



УДК 579.873.13:579.234

## Белковый и аминокислотный состав клеточной стенки *Bifidobacterium bifidum* I

Г. В. Юринова<sup>1</sup>, С. В. Осипова<sup>2</sup>, А. В. Пермяков<sup>2</sup>,  
А. М. Собенин<sup>2</sup>, С. М. Попкова<sup>3</sup>, С. И. Лещук<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск

<sup>2</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

<sup>3</sup> Институт эпидемиологии и микробиологии ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН

E-mail: [yurinova@yandex.ru](mailto:yurinova@yandex.ru)

**Аннотация.** Изучен белковый и аминокислотный состав клеточной стенки бифидобактерий (штамм *Bifidobacterium bifidum* I). Показано, что клеточная поверхность представлена обширной группой гетерогенных белков, которые могут участвовать в процессе специфической адгезии. Аминокислоты образца клеточной стенки бифидобактерий могут участвовать как в структурообразовании белковых и гликопептидных единиц клеточной стенки, так и в формировании зон гидрофобности и заряда бактериальной поверхности, ответственной за адгезию.

**Ключевые слова:** клеточная стенка бифидобактерий, аминокислоты, белки, гидрофобность и заряд клеточной поверхности.

Бифидобактерии являются наиболее значимыми представителями нормальной микрофлоры человека всех возрастов – как по удельному весу в составе микробиоценозов, так и по их многофункциональной роли в поддержании гомеостаза макроорганизма.

По данным литературы биологическая активность бифидобактерий во многом определяется компонентами клеточной стенки – пептидогликаном и связанными с ним гликопротеинами, внеклеточными полисахаридами, фосфо- и гликолипидами, поверхностными антигенами – комплексами липотейхоевых кислот и белков [3]. Обеспечение такой важной биологической функции, как поддержание колонизационной резистентности, обеспечивающей зубиоз кишечника, связывают с адгезивной активностью бифидобактерий, изучению которой посвящено немало работ. Однако структурные компоненты клеточной поверхности, участвующие в процессе адгезии, исследованы недостаточно.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение белкового и аминокислотного состава структурных компонентов клеточной стенки бифидобактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* I и оценка вклада отдельных аминокислот в гидрофобность и заряд клеточной поверхности.

### Материалы и методы

В работе использовали штамм *Bifidobacterium bifidum* I, выделенный из коммерческого препарата *Bifidobacterium siccum*, производства «Ланафарм», г. Москва.

Культуру бифидобактерий выращивали в течение 72 час при 37 °С на тиогликолевой среде в анаэробных условиях. Клетки бифидобактерий трехкратно осаждали на рефрижераторной центрифуге K70D при 1500 об/мин в течение 10 мин. Пастообразный осадок клеток суспендировали в 40 мл предварительно охлажденного до 4 °С фосфатного буфера, pH 7,2. Дезинтеграцию клеток бифидобактерий проводили на ультразвуковом дезинтеграторе типа UD-20 двукратно в течение 2 мин.

Полученный дезинтеграт суспендировали в 100 мл фосфатного буфера, pH 7,2 и центрифугировали в течение 10 мин при 2 000 об/мин (центрифуга K70D) для осаждения неразрушенных клеток бифидобактерий. Осадок клеточных стенок бифидобактерий получали центрифугированием полученного супернатанта в течение 10 мин при 8000 об/мин на лабораторной медицинской центрифуге ОПн-8, суспендировали в 30 мл фосфатного буфера, pH 7,2. Надосадочную жидкость отбрасывали. Все операции по осаждению и дезинтеграции клеток бифидобактерий проводили при 4 °С.

Выделение белков клеточной стенки бифидобактерий, проводили путем осаждения сульфатом аммония до 85 % насыщения. Полученный белковый осадок ресуспендировали в 0,125 М Трис-НСI буфере рН 6,8, содержащем 4 % ДДС-На, 20 % глицерина, 10 % 2-меркаптоэтанола и 0,004 % бромфенолового синего и анализировали с помощью электрофореза в 10 % ПААГ, рН 6,8 в присутствии 0,1 % ДДС-На по методу Лэммли [7]. Образец белков наносили в слоту на концентрирующий гель в количестве 20–30 мкл. Электрофорез проводили в течение 8 ч при силе тока 10 мА – вначале и 50 мА – в дальнейшем при комнатной температуре. Для проявления белков электрофореграммы окрашивали в водном растворе, содержащем 0,1 % Кумасси G-250 (Sigma, США), 25 % этанола и 10 % ТХУ. Для обесцвечивания фона пластинку геля помещали в раствор 7 %-ной уксусной кислоты.

Для повышения чувствительности окрашивания гелевый блок обрабатывали нитратом серебра по модифицированной методике [6].

Для определения молекулярной массы полипептидов использовали стандартный набор белков (Sigma, США), содержащий глицеральдегид-3 фосфатдегидрогеназу (36 кДа), овальбумин (45 кДа), глутаматдегидрогеназу (55 кДа), БСА (66 кДа), фруктозо-6-фосфаткиназу (84 кДа), фосфоорилазу Б (97,4 кДа), β-галактозидазу (116 кДа) и миозин (205 кДа). Смесь стандартных белков растворяли в 100 мкл деионизированной воды и наносили в слоту в количестве 5 мкл. Молекулярную массу исследуемых полипептидов определяли по калибровочной кривой, построенной по методике, прилагаемой к набору. Концентрацию белков клеточной стенки бифидобактерий определяли по Лоури [8]. Аминокислотный анализ белковых и общих аминокислот фракции клеточных стенок бифидобактерий осуществляли на аминокислотном анализаторе ААА-881 в Na<sup>+</sup>-цикле. Для получения аминокислот проводили гидролиз белков в 6N HCl при температуре 110 °С в течение 24 часов. Использовали стандарты аминокислот Sigma (США).

### Результаты и обсуждение

Клеточная стенка штамма *Bifidobacterium bifidum* I, представлена обширной группой гетерогенных белков, которые могут участвовать в процессе адгезии. Эти белки представлены тридцатью отдельными субъединицами с молекулярными массами от 44,2 кДа до 125 кДа (рис.).

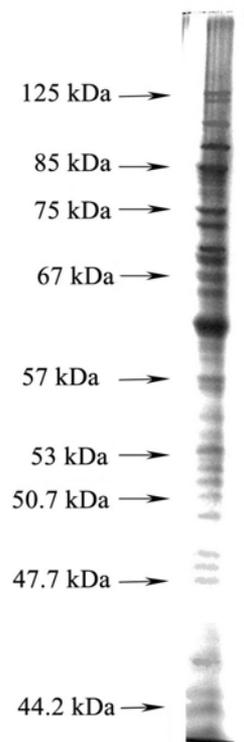


Рис. ДДС-На электрофорез клеточных стенок *Bifidobacterium bifidum* I

Аминокислотный состав образца клеточной стенки бифидобактерий представлен в таблице, из которой видно, что на долю гидрофобных белковых аминокислот (А-аланин, V-валин, L-лейцин, I-изолейцин, F-фенилаланин, M-метионин, P-пролин) приходится 44 мол.%, в сухом остатке – 35 мол.%; доля заряженных белковых аминокислот (D-асп. к-та, E-глут. кислота, R-аргинин, K-лизин, H-гистидин) составляет 34 мол.%, в сухом остатке – 41 мол.%; на полярные незаряженные белковые аминокислоты (Y-тирозин, S-серин, T-треонин, G-глицин) приходится 22 мол. % и 24 мол. % соответственно. Четыре аминокислоты (А-аланин, D-аспарагиновая кислота, E-глутаминовая кислота и G-глицин) составляют более 50 % общего аминокислотного состава белков клеточной стенки бифидобактерий; пять аминокислот (А-аланин, D-аспарагиновая кислота, E-глутаминовая кислота, K-лизин и G-глицин) составляют более 60 % общего аминокислотного состава структурных компонентов клеточной стенки.

Значительное содержание неполярных аминокислот в белках (44 мол.%) говорит в пользу их участия в формировании адгезинов, характеризующихся повышенной гидрофобностью. Наибольший молярный процент аланина (17 мол.%) среди гидрофобных аминокислот образца клеточной стенки указывает на важную роль этой аминокислоты в структурообразовании пептидогликана – основного компонента клеточной стенки грамположительных бактерий [4], к которым относятся бифидобактерии.

Обнаружено почти полное отсутствие серо-содержащих аминокислот.

Из гидрофильных аминокислот на долю аспарагиновой и глутаминовой кислоты в белках приходится 29 мол.%, в сухом остатке – 25 мол.%, что свидетельствует о большем вкладе отрицательно заряженных аминокислот в заряд белков и всей клеточной поверхности бифидобактерий. В то же время глутаминовая кислота может входить в состав пептидогликана в виде амида по  $\alpha$ -карбоксильной группе, осуществляя пептидную связь за счет  $\gamma$ -карбоксила [9], и в этом случае она не будет обладать кислотными свойствами, что будет способствовать уменьшению отрицательного заряда бактериальной поверхности.

Взаимодействие белков клеточной стенки бифидобактерий с другими структурными компонентами, в частности с N-ацетил глюкозаминном пептидогликана может осуществляться посредством ковалентной связи через аспарагиновую кислоту [4], значительное количество которой (12, 99 мол.%) обнаружено в белках образца клеточной стенки (табл.).

Значительную роль в структурообразовании пептидогликана клеточной стенки бифидобактерий принадлежит аминокислотам лизину и глицину, молярные проценты которых в образце клеточных стенок составляют 11, 0 и 14, 86 соответственно.

По данным проведенного электрофореза клеточная поверхность штамма *Bifidobacterium bifidum* I, представлена обширной группой гетерогенных белков, которые могут участвовать в процессе адгезии. Эти белки представлены тридцатью отдельными субъединицами с молекулярными массами от 44,2 кДа до 125 кДа (рис.).

Таким образом, наши исследования показали, что аминокислоты образца клеточной стенки бифидобактерий могут участвовать как в структурообразовании белковых и гликопептидных единиц клеточной стенки, так и в формировании зон гидрофобности и заряда бактериальной поверхности, ответственной за адгезию. Положительно заряженная поверхность бактерий может образовывать специфические комплексы с кислыми полисахаридами (гликозамингликанами) и тем самым проявлять ЛН-подобные свойства. Клеточная поверхность штамма *Bifidobacterium bifidum* I представлена обширной группой гетерогенных белков, которые могут участвовать в процессе адгезии.

В заключение хотелось бы отметить, что перспективы изучения адгезинов бифидобактерий в медицинской биотехнологии связаны с усилением адгезивных свойств штаммов генно-инженерным путем.

Таблица

Аминокислотный состав образца клеточной стенки бифидобактерий

Аминокислота	Молярные проценты	
	Белковые аминокислоты	Аминокислоты сухого остатка
Аланин (А)	17,70	13,85
Валин (V)	6,86	7,72
Лейцин (L)	7,33	6,91
Изолейцин (I)	4,99	3,23
Фенилаланин (F)	1,50	2,27
Тирозин (Y)	0,17	1,34
Серин (S)	6,46	4,49
Треонин (T)	5,29	3,20
Метионин (M)	1,10	–
Аспарагиновая кислота (D)	12,99	9,87
Глутаминовая кислота (E)	16,20	14,86
Аргинин (R)	1,01	3,48
Лизин (K)	2,90	11,00
Пролин (P)	4,55	1,15
Гистидин (H)	0,68	1,77
Глицин (G)	10,27	14,86
$\Sigma$	100	100

## Литература

1. Бевз Н. И. Адгезивные свойства бифидобактерий / Н. И. Бевз, А. М. Лянная, Э. П. Козлов и др. // Всесоюз. семинар «Колонизационная резистентность и химиотерапевтические антибактериальные препараты», 28–29 июня 1988 г. – М., 1988. – Ч. 2. – С. 161–162.

2. Лахтин В. М. Лектины, адгезины и лектиноподобные белки лактобацилл и бифидобактерий. Обзор литературы за последние 10 лет / В. М. Лахтин, М. В. Лахтин, В. В. Поспелова // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания : материалы Межд. конф., 2–4 июня, 2004 г. – М., 2004. – С. 7–8.

3. Новик Г. И. Выделение и характеристика белково-полисахаридного комплекса, секретируемого *Bifidobacterium adolescentis* / Г. И. Новик, Н. И. Астапович, А. А. Самарцев, Н. Е. Рябая // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 5. – С. 621–627.

4. Савельев Е. П. Выделение и характеристика поверхностных белков стрептококка группы А / Е. П. Савельев, Е. И. Блинникова, С. А. Битко, О. П. Дегтерева // Биохимия. – 1987. – Т. 52, вып. 11. – С. 1875–1880.

5. Сибирякова Н. И. Биологическая активность пептидогликана бифидобактерий : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. И. Сибирякова. – М., 1992. – 22 с.

6. Gorg A. *Sciens Tools* / A. Gorg, W. Postel, J. Wesir et al. – 1985. – Vol. 32. – P. 5–9.

7. Laemmli U. K. Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.

8. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randell // *Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

9. Schleifer K. M. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications / K. M. Schleifer, O. Kander // *Bact. Rev.* – 1972. – Vol. 36 (4). – P. 428–430.

**Protein and amino acid composition of bifidus bacteria cell wall**

G. V. Yurina<sup>1</sup>, S. V. Osipova<sup>2</sup>, A. V. Permyakov<sup>2</sup>,  
A. M. Sobenin<sup>2</sup>, S. M. Popkova<sup>3</sup>, S. I. Leschyuk<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Irkutsk State University, Irkutsk

<sup>2</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

<sup>3</sup> Research Institute for Epidemiology and Microbiology, SC ME ESSC SB RAMS

**Abstract.** Protein and amino acid composition of bifidus bacteria cell wall is researched (strain *Bifidobacterium bifidum* I). Cell surface is shown to be a broad group of heterogeneous proteins, which can participate in the process of specific adhesion. Amino acids of a cell wall model can participate as in structure formation of protein and glycopeptide units of cell wall, as in the formation of hydrophobic property areas and charge of bacterial surface, that is responsible for adhesion.

**Key words:** microbiocenosis, bifidobacteria, amino acid, cell wall.

Юринова Галина Валерьевна  
Иркутский государственный университет  
663003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
кандидат биологических наук, доцент кафедры  
физико-химической биологии  
тел. (3952) 24–18–70, факс (3952) 24–18–55  
E-mail: yurina@yandex.ru

Yurina Galina Valeryevna  
Irkutsk State University  
664003, Irkutsk, 5, Sukhe-Batora St.  
Ph.D. in Biology, ass. prof  
phone: (3952) 24–18–70, fax: (3952) 24–18–55  
E-mail: yurina@yandex.ru

Осипова Светлана Владимировна  
Сибирский институт физиологии и биохимии  
растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
кандидат биологических наук, старший научный  
сотрудник, зав. лабораторией технической  
биохимии белка  
тел. (3952) 42–50–09, факс. (3952) 51–07–54

Osipova Svetlana Vladimirovna  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.  
Ph.D. in Biology, senior research scientist, Head of  
Laboratory of Technical Biochemistry of Proteins  
phone: (3952) 42–50–09, fax: (3952) 51–07–54

Пермяков Алексей Викторович  
Сибирский институт физиологии и биохимии  
растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132

Permyakov Aleksey Viktorovitch  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.

кандидат биологических наук, научный сотрудник  
лаборатории технической биохимии белка  
тел. (3952) 42-50-09, факс. (3952) 51-07-54

Собенин Александр Михайлович  
Сибирский институт физиологии и биохимии  
растений СО РАН, 664033  
Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
ведущий технолог, лаборатории физических  
методов анализа  
тел. (3952) 42-50-09, факс. (3952) 51-07-54

Попкова Софья Марковна  
Институт эпидемиологии и микробиологии  
СО РАМН  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
доктор биологических наук, зав. лабораторией  
микрoэкологии человека  
тел. (3952) 33-34-45, факс. (3952) 33-34-45  
E-mail: popkov\_smaf@mail.ru

Лещук Светлана Ивановна  
Институт эпидемиологии и микробиологии  
СО РАМН,  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3,  
доктор биологических наук, ведущий сотрудник  
лаборатории микрoэкологии человека  
тел. (3952) 33-34-45, факс. (3952) 33-34-45

Ph.D. in Biology, research scientist,  
Laboratory of Technical Biochemistry of Proteins  
phone: (3952) 42-50-09, fax: (3952) 51-07-54

Sobenin Aleksandr Mikhailovitch  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.  
senior technologist, Laboratory of Physic-chemical  
Research Methods  
phone: (3952) 42-50-09, fax: (3952) 51-07-54

Popkova Sophya Markovna  
Research Institute for Epidemiology and Microbiology,  
664000, Irkutsk, 3, K. Marks St.  
D.Sc. in Biology, Head of Laboratory of Human  
Microecology  
phone: (3952) 33-34-45, fax: (3952) 33-34-45  
E-mail: popkov\_smaf@mail.ru

Leschuk Svetlana Ivanovna  
Research Institute for Epidemiology and Microbiology,  
664000, Irkutsk, 3, K. Marks St.  
D.Sc. in Biology, leading research scientist,  
Laboratory of Human Microecology  
phone: (3952) 33-34-45, fax: (3952) 33-34-45