие ВБ, гомологичные Msp1 и Msp2 из LGG. Последние проявляют антиапоптотический и защитные эффекты по отношению к эпителиальным клеткам кишечника человека и мыши [4]. Белки Msp1 и Msp2 содержат цистеин, гистидин-зависимый аминокислород/пептидазный (СНАР) и NLPC/P60 домены, соответственно, которые характерны для белков с гидролазной активностью по отношению к клеточной стенке. В штамме *L. casei* BL23 оба белка секретируются в среду роста, а также обнаруживаются на бактериальной клеточной стенке [5, 6]. Инактивация гена LCABL_00230, кодирующего Msp2 не приводила к значительной разнице в фенотипе, тогда как мутации в гене LCABL_02770 (Msp1), приводили к клеткам, которые не могли разделить и образовывали очень длинные цепи [6]. Очищенные, слитые с глутатион-S-трансферазой (GST) ВБ, гомологичные Msp1 и Msp2 из LGG, гидролизовали цепи пептидогликана, экстрагированные из клеточных стенок *L. casei*. Оба слитых белка связывались с муцином, коллагеном и кишечными эпителиальными клетками и, подобно белку Msp2 из LGG, стимулировали фосфорилирование рецептора эпидермального фактора роста в кишечнике мышей *ex vivo* [6]. Эти результаты показывают, что внеклеточные белки, входящие в аппарат метаболизма клеточной стенки, группы близких бактерий *L. casei*, *L. paracasei* - *L. rhamnosus* в пробиотических эффектах, описанных для этих бактерий [6]. В соответствии с экспериментами по связыванию внеклеточных белков пробиотика с белками хозяина находятся результаты другой работы, где наблюдали белок Msp2 на поверхности эпителия толстой кишки после орального введения мышам FITC-меченого белка Lp40 [7].

Таким образом, пробиотические эффекты молочнокислых бактерий (МКБ) на эпителиальные клетки не требуют прямого контакта клеток. Например, два секретируемых белка *L. rhamnosus* GG, Msp1 и Msp2, недавно были определены как поддерживающие *in vitro* гомеостаз кишечного эпителия через специальные сигнальные пути [4]. Внеклеточные белки Msp1 и Msp2 обладают ферментативными активностями пептидогликановых гидролаз, необходимых в биосинтезе и распаде, и/или модификации клеточной стенки и в большом количестве присутствуют в супернатанте культуральной жидкости (КЖ) *L. rhamnosus* GG. Похожие белки были обнаружены в супернатанте КЖ *L. casei* ATCC 334 и ATCC 393, но не в супернатанте КЖ *L. acidophilus* ATCC 4356 [5]. Эти белки стимулировали активацию Akt, способствовали росту клеток эпителия, и ингибировали TNF- α -индуцированный апоптоз эпителиальных клеток. Akt - это серин / треонин протеинкиназа, которая играет ключевую

роль в нескольких клеточных процессах, таких как метаболизм глюкозы, пролиферация клеток, апоптоз, транскрипция и клеточная миграция. Akt участвует в сигнальных путях выживания клеток, путем ингибирования процессов апоптоза [8]. Активация протеинкиназы Akt посредством фосфатидилинозитол-3-киназы, вероятно, происходит через активацию рецептора эпидермального фактора роста под действием белков Msp1 и Msp2 [4].

В другой модельной системе, внеклеточные белки Msp1 и Msp2 из *Lactobacillus rhamnosus GG* участвуют в защите плотных контактов кишечного эпителия и противодействуют H₂O₂-индуцированным разрушениям эпителиального барьера в монослое, состоящем из культивируемых Caco-2 клеток. Эти пробиотические эффекты Msp1 и Msp2, как было показано, опосредуются протеинкиназой C и MAPK киназой, регулируемой киназой ERK1 и внеклеточным сигналом, указывая на тот факт, что эти ВБ могут влиять на различные сигнальные пути клеток организма хозяина [9].

По сравнению с другими бактериальными компонентами, интерактивные возможности внеклеточных белков / пептидов менее изучены. Установлено, что белки, синтезируемые пробиотиками, изменяют ответы клетки-мишени хозяина [5]. Тем не менее, молекулярно-биологические особенности этих белков и их клеточных мишеней по-прежнему недостаточно изучены.

Таким образом, представляется актуальным и новым изучение пробиотических факторов у оригинальных штаммов молочнокислых бактерий, изолированных из различных географических регионов Казахстана.

Целью исследования Выделение, идентификация и характеристика внеклеточных гидролаз, повышающих активность потенциальных пробиотиков из национальных молочных продуктов.

Материалы и методы исследования. Объектами исследований служили 3 штамма: *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. garvieae*-для контроля. Для выращивания культур лактобацилл использовали обогащенные среды MPC-1 производства HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Индия). Отбор и определение принадлежности выделенных изолятов к МКБ проводили окраской по Граму, подвижности, наличию каталазы и микроскопии мазков [10]. Видовую принадлежность некоторых МКБ определяли с помощью предварительной видовой идентификации на основе сбраживания различных углеводов с помощью определителя Берджи [11]. Геномную ДНК из чистых культур МКБ выделяли методом K.Wilson [12]. Концентрацию полученных образцов измеряли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра Thermo Scientific Nano Drop 2000 Spectrophotometer. Видовую идентификацию бактериальных штаммов определяли методом анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Скрининг на наличие, гомологичных на Msp1 и Msp2 проводили с помощью ПЦР и специфичных праймеров. Оптимизация условий ПЦР с праймерами, последовательность которых была определена по литературным данным, заключалась в конкретизации параметров постановки реакций (температура отжига праймеров, количество циклов амплификации, концентрация ионов магния, праймеров и ДНК-матрицы). Пептидогликан гидролазная активность определялась путем экстракции белков экзопротеома и получения зимограмм. Получение клеточного субстрата для зимографии PG гидролаз, подготовку клеточных экстрактов и обработку додецилсульфатом натрия (SDS) проводили согласно протоколу, описанному в работе Лепьюпл и соавт. с применением небольших модификаций [13]. SDS-полиакриамидный (ПАА) геле-электрофорез и получение зимограмм проводили по общеизвестным стандартным методикам.

Результаты исследования и их обсуждение Были изучены и отобраны штаммы МКБ, выделенные из казахских традиционных продуктов питания и продуцирующие ВБ, которые гомологичны белкам Msp1 и Msp2 из штамма *L. rhamnosus GG (LGG)*. Проведен скрининг целевых МКБ на наличие генов, гомологичных Msp1 и Msp2 из *L. rhamnosus GG* с помощью специфичных праймеров. Проверены штаммы с положительными ответами на наличие генов

Msp1 и Msp2 на способность гидролизовать пептидогликаны. В штаммах с не обнаруженными генами Msp1 не проявлялась и ПГГ активность ВБ Msp1. Определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих ВБ из отобранных штаммов МКБ с помощью дизайнированных специфичных праймеров для сравнительного анализа. Изучены физико-химические свойства ВБ, гомологичных LGG Msp1 и Msp2 и выделенных из МКБ местных традиционных продуктов питания.

Заключение. Таким образом, использованные подходы на основе геномов культур МКБ группы *L. casei* и энзиматической активности ВБ этой группы культур можно рекомендовать при решении задач, когда необходим поиск и наработка специализированных белков с пробиотической активностью. Результаты работы подтверждают, что Msp1 и Msp2 встречаются только в таксоне *L. casei*, *paracasei*, *rhamnosus* и эти белки могут опосредовать правильную конформацию клеточной стенки. ВБ, выделенные из национальных молочных продуктов, могут использоваться при создании биопрепаратов, которые помогут быстрому восстановлению кишечной микрофлоры, снизит частоту аллергических реакций, а также риск образования рака толстого кишечника.

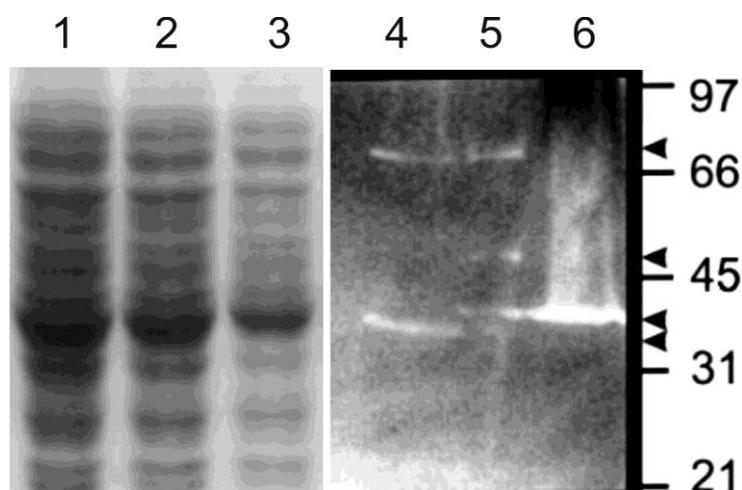


Рисунок - Результат электрофореза внеклеточных белков в SDS-полиакриамидном геле окрашенный красителем Coomassie Brilliant Blue G и зимографии белков Msp1 и Msp2. 1,4 – *L. rhamnosus*; 2,5 - *L. casei*; 3,6 – *L. garvieae*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Yan F. et al. A *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived soluble protein, p40, stimulates ligand release from intestinal epithelial cells to transactivate epidermal growth factor receptor // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Т. 288. – №. 42. – С. 30742-30751.
2. Sanchez B., Bressollier P., Urdaci M.C. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2008 – V. 54. – P.1–17.
3. Tannock G.W. Control of gastrointestinal pathogens by normal flora // In: Klug MJ, Reddy CA, eds. *Current perspectives in Microbial Ecology*. Washington DC, American Society for Microbiology. – 1984. – P. 374-382.
4. Yan F., Cao H., Cover T.L., Whitehead R., Washington M.K., Polk D.B. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth // *Gastroenterology*. – 2007. – V. 132. – Issue 2. – P. 562 – 575.
5. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2008. – V 72. – Issue 4. – P. 728–764.

6. Bäuerl C., Pérez-Martínez G., Yan F., Polk D.B., Monedero V. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23 // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V.19. – P.231–241.
7. Yan F., Cao H., Cover T.L., Washington M.K., Shi Y., et al. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – V.121. – P.2242–2253.
8. Yan F., Polk D.B. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – P. 50959–50965.
9. Seth A., Yan F., Polk D.B., and Rao R.K. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. – 2008. – V.294. – P.1060–1069.
10. Практикум по микробиологии / Под ред. проф. Нетрусова А.И. – М.: Академия, 2005. – 119 с.
11. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта., Н. Крига., П. Снита., Дж. Стейли., С. Уилльямса. - М.: Мир, 1997. - Т. 1, 2. – 799 с.
12. Wilson K.H. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York. – 1997. - pp. 2.4.1-2.4.2.
13. Lepeuple A.S., Van Gemert E., Chapot-Chartier M.P. Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AM2 by renaturing polyacrylamide gel electrophoresis: identification of a prophage encoded enzyme // *Appl Environ Microbiol.* - 1998. – V. 64. – P. 4142–4148.

УДК 579.222 + 579.676

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ И ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

Акжанов Н., Нурыш А.Б., Набиев К.К., Сагындыков У.З.

outemourate@list.ru

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилёва, Нур-Султан, Казахстан
Научный руководитель - У.З.Сагындыков

По информации Всемирной организации здравоохранения устойчивость к антибиотикам возрастает до угрожающе высоких уровней во всем мире. Новые механизмы устойчивости появляются и распространяются повсюду, угрожая нашей способности лечить распространенные инфекционные заболевания. Все больше инфекций – например пневмонию, туберкулез, заражение крови, гонорея, заболевания пищевого происхождения – становится труднее, а иногда и невозможно лечить из-за снижения эффективности антибиотиков [1]. Однако, для некоторых видов микроорганизмов, а именно для молочнокислых бактерий является положительным эффектом, так как с помощью этих микроорганизмов изготавливаются кисломолочные продукты, пробиотические препараты, функциональные продукты питания и напитки, гигиенические средства, различные корма. Более того, для этих бактерий характерно наличие природной высокой устойчивости к ряду антибиотических препаратов.

Кисломолочные продукты – это молочные продукты, созданные из цельного молока или его производных (сливок, обезжиренного молока и сыворотки) путем брожения (введения в него закваски – культур молочнокислых бактерий или дрожжей). Все кисломолочные продукты делят на две группы: Первая это – продукты молочнокислого брожения (творог, сметана, простокваша, ряженка, ацидофилин, йогурт). В этом случае