

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЛЕКТИНОВ *LACTOBACILLUS DELBRUECKII*. *SSP. BULGARICUS*

ДОЛМАШКИНА Алина Сергеевна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

ГОРЕЛЬНИКОВА Елена Александровна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

КАРПУНИНА Лидия Владимировна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

*Впервые выделены лектины из молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii. ssp. bulgaricus*. Установлена специфичность лектинов.*

В последние годы большое внимание уделяется лектинам бактерий в связи с их многообразными функциями в организме человека и животных. Известно, что лектин оказывает влияние на метаболизм организма животных: на белковый состав плазмы крови, активность кислых гидролаз, интенсивность перекисного окисления липидов, а также белковый и углеводный обмен [8]. Лектинам присущи и другие функции: влияние на фагоцитоз [9] и цитокиновую активность [3]. Также были обнаружены иммуностропные и противоопухолевые свойства лектина [2]. Некоторые лектины оказывают митогенное действие [1]. Разными исследователями было показано, что лактобациллы имеют большой потенциал в отношении синтеза экзополисахаридов, лектинов, однако функции этих биополимеров изучены не до конца [5, 10].

Имеются данные, что лектины, выделенные из культуральной жидкости смеси штаммов *Lactobacillus acidophilus* (NK1, 100аш, КЗШ24), обладают противокандидной активностью [6]. Лектины лактобацилл и бифидобактерий способны противодействовать потенциальным факторам вирулентности эукариотических патогенов [5]. Для дальнейшего формирования представлений о влиянии лектинов молочнокислых бактерий на физиологические реакции в организме человека и животных необходимы данные о физико-химических свойствах и биологической активности этих биологически активных веществ разных представителей родов и видов микроорганизмов. В связи с этим цель работы – выделение и очистка лектинов *Lactobacillus delbrueckii. ssp. bulgaricus*.

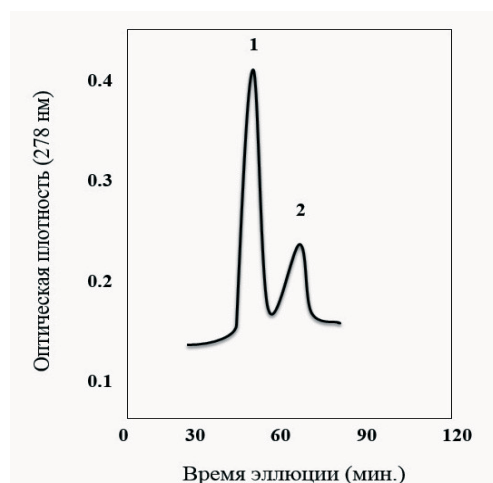
Методика исследований. Объектом исследований явилась культура *Lactobacillus delbrueckii. ssp. bulgaricus*, которая была получена из сухого порошка лиофилизированной бактериальной закваски болгарских палочек, используемых в России для производства йогуртов (Государственное унитарное предприятие производственно-экспериментальный завод РАСН, г. Москва). Выделение лектинов *L. delbrueckii. ssp. bulgaricus* проводилось по методу [4].

Гемагглютинирующую активность белков определяли реакцией гемагглютинации с самопроизвольным осаждением эритроцитов, используя для этой цели

2%-ю суспензию трипсинизированных кроличьих эритроцитов [7].

Специфичность лектинов определяли методом подавления его активности углеводами [7]. В работе использовали 16 углеводов фирм Chemapol и Fluka, в числе которых моно-, ди-, аминокислоты: мальтоза, маннит, дульцит, арабиноза, рамноза, D-манноза, фруктоза, L-фукоза, D-целлобиоза, N-Ацетил-D-галактозамин, рафиноза, D-галактозамин солянокислый, L-сорбоза, сахароза, D-глюкоза, лактоза.

Результаты исследований. Для выделения лектинов *L. delbrueckii. ssp. bulgaricus* данную культуру выращивали при температуре 37 °С на синтетической среде А. Welman [11] в течение 3 суток. После выращивания культуру лактобацилл центрифугировали при 200 g в течение 5–7 мин 3 раза. Надосадочную жидкость удаляли. Осадок растворяли в дистиллированной воде. Полученную бактериальную взвесь в течение 10 мин трижды пропускали через шприц с диаметром иглы 1–0,1 мм неоднократно для снятия белков с поверхности бактериальных клеток. Далее центрифугировали при 200 g в течение 15 мин. Полученный осадок отделяли, к надосадочной жидкости добавляли ацетон в соотношении 3:1 и ставили на холод (+5 °С) на сутки. Затем полученный осадок от-



Гель-фильтрация белков *L. delbrueckii. ssp. bulgaricus* на носителе Toyopearl HW-55



бирали, упаривали и ставили на диализ при температуре +5 °C на 24 ч. Дальнейшее выделение лектинов проводили на колонке с помощью метода гель-фильтрации, используя носитель Toyopearl HW-55. Белки элюировали 0,3 М глициновым буфером (pH = 3,0). Выход белковых фракций регистрировали на приборе UvicordSII (LKB). В ходе исследований было выделено два белка (см. рисунок).

Для определения гемагглютинирующей активности белков, выделенных из культуры *L. delbrueckii. ssp. bulgaricus*, использовали трипсинизированные кроличьи эритроциты. Для этого в планшет для иммунологических реакций вносили 50 мкл раствора фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) (PBS). Состав PBS (в расчете на 1 л): NaCl – 8,5 г, Na₂HPO₄ – 1,4 г, NaH₂PO₄ – 0,39 г. Затем добавляли 50 мкл раствора каждого белка в двукратном разведении и 50 мкл трипсинизированных кроличьих эритроцитов. В контрольную ячейку вместо 50 мкл белка вносили 50 мкл PBS. Большей агглютинирующей способностью, судя по титру агглютинации, обладал лектин 1.

Для определения специфичности лектинов, выделенных из культуры *L. delbrueckii. ssp. bulgaricus*, использовали трипсинизированные кроличьи эритроциты. Для этого в планшет для иммунологических реакций вносили 50 мкл раствора фосфатно-солевого буфера (PBS) (pH = 7,4). Затем добавляли 50 мкл раствора каждого белка в двукратном разведении и 50 мкл трипсинизированных и не трипсинизированных кроличьих эритроцитов. В контрольную ячейку вносили 50 мкл кроличьих эритроцитов и 50 мкл PBS.

Использовались следующие углеводы: мальтоза, маннит, дульцит, арабиноза, рамноза, D-манноза, фруктоза, L-фукоза, D-целлобиоза, N-Ацетил-D-галактозамин, рафиноза, D-галактозамин, солянокислый, L-сорбоза, сахароза, D-глюкоза, лактоза.

Было показано, что лектин 1 проявляет специфичность к D-глюкозе, L-фукозе, D-маннозе, D-целлобиозе, а лектин 2 – к D-галактозамину солянокислому.

Выводы. Впервые выделены лектины из молочнокислых бактерий *L. delbrueckii. ssp. bulgaricus*.

Установлена специфичность лектина 1 к D-глюкозе, L-фукозе, D-маннозе, D-целлобиозе и лектина 2 – к D-галактозамину солянокислому.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Взаимодействие фукозоспецифичного лектина с компонентами плазмы крови / В.Е. Никитина [и др.] // Го-

меостаз и инфекционный процесс: материалы 2-й Всерос. конф. – Саратов, 1998. – С. 52.

2. Влияние лектина *Azospirillum brasilense* на кинетику клеточных популяций мезентеральных лимфатических узлов и 38 динамику цитокинового статуса экспериментальных животных / В.Е. Никитина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2002. – № 1. – С. 37–42.

3. Горельникова Е.А., Тихомирова Е.И., Карпунина Л.В. Действие лектина *Paenibacillus polymyxa* на цитокиновый статус мышей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – № 5. – С. 82–85.

4. Карпунина Л.В. Роль агглютинирующих белков азотфиксирующих бацилл и ризобий в жизнедеятельности бактерий и при взаимодействии с растениями: дис. ... д-ра биол. наук. – Саратов, 2002. – 315 с.

5. Лахтин В.М., Лахтин М.В., Поспелова В.В. Лектины, адгезины и лектиноподобные белки лактобацилл и бифидобактерий // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы: материалы Международ. конф., Москва, 1–4 июня 2004. – М., 2004. – С. 7–8.

6. Лахтин М.В. Способ получения лектинов, обладающих противокандидной активностью // Патент РФ № 2367686 2486241. 2012.

7. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцкий А.Д. Лектины. – Львов: Вища шк., 1981. – 156 с.

8. Мухачёва Е.С. Влияние лектина *Paenibacillus polymyxa* на некоторые метаболические процессы животных: дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2004. – 139 с.

9. Некоторые аспекты действия бактериального лектина на фагоцитирующие макрофаги мышей / О.В. Абросимова [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2004. – № 4. – С. 97–98.

10. Полукаров Е.В., Жемеричкин Д.А., Карпунина Л.В. Выделение экзополисахаридов *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* при различных условиях культивирования // Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И. Вавилова. – 2009. – № 4. – С. 20–23.

11. Welman A.D., Maddox I.S., Archer R.H. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* // J. Appl. Microbiol., 2003, Vol. 95, P. 1200–1206.

Долмашкина Алина Сергеевна, аспирант кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Горельникова Елена Александровна, канд. биол. наук, доцент кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Карпунина Лидия Владимировна, д-р биол. наук, проф. кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410005, г. Саратов, ул. Б. Садовая, 220.

Тел.: (8452) 69-25-32.

Ключевые слова: лектин; лактобациллы; агглютинирующие белки; специфичность.

ALLOCATION AND PURIFICATION OF THE LECTINS LACTOBACILLUS DELBRUECKII.SSP. BULGARICUS

Dolmashkina Alina Sergeevna, Post-graduate Student of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Gorelnikova Elena Aleksandrovna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Karpunina Lidia Vladimirovna, Doctor of Biological Sciences, Professor of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Keywords: lectin; Lactobacillus; agglutinating proteins; specificity.

The agglutinating proteins from lactic bacteria of *Lactobacillus delbrueckii* are for the first time secreted. ssp. bulgaricus. The specificity of a lectin 1 is established.

