

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.222.2:579.252.2:576.32

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-274-284>

Поступила в редакцию 04.04.2022

Received 04.04.2022

А. Н. Морозова, А. Э. Охремчук, Н. А. Головнева

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ, КОДИРУЮЩИХ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ БАКТЕРИЙ *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* БИМ В-813 Д

Аннотация. Проведен молекулярно-генетический анализ генома бактерий *B. longum* БИМ В-813Д, отличающихся высоким уровнем продукции β -галактозидазы. В геноме *B. longum* БИМ В-813Д выявлены гены *Bgal_small_N*, *lacZ1*, *bgaB1*, *bgaB2*, *bgaB3* и *lacZ2*, кодирующие синтез β -галактозидаз. Предполагается, что *lacZ1*, *bgaB2* и *bgaB3*, характеризующиеся высокой степенью идентичности с генами близкородственных видов бифидобактерий, кодируют ферменты, которые осуществляют специфические реакции гидролиза и трансгликозилирования углеводов. Установлено, что ферменты BgaB1, BgaB2 и BgaB3 относятся к семейству GH42 гликозил-гидролаз, а LacZ1 и LacZ2 – к семейству GH2. Детально рассмотрены области генома, кодирующие синтез β -галактозидаз *B. longum* БИМ В-813 Д. Сравнительный анализ локуса *lacZ1* *B. longum* БИМ В-813 Д и сходной области генома AS143_01230 *B. longum* subsp. *longum* MC-42 показал наличие у *B. longum* БИМ В-813 гена транспозазы ISL3. Предполагается, что наличие инсерционной последовательности ISL3 в области *lacZ1* приводит к изменению экспрессии гена и увеличению продукции β -галактозидазы у *B. longum* БИМ В-813Д.

Ключевые слова: бифидобактерии, гликозил-гидролазы, *Bifidobacterium longum*, β -галактозидаза, гидролиз лактозы, трансгликозилирование

Для цитирования: Морозова, А. Н. Молекулярно-генетический анализ детерминант, кодирующих β -галактозидазы бактерий *Bifidobacterium longum* БИМ В-813 Д / А. Н. Морозова, А. Э. Охремчук, Н. А. Головнева // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 274–284. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-274-284>

Antonina N. Morozova, Artur E. Akhremchuk, Natalia A. Golovnyova

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF DETERMINANTS ENCODING β -GALACTOSIDASES OF BACTERIA *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* BIM B-813 D

Abstract. The molecular-genetic analysis of the bacterial genome of the strain *B. longum* BIM B-813D distinguished by a high level of β -galactosidase production was performed. Genes *Bgal_small_N*, *lacZ1*, *bgaB1*, *bgaB2* and *bgaB3*, and *lacZ2*, encoding the synthesis of β -galactosidases, were revealed in the deciphered genome. It was shown that the genes *lacZ1*, *bgaB2*, and *bgaB3* characterized by an enhanced degree of similarity to the genes of closely related bifidobacterial species, presumably code for the enzymes catalyzing the specific reactions of hydrolysis and transglycosylation of carbohydrates. It was found that the enzymes BgaB1, BgaB2 and BgaB3 belong to the GH42 family of glycosyl hydrolases, whereas the enzymes LacZ1 and LacZ2 – to the GH2 family. The genome domains responsible for the synthesis of β -galactosidases in the strain *B. longum* BIM B-813D were studied in detail. A comparative analysis of the locus of *lacZ1* in *B. longum* BIM B-813D and the similar genome fragment AS143_01230 from *B. longum* subsp. *longum* MC-42 detected the presence of the transposase gene ISL3 in the former strain. It was suggested that the insertion of the sequence of ISL3 in the *lacZ1* locus resulted in the modified gene expression and the increased production of β -galactosidase in the strain *B. longum* BIM B-813D.

Keywords: bifidobacteria, glycosyl hydrolases, *Bifidobacterium longum*, β -galactosidases, lactose hydrolysis, transglycosylation

For citation: Morozova A. N., Akhremchuk A. E., Golovnyova N. A. Molecular-genetic analysis of determinants encoding β -galactosidases of bacteria *Bifidobacterium longum* BIM B-813 D. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 274–284 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-274-284>

Введение. В настоящее время микробиота кишечного тракта рассматривается как значимая составляющая здоровья макроорганизма. Микроорганизмы, обитающие в кишечнике, продуцируют множество метаболитов, ферментов, витаминов и других биологически активных веществ, оказывают непосредственное воздействие на биохимические и иммунологические процессы

в организме хозяина [1]. Бифидобактерии – важнейшие представители микробиоты желудочно-кишечного тракта человека и животных, которые широко используются в биотехнологических процессах при создании новых продуктов функционального питания и пробиотических добавок [2]. Специфика биологической активности бифидобактерий во многом обусловлена наличием у них широкого спектра гликозидаз, что позволяет им утилизировать разные углеводы и отражает высокую приспособленность к обитанию в кишечнике [3]. Приведенные в литературе результаты молекулярно-генетических исследований бактерий рода *Bifidobacterium* показали, что в их геномах содержится 8–15 % генов, контролирующих углеводный метаболизм [4].

Одной из основных групп ферментов, участвующих в метаболизме углеводов, являются гликозил-гидролазы [5], в частности β-галактозидаза (β-D-галактозид-галактогидролаза, EC 3.2.1.23) [6], главной функцией которой является гидролиз β-галактозидов с отщеплением остатка β-D-галактозы [7]. Штаммы бактерий, продуцирующие β-галактозидазы, могут быть успешно использованы в составе заквасок в молочной промышленности и для разработки продуктов функционального питания, в том числе с пониженным содержанием лактозы, с целью преодоления лактазной недостаточности. Кроме того, большой интерес вызывает способность β-галактозидаз в определенных условиях синтезировать галактоолигосахариды – пребиотики, избирательно стимулирующие рост полезных бактерий [8].

Цель данной работы – проведение молекулярно-генетического анализа детерминант, кодирующих синтез β-галактозидаз бактерий *B. longum* БИМ В-813Д.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлся штамм *Bifidobacterium longum* БИМ В-813 Д (реклассифицирован из *B. adolescentis* БИМ В-813 Д по результатам полногеномного секвенирования), полученный из штамма *B. longum* МС-42 (ранее – *B. adolescentis* МС-42) путем химического мутагенеза с последующей селекцией по уровню β-галактозидазной активности [9].

Аннотацию генома проводили с помощью конвейера аннотации прокариотических геномов НЦБИ США: Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok). Среднюю нуклеотидную идентичность (СНИ) рассчитывали с помощью веб-сервера Атласа микробных геномов MiGA (<http://microbial-genomes.org>). Для визуализации генетических карт использовали программу SnapGene Viewer 5.2. Спектр семейств гликозил-гидролаз (GH₅) в исследуемом геноме был охарактеризован с помощью базы данных CAZy (<http://www.cazy.org/Genomes.html>). Для визуализации консервативных доменов исследуемых белков использовали сервис Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>). Сравнительный анализ белков с β-галактозидазной активностью у близкородственных видов *Bifidobacterium* проводили с помощью программы Blastp на сервере UniProt (<https://www.uniprot.org>). Для прогнозирования локализации белков использовали сервис PSORTb (<https://www.psort.org/psortb/results.pl>), для сравнительного анализа транскрипционных факторов – базу данных RegPrecise (<https://regprecise.lbl.gov>).

Результаты и их обсуждение. Основываясь на том, что исходным штаммом, из которого селекционирован *B. longum* БИМ В-813 Д, является *B. longum* subsp. *longum* МС-42, особый интерес представляла сравнительная характеристика геномов *B. longum* БИМ В-813 Д [10] и *B. longum* subsp. *longum* МС-42 [11] (табл. 1).

Размер генома *B. longum* БИМ В-813 Д в данном сравнении больше, чем у родительского штамма. Вероятно, это связано с тем, что геном *B. longum* subsp. *longum* МС-42 собран не полностью, а представлен 29 контигами, отдельные из которых могут повторяться в геноме. Этим объясняется и отсутствие информации о количестве инсерционных последовательностей, а также разница в 0,2 % в ГЦ-составе геномов.

При анализе сходства видов путем расчета СНИ с помощью базы данных сервиса MiGA наиболее близкородственными к бактериям *B. longum* БИМ В-813 Д оказались штаммы *B. longum* subsp. *longum* CCUG30698 (98,89 % СНИ) и *B. longum* 105-A (98,87 % СНИ) (табл. 2).

Для выявления особенностей углеводного обмена *B. longum* БИМ В-813 Д детально рассмотрены области генома, кодирующие углевод-модифицирующие гликозил-гидролазы, которые позволяют бифидобактериям усваивать доступные питательные вещества и адаптироваться к условиям обитания в желудочно-кишечном тракте макроорганизма [12].

Таблица 1. Основные параметры геномов *B. longum* БИМ В-813 Д и *B. longum* subsp. *longum* МС-42Table 1. Major genome parameters of *B. longum* BIM B-813 D and *B. longum* subsp. *longum* MC-42

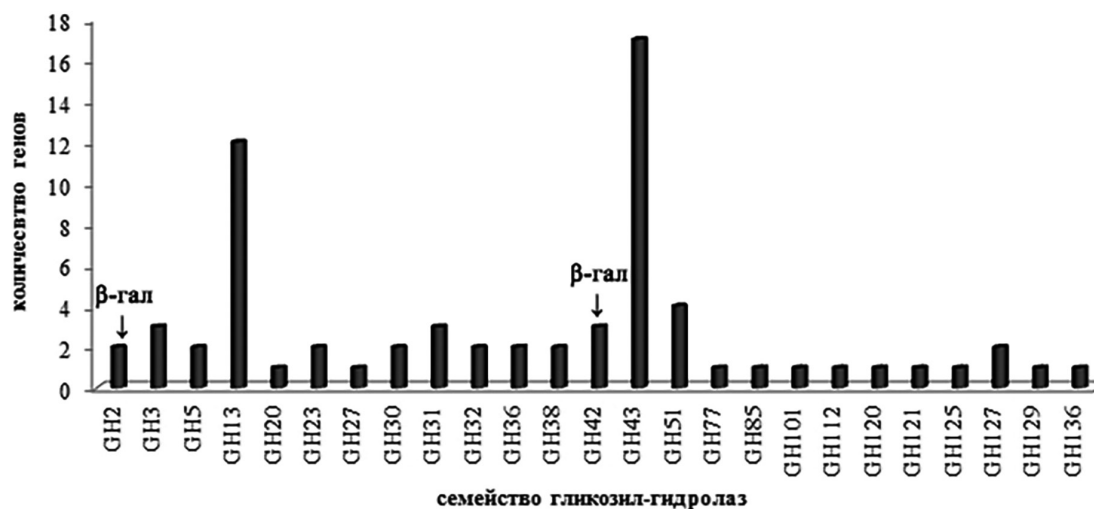
Параметр	<i>B. longum</i> БИМ В-813 Д	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> МС-42
Код доступа в базе данных ГенБанка	CP060493.1	LNCM00000000
Статус генома (кол-во контигов)	Полная последовательность	Контиги (последовательность представлена 29 фрагментами LNCM01000001.1–LNCM01000024.1)
Размер генома, п. н.	2 305 513	2 287 827
Доля ГЦ-пар, %	60	59,8
Наличие плазмид	Нет	Нет
Гены, <i>n</i>	1896	1883
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1745	1782
рРНК	12	4
тРНК	56	51
Инсерционные последовательности, <i>n</i>	52	?
Псевдогены, <i>n</i>	80	46
CRISPR-регион	2	2
Литературная ссылка	[10]	[11]

Таблица 2. Сравнение генома *B. longum* БИМ В-813 Д с геномами близкородственных бифидобактерийTable 2. Comparison of *B. longum* BIM B-813 D genome with genomes of closely related bifidobacteria

Штамм (код доступа в ГенБанке)	Общий размер генома, п. н.	ГЦ, %	СНИ*, %
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> CCUG30698 (NZ_CP011965)	2 458 004	60,2	98,89
<i>Bifidobacterium longum</i> 105-A (NZ_AP014658)	2 290 145	60,1	98,87
<i>Bifidobacterium longum</i> 35624 (NZ_CP013673)	2 264 056	60	98,83
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 1217 ^T (NC_015067)	2 385 164	60,3	98,81
<i>Bifidobacterium longum</i> NCTC11818 ^T (NZ_LR134369)	2 385 160	60,3	98,81

*СНИ между близкородственным штаммом и *B. longum* БИМ В-813 Д.

В геноме *B. longum* БИМ В-813 Д с помощью базы данных CAZy (<http://www.cazy.org/b19291.html>) определено 25 различных семейств генов, кодирующих синтез гликозил-гидролаз (рис. 1). Значительное количество гликозил-гидролаз у *B. longum* БИМ В-813 Д свидетельствует об их важной роли в метаболизме углеводов растительного и животного происхождения [13]. Наибольшее

Рис. 1. Семейства гликозил-гидролаз *B. longum* БИМ В-813 ДFig. 1. Glycosyl hydrolases families detected in *B. longum* BIM B-813 D

количество гликозил-гидролаз в геноме *B. longum* БИМ В-813 Д относится к семействам GH13 (α -глюкозидазы) и GH43 (α -арабинофуранозидазы и β -ксилозидазы).

Анализ генома *B. longum* БИМ В-813 Д показал, что способность ферментировать лактозу и другие β -галактозиды у исследуемого штамма обеспечивается как минимум пятью β -галактозидазами и одной β -глюкуронидазой/ β -галактозидазой, принадлежащими к семействам GH2 и GH42 (рис. 1). По данным CAZy, белки, представляющие собой продукты генов H8S96_05575 (*lacZ1*) и H8S96_06090 (*lacZ2*), являются представителями семейства GH2. β -Галактозидазы, кодируемые детерминантами H8S96_05555, H8S96_06560 и H8S96_07185 (далее обозначены как *bgaB1*, *bgaB2* и *bgaB3* соответственно), относятся к семейству GH42. У *B. longum* БИМ В-813 Д обнаружен также домен H8S96_01940, представленный в базах данных как *Bgal_small_N* (малая субъединица димерной β -галактозидазы).

Проведен сравнительный анализ генетических детерминант, кодирующих β -галактозидазы близкородственных видов бифидобактерий, и определены последовательности, имеющие высокую степень гомологии с генами β -галактозидаз *B. longum* БИМ В-813 Д. Результаты сравнительного анализа представлены в табл. 3.

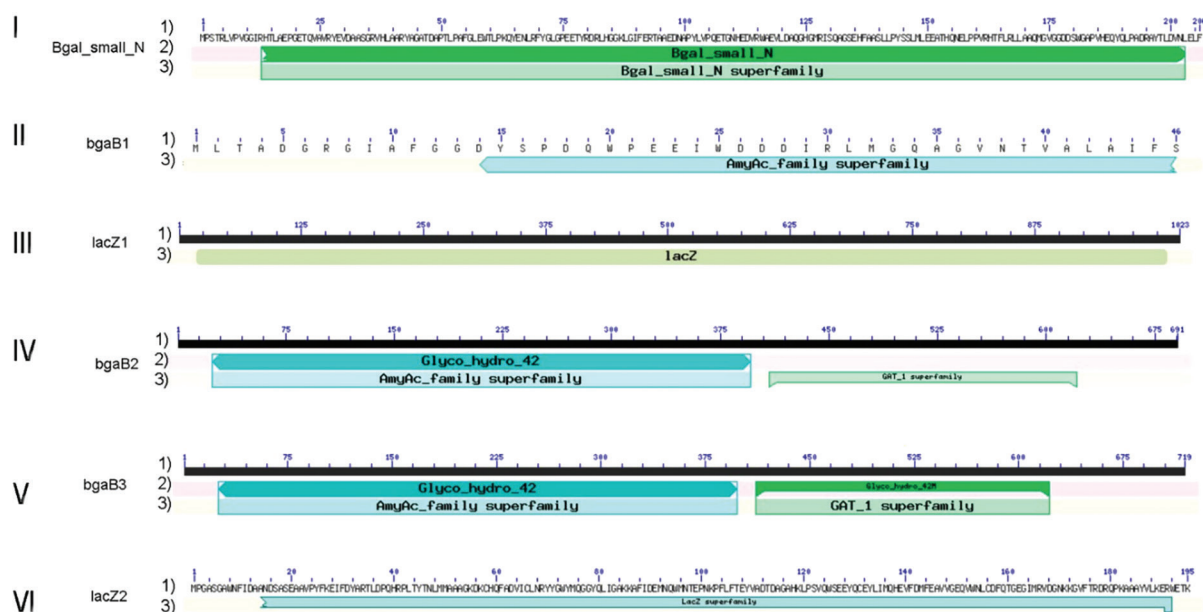
Таблица 3. Сравнительный анализ детерминант, определяющих синтез β -галактозидаз, в геномах *B. longum* БИМ В-813 Д и близкородственных видов

Table 3. Comparative analysis of determinants governing the synthesis of β -galactosidases in the genomes of *B. longum* BIM В-813 D and closely related species

Номер локуса (ген)	Штаммы со схожими генами	Степень сходства, %	Ген/локус	Основная функция продукта гена
H8S96_01940 (<i>Bgal_small_N</i>)	<i>B. longum</i> NCC 2705	97,5	BL1775	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах
	<i>B. scardovii</i> LMG 21589	79,7	BSCA_0794	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах
	<i>B. callitrichos</i> DSM 23973	75,1	BCAL_2078	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах
H8S96_05555 (<i>bgaB1</i>)	<i>B. bifidum</i> BGN4	89,1	<i>bgaB</i>	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах
	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	89,1	<i>bgaB</i>	Гидролиз трансгалактоолигосахаридов. Высокоактивен в отношении Гал(β 1–4)Гал и Гал(β 1–6)-Гал-содержащих олигосахаридов
	<i>B. angulatum</i> DSM 20098	84,8	BIFANG_03660	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах
H8S96_05575 (<i>lacZ1</i>)	<i>B. longum</i> NCC 2705	99,6	<i>lacZ</i>	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах; трансгликозилирование
	<i>B. adolescentis</i> (ATCC 15703/ DSM 20083/NCTC 11814/ E194a)	82	BAD_1605	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах; трансгликозилирование
	<i>B. mongoliense</i> DSM 21395	79,8	BMON_1218	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах; трансгликозилирование
H8S96_06560 (<i>bgaB2</i>)	<i>B. longum</i> NCC 2705	99,9	<i>bga</i>	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах
	<i>B. callitrichidarum</i> TRI 5	96,1	DF196_09550	Гидролиз концевых остатков β -D-галактозы в β -галактозидах
	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> HL96	95,9	<i>beta-galIII</i>	Специфичен для β -D-аномер-связанных галактозидных субстратов. Гидролизует о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONP-Gal) и 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид (X-Gal) и в меньшей степени лактозу. Перенос β -D-галактозы на молекулу β -D-галактозидов (трансгликозилирование)

Номер локуса (ген)	Штаммы со схожими генами	Степень сходства, %	Ген/локус	Основная функция продукта гена
H8S96_07185 (<i>bgaB3</i>)	<i>B. longum</i> NCC 2705	84,6	<i>bgaB</i>	Гидролиз концевых остатков β-D-галактозы в β-галактозидах; трансгликозилирование
	<i>B. callitrichidarum</i> TRI 5	80,5	DF196_03110	Гидролиз концевых остатков β-D-галактозы в β-галактозидах; трансгликозилирование
H8S96_06090 (<i>lacZ2</i>)	<i>B. scardovii</i> LMG 21589	86,1	BSCA_1953	Гидролиз O-гликозидных связей в β-галактозидах
	<i>B. goeldii</i> 2034B	83,3	D2E25_0287	Гидролиз O-гликозидных связей в β-галактозидах
	<i>B. callitrichos</i> DSM 23973	82,5	BCAL_1854	Гидролиз сложных углеводов

Основываясь на том, что β-галактозидазная активность штамма *B. longum* БИМ В-813 Д на порядок выше, чем у исходного *B. longum* subsp. *longum* MC-42, особый интерес представлял сравнительный анализ областей геномов *B. longum* БИМ В-813 Д и *B. longum* subsp. *longum* MC-42, кодирующих β-галактозидазы. Последовательность генома *B. longum* subsp. *longum* MC-42 представлена 29 участками (LNCM01000001.1–LNCM01000029.1), которые находятся в открытом доступе в базе данных НЦБИ США [10]. В геноме *B. longum* subsp. *longum* MC-42 выявлены гены, кодирующие синтез трех β-галактозидаз: AS143_00255, AS143_01230 и AS143_04190. Результаты сравнительного анализа показали, что области, кодирующие β-галактозидазы *bgaB3* *B. longum* БИМ В-813 Д и AS143_04190 *B. longum* subsp. *longum* MC-42, идентичны на 99,72 %. Детальный анализ аминокислотных последовательностей позволил выявить замену двух аминокислот – у *BgaB3* *B. longum* БИМ В-813 Д произошла замена в 164-м кодоне (164C→164W) и в 582-м кодоне (582V→582A). Транскрипционные факторы *lacI*, координирующие синтез данных β-галактозидаз, полностью совпадают. Последовательность H8S96_06560, кодирующая фермент *BgaB2*, на 100 %



1) последовательность; 2) консервативные домены; 3) надсемейства

Рис. 2. Расположение консервативных доменов в пределах аминокислотных последовательностей белков, кодирующих β-галактозидазы *B. longum* БИМ В-813 Д: I – *bga_small_N*; II – *bgaB1*; III – *lacZ1*; IV – *bgaB2*; V – *bgaB3*; VI – *lacZ2*

Fig. 2. Localization of conservative domains within the amino acid sequences of proteins encoding β-galactosidases of *B. longum* BIM В-813 D: I I – *bga_small_N*; II – *bgaB1*; III – *lacZ1*; IV – *bgaB2*; V – *bgaB3*; VI – *lacZ2*

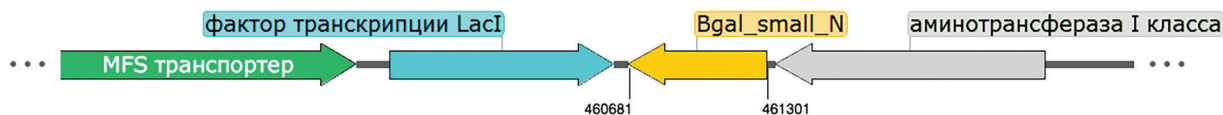


Рис. 3. Генетическая карта локуса, определяющего синтез β -галактозидазы *Bgal_small_N* бактерии *B. longum* БИМ В-813 Д (обозначены координаты расположения в геноме гена *Bgal_small_N*, кодирующего β -галактозидазу; указаны предсказанные функции продуктов генов)

Fig. 3. Genetic map of the locus defining the synthesis of β -galactosidase *Bgal_small_N* in bacteria *B. longum* BIM B-813 D (for gene *Bgal_small_N* encoding β -galactosidase precise position in the genome is indicated; predicted functions of gene products are specified)

идентична последовательности AS143_00255 у *B. longum* subsp. *longum* MC-42. Также выявлено 100 %-ное совпадение областей геномов *lacZ1* *B. longum* БИМ В-813 Д и AS143_01230 родительского штамма, но в данном локусе выявлены изменения в регуляции экспрессии гена *lacZ1*.

Как отмечалось ранее, в геноме штамма *B. longum* БИМ В-813 Д выявлено 6 локусов, предположительно обеспечивающих синтез β -галактозидаз. На основании анализа структурного сходства и аминокислотной последовательности белков представлены консервативные домены исследуемых β -галактозидаз (см. рис. 2).

Рассмотрим более подробно особенности строения и локализации исследуемых β -галактозидаз *B. longum* БИМ В-813 Д.

β -Галактозидаза *Bgal_small_N* (малая цепь β -галактозидазы) – уникальный белок, состоящий из 206 а. о. (рис. 3). Данная β -галактозидаза является представителем надсемейства *Bgal_small_N* (smart01038) (см. рис. 2, I). По данным ресурса SMART (http://smart.embl.de/smart/do_annotation.pl?DOMAIN=SM01038), домен обнаруживается, как правило, в N-конце малой цепи димерных β -галактозидаз. Основной функцией *Bgal_small_N* является связывание лиганда с образованием замкнутой конформации белка [14].

Ген *bgaB1* кодирует β -галактозидазу с молекулярной массой 5 кДа. Данный белок состоит всего из 46 а. о., что, по всей видимости, является результатом делеции в этом локусе. На основании нуклеотидной последовательности гена *bgaB1* определена первичная структура белка, характерная для надсемейства каталитических доменов альфа-амилазы *AmyAc* (cl38930) (см. рис. 2, II). Большинство ферментов с аналогичными последовательностями гидролизуют крахмал, гликоген и родственные олиго- и полисахариды [15]. Отличительной особенностью является наличие рядом с кластером, кодирующим фермент, локуса ДНК, кодирующего домен тримеризации данной β -галактозидазы – H8S96_05550 (рис. 4).

β -Галактозидаза *LacZ1* – продукт гена H8S96_05575 (*lacZ1*), является белком с молекулярной массой 114,5 кДа, состоящим из 1023 а. о. Фермент относится к семейству GH2 гликозил-гидролаз, к представителям надсемейства *lacZ* (cl35850) (см. рис. 2, III). С помощью сервиса PSORTb определена предполагаемая локализация β -галактозидазы *LacZ1* – с высокой вероятностью данный белок является цитоплазматическим, что подтверждается результатами предыдущих исследований [16]. Анализ данного локуса генома показал, что рядом с областью, кодирующей *lacZ1*, встроен мобильный элемент ISL3, который потенциально может влиять на регуляцию экспрессии β -галактозидазы *LacZ1* [17]. При сравнении локуса H8S96_05575 (*lacZ1*) *B. longum* БИМ В-813 Д и сходной области генома AS143_01230 *B. longum* subsp. *longum* MC-42 установлено, что у *B. longum* БИМ В-813 Д в данном локусе присутствует ген транспозазы ISL3 (рис. 4). Предполагается, что наличие инсерционной последовательности ISL3 в области *lacZ1* приводит к изменению экспрессии гена и увеличению продукции β -галактозидазы.

β -Галактозидаза *BgaB2*, белок с молекулярной массой 77,4 кДа, является продуктом гена *bgaB2* и входит в состав семейства GH42 гликозил-гидролаз. Нуклеотидная последовательность кодирует белок из 691 а. о., содержит консервативную последовательность, характерную для семейства GH42 (pfam02449; CDD:396834), и домен глутаминамидотрансферазы 1-го типа GAT 1 (cl00020; CDD:412116) (см. рис. 2, IV). Экспрессия гена *bgaB2* контролируется репрессорами типа *LacI* и АТФ-зависимыми транспортными белками семейства ABC (рис. 5). Для синтеза *BgaB2*

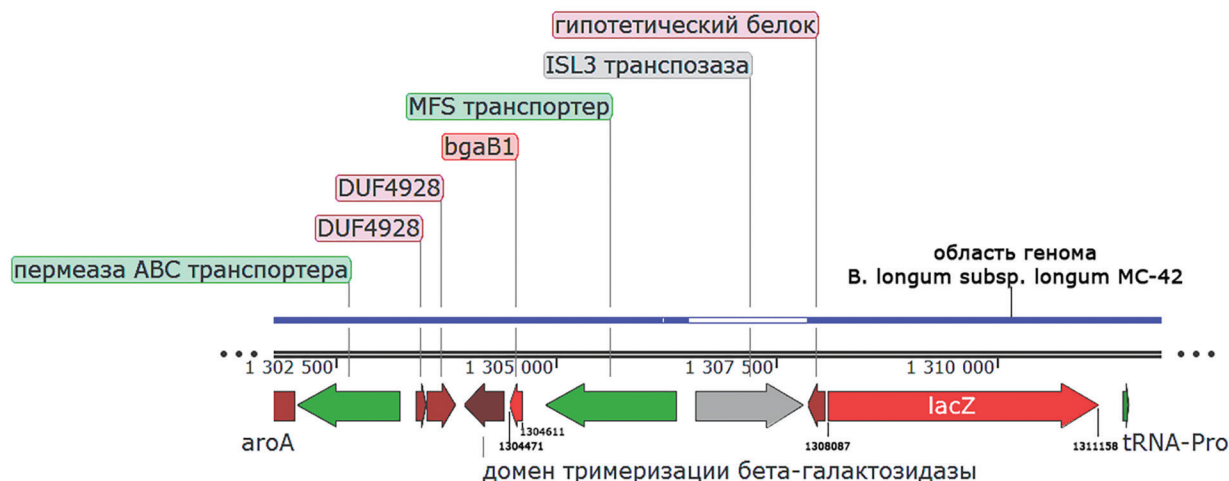


Рис. 4. Генетическая карта локуса, определяющего синтез β -галактозидаз BgaB1 и LacZ1 бактерий *B. longum* BIM B-813 D (указаны предсказанные функции продуктов генов; обозначены координаты расположения в геноме генов *bgaB1* и *lacZ1*, кодирующих β -галактозидазу; отмечен гомологичный участок генома *B. longum* subsp. *longum* MC-42)

Fig. 4. Genetic map of the locus determining the synthesis of β -galactosidases BgaB1 and LacZ1 in bacteria *B. longum* BIM B-813 D (the functions of gene products were predicted; genes *bgaB1* and *lacZ1* encoding β -galactosidases are positioned in accordance with the exact localization in the genome; a homologous locus of *B. longum* subsp. *longum* MC-42 genome was marked)

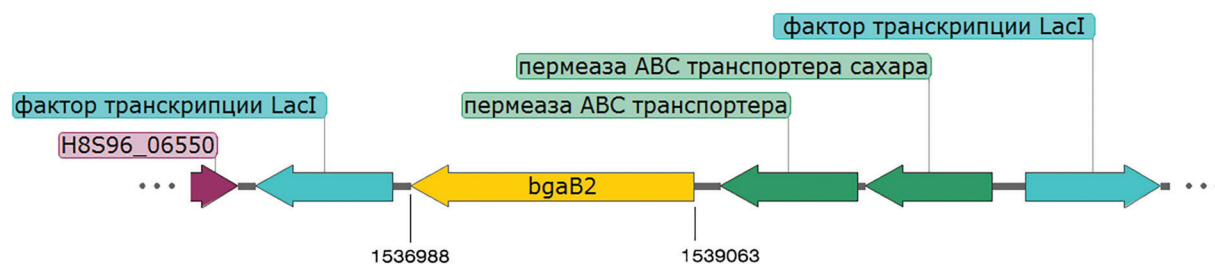


Рис. 5. Генетическая карта локуса, кодирующего синтез β -галактозидазы BgaB2 бактерий *B. longum* BIM B-813 D (обозначены координаты расположения в геноме гена *bgaB2*, кодирующего β -галактозидазу; указаны предсказанные функции продуктов генов)

Fig. 5. Genetic map of the locus of BgaB2 encoding the synthesis of β -galactosidase in bacteria *B. longum* BIM B-813 D (gene *bgaB2*, encoding β -galactosidases production is positioned in a strict compliance with its localization in the genome; the functions of gene products are predicted)

важным является транскрипционный фактор LacR из семейства LacI, специфичный к аллолактозе (конформационной форме лактозы), ген которого расположен рядом с геном β -галактозидазы *bgaB2* и контролирует экспрессию лактозного оперона [18]. Транспортёры типа ABC являются первичными, содержат АТФ-связывающие домены, которые обладают АТФазной активностью для перемещения субстратов через мембраны клеток. ABC-транспортёр состоит из двух пермеаз и связывающего белка [19].

Посредством сервиса PSORTb определена предполагаемая локализация β -галактозидазы BgaB2. Полученные данные указывают на высокую вероятность внутриклеточной локализации белка BgaB2, что подтверждается также результатами предыдущих исследований [16].

β -Галактозидаза BgaB3, продукт гена *bgaB3*, представляет собой белок с молекулярной массой 79,8 кДа, который состоит из 719 а. о. Фермент относится к семейству GH42 гликозил-гидролаз. Область, кодирующая фермент, состоит из двух участков: непосредственно β -галактозидазы GH42 (pfam02449, CDD:396834) и домена глутаминамидотрансферазы 1-го типа GAT 1 (pfam08532, CDD:396931) (см. рис. 2, V). Установлено, что в опероне, кодирующем синтез β -галактозидазы BgaB3, находятся транспортёры, которые отвечают за доставку углеводов в клетку: система ABC –

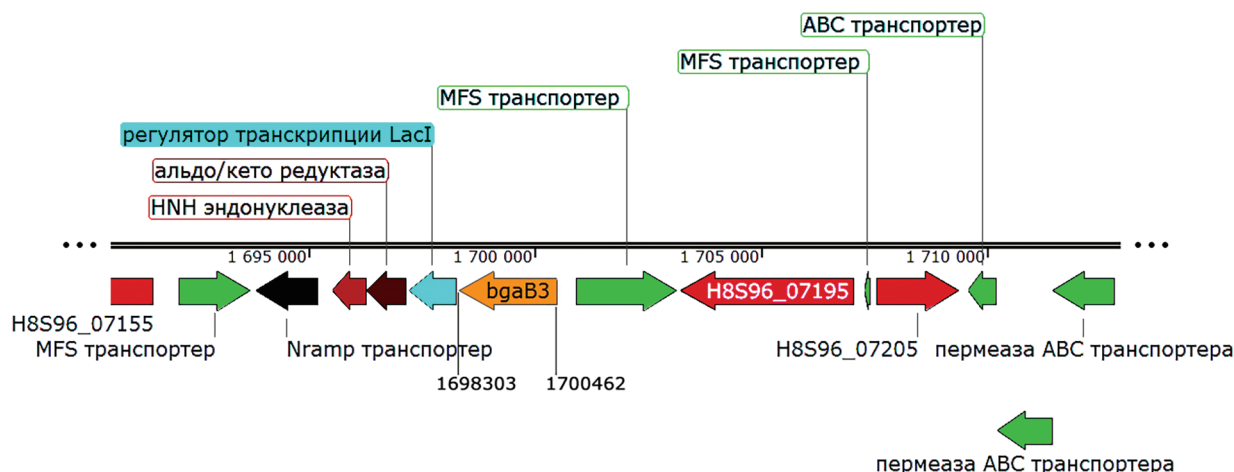


Рис. 6. Генетическая карта локуса, определяющего синтез β -галактозидазы BgaB3 у бактерий *B. longum* БИМ В-813 Д (обозначены координаты расположения в геноме гена *bgaB3*, кодирующего β -галактозидазу; указаны предсказанные функции продуктов генов)

Fig. 6. Genetic map of the locus of BgaB3 defining the synthesis of β -galactosidase in bacteria *B. longum* BIM B-813 D (genome localization of gene *bgaB3* encoding the β -galactosidase synthesis is provided; the predicted functions of gene products are described)

для лактозы, раффинозы и мальтозы, система MFS – для лактозы, глюкозы и сахарозы (рис. 6). Отличительной особенностью данной области является присутствие транспортера NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins) (рис. 6), относящегося к семейству высококонсервативных мембранных белков, осуществляющих транспорт ионов различных металлов – Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} и др., что может указывать на потенциальную возможность регуляции синтеза β -галактозидазы BgaB3 ионами металлов [20].

Как и в случае с β -галактозидазой BgaB2, у BgaB3 рядом с областью, кодирующей синтез фермента, располагается ген-регулятор лактозного оперона – *lacI*, который кодирует белок-репрессор (рис. 6). Кроме того, перед промотором *lac*-оперона располагается сайт связывания с активаторным белком БАК (БРЦ), который усиливает транскрипцию данного оперона.

Анализ области генома показал, что рядом с локусом, кодирующим синтез BgaB3, находится большое количество мобильных генетических элементов типа IS, которые могут изменять работу генов, влияя на регуляцию их экспрессии [17]. В пределах 22 000 п. н. рядом с областью гена *bgaB3* располагается 9 инсерционных последовательностей шести семейств: IS21, ISL3, IS1249, IS110, IS256 и ISB1o2.

Таким образом, установлено, что у *B. longum* БИМ В-813 Д гены утилизации лактозы и других галактозосодержащих углеводов собраны в отдельные кластеры, в которые входят гены регуляторов транскрипции, MFS- и ABC-транспортеры, β -галактозидазы и пермеазы. Экспрессия генов, участвующих в углеводном метаболизме, контролируется репрессорами типа LacI.

С использованием базы данных RegPrecise проведена сравнительная характеристика транскрипционных факторов, выявленных у *B. longum* БИМ В-813 Д, с таковыми у близкородственных штаммов. В геноме *B. longum* БИМ В-813 Д нами выявлено 29 транскрипционных факторов из семейства LacI, которые регулируют экспрессию генов, участвующих в катаболизме углеводов, в ответ на изменение доступных для клеток субстратов. Синтез ферментов, вовлеченных в метаболизм лактозы, у бифидобактерий координируется преимущественно транскрипционным фактором LacR из семейства LacI [21]. Транскрипционные факторы утилизации галактосахаров *B. longum* БИМ В-813 Д и близкородственных штаммов, представленных в коллекции регулонов прокариотических геномов RegPrecise, детально рассмотрены в табл. 4.

Для всех представленных в табл. 4 видов бифидобактерий установлено, что экспрессия генов утилизации лактозы находится под контролем транскрипционных факторов LacR, которые относятся к консервативным регуляторам метаболизма лактозы и сохраняются у большинства видов

бифидобактерий. Данные факторы транскрипции контролируют небольшой набор генов определенного метаболического пути. Для *B. longum* БИМ В-813 Д показано наличие транскрипционного фактора GalR2 из семейства LacI, регулирующего метаболизм лактозы и галактозы. Участие равнозначных транскрипционных факторов, отвечающих за метаболизм одних и тех же углеводов, обеспечивают альтернативные варианты регуляторных путей у *B. longum* БИМ В-813 Д [22].

Т а б л и ц а 4. Сравнительный анализ транскрипционных факторов утилизации углеводов *B. longum* БИМ В-813 Д с аналогичными регуляторами транскрипции у близкородственных штаммов

Table 4. Comparative analysis of the transcription factors controlling the utilization of carbohydrates in *B. longum* BIM В-813 D versus the corresponding transcription controllers in closely related bacterial strains

Регулятор транскрипции	<i>B. longum</i> БИМ В-813 Д	<i>B. adolescentis</i> TCC 15703	<i>B. longum</i> NCC2705	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697	Субстраты регулируемых метаболических путей
BfrR	+	+		+	Фруктоолигосахариды
BgaR	+		+		Бета-галактозиды
GalR2	+				Галактоза, лактоза
GlcR	+	+	+	+	Глюкоза
LacR	+	+	+	+	Лактоза
MsmR	+	+		+	Альфа-галактозиды
RafR	+	+	+	+	Раффиноза

П р и м е ч а н и е. Знаком «+» отмечено наличие транскрипционного фактора.

Заклучение. Анализ нуклеотидной последовательности генома *B. longum* БИМ В-813 Д позволил выявить гены *Bgal_small_N*, *lacZ1*, *bgaB1*, *bgaB2* и *bgaB3* и *lacZ2*, кодирующие синтез β-галактозидаз. Ферменты BgaB1, BgaB2 и BgaB3 принадлежат к семейству GH42 гликозил-гидролаз, а LacZ1 и LacZ2 – к семейству GH2. Установлено, что *lacZ1*, *bgaB2* и *bgaB3* характеризуются высокой степенью идентичности с генами близкородственных видов бифидобактерий и, как предполагается, кодируют ферменты, осуществляющие специфические реакции гидролиза и трансгликозилирования углеводов. Возможно, высокая β-галактозидазная активность исследуемого штамма *B. longum* БИМ В-813 Д обусловлена горизонтальным переносом ISL3 элемента в область, регулирующую экспрессию гена *lacZ1*. Выявлены транспортеры, являющиеся связующим звеном внутриклеточного углеводного метаболизма, а также проанализированы транскрипционные факторы, координирующие работу систем утилизации углеводов. Обнаружено присутствие транскрипционных факторов из семейства LacI, отвечающих за метаболизм лактозы у *B. longum* БИМ В-813 Д. Представленные результаты являются основой для детальных исследований β-галактозидаз бифидобактерий.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в работе сотрудникам Центра аналитических и гено-инженерных исследований Института микробиологии НАН Беларуси и лично канд. биол. наук Леониду Николаевичу Валеновичу.

Acknowledgements. The authors express sincere gratitude to the researches of the Center for Analytical and Genetic Engineering Research of the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus and personally to Leonid N. Valenovich, Ph. D.

Список использованных источников

1. Микробиота / под ред. Е. Л. Никонова, Е. Н. Поповой. – М. : Медиа Сфера, 2019. – 256 с.
2. Mitsuoka, T. Development of functional foods / T. Mitsuoka // Biosci. Microbiota Food Health. – 2014. – Vol. 33, N 3. – P. 117–128. <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.117>
3. Rodriguez, C. I. Evolutionary relationships among bifidobacteria and their hosts and environments / C. I. Rodriguez, J. B. H. Martiny // BMC Genomics. – 2020. – Vol. 21, N 1. – Art. 26. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6435-1>
4. Klijn, A. Lessons from the genomes of bifidobacteria / A. Klijn, A. Mercenier, F. Arigoni // FEMS Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 29, N 3. – P. 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.010>
5. Pokusaeva, K. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria* / K. Pokusaeva, G. F. Fitzgerald, D. van Sinderen // Genes Nutr. – 2011. – Vol. 6, N 3. – P. 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
6. Uchil, P. D. β-Galactosidase / P. D. Uchil, A. Nagarajan, P. Kumar // Cold Spring Harb. Protoc. – 2017. – Vol. 2017, N 10. <https://doi.org/10.1101/pdb.top096198>

7. Zolnere, K. The comparison of commercially available β -galactosidases for dairy industry: review / K. Zolnere, I. Ciprovica // The Annual 23th International scientific conference “Research for Rural Development 2017” (Jelgava (Latvia), May 17–19, 2017) / Latvia Univ. of Agriculture. – Jelgava, 2017. – Vol. 1. – P. 215–222.
8. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates / C. Guerrero [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2015. – Vol. 70. – P. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
9. Морозова, А. Н. Использование химического мутагенеза для получения штамма бифидобактерий с повышенной продукцией β -галактозидазы / А. Н. Морозова, Н. А. Головнева // Молодежь в науке – 2011 : материалы Междунар. науч. конф. молодых ученых, г. Минск, 25–29 апр. 2011 г. : в 5 ч. – Минск, 2012. – Ч. 3 : Сер. биол. наук ; Сер. мед. наук / редкол. : И. Д. Волоотовский (гл. ред.) [и др.]. – С. 132–135.
10. Морозова, А. Н. Особенности генома *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д, отражающие адаптацию бактерий к среде обитания / А. Н. Морозова, А. Э. Охремчук, Н. А. Головнева // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / редкол. : Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 13. – С. 66–76.
11. Tupikin, A. E. Draft genome sequence of the probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strain MC-42 / A. E. Tupikin, A. I. Kalmykova, M. Kabilov // *Genome Announc.* – 2016. – Vol. 4, N 6. – P. e01411-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01411-16>
12. Devika, N. T. Deciphering the metabolic capabilities of *Bifidobacteria* using genome-scale metabolic models / N. T. Devika, K. Raman // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, N 1. – Art. 18222. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54696-9>
13. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota / A. E. Kaoutari [et al.] // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – Vol. 11, N 7. – P. 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
14. A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*), β -galactosidase / D. H. Juers [et al.] // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40, N 49. – P. 14781–14794. <https://doi.org/10.1021/bi011727i>
15. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases / Š. Janeček [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – Vol. 71, N 7. – P. 1149–1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>
16. Galactosidases of strain *Bifidobacterium Longum* Bim B-813d with transglycosylating activity / A. Morozova [et al.] // *Eurasian J. Appl. Biotechnol.* – 2021. – N 2. <https://doi.org/10.11134/btp.2.2021.5>
17. Guglielmetti, S. Mobilome and genetic modification of bifidobacteria / S. Guglielmetti, B. Mayo, P. Álvarez-Martín // *Beneficial Microbes.* – 2013. – Vol. 4, N 2. – P. 143–166. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0031>
18. Structural explanation for allolactose (*lac* operon inducer) synthesis by *lacZ* β -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the *lac* repressor / R. W. Wheatley [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, N 18. – P. 12993–3005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455436>
19. Zafar, H. Comparative analyses of the transport proteins encoded within the genomes of nine bifidobacterium species / H. Zafar, M. H. Saier (Jr.) // *Microb. Physiol.* – 2022. – Vol. 32, N 1–2. – P. 30–44. <https://doi.org/10.1159/000518954>
20. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter / H. Gunshin [et al.] // *Nature.* – 1997. – Vol. 388, N 6641. – P. 482–488. <https://doi.org/10.1038/41343>
21. Comparative genomics and evolution of regulons of the *LacI*-family transcription factors / D. A. Ravcheev [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00294>
22. Genomics of the genus bifidobacterium reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment / C. Milani [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2016. – Vol. 82, N 4. – P. 980–991. <https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15>

References

1. Nikonova E. L., Popova E. N. (eds.). *Mikrobiota*. Moscow, Media Sfera Publ., 2019. 256 p. (in Russian).
2. Mitsuoka T. Development of functional foods. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2014, vol. 33, no. 3, pp. 117–128. <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.117>
3. Rodriguez C. I., Martiny J. B. H. Evolutionary relationships among bifidobacteria and their hosts and environments. *BMC Genomics*, 2020, vol. 21, no. 1, art. 26. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6435-1>
4. Klijn A., Mercenier A., Arigoni F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, vol. 29, no. 3, pp. 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.010>
5. Pokusaeva K., Fitzgerald D., van Sinderen G. F. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes and Nutrition*, 2011, vol. 6, no. 3, pp. 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
6. Uchil P. D., Nagarajan A., Kumar P. β -Galactosidase. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017, vol. 2017, no. 10. <https://doi.org/10.1101/pdb.top096198>
7. Zolnere K. Ciprovica I. The comparison of commercially available β -galactosidases for dairy industry: review. *The Annual 23th International scientific conference “Research for Rural Development 2017” (Jelgava (Latvia), May 17–19, 2017)*. Vol. 1. Jelgava, 2017, pp. 215–222.
8. Guerrero C., Vera C., Conejeros R., Illanes A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, vol. 70, pp. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
9. Morozova A. N., Golovneva N. A. The use of chemical mutagenesis to generate a strain of bifidobacteria with increased production of β -galactosidase. *Molodezh' v nauke – 2011: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchennykh (g. Minsk, 25–29 aprelya 2011 goda). Chast' 3: Seriya biologicheskikh nauk; Seriya meditsinskikh nauk* [Youth in Science – 2011: Proceedings of the International scientific conference of young scientists (Minsk, April 25–29, 2011). Part 3: Biological sciences series; Medical sciences series]. Minsk, 2011, pp. 132–135 (in Russian).

10. Morozova A. N., Okhremchuk A. E., Golovneva N. A. Genome characteristics of *Bifidobacterium longum* BIM B-813D, reflecting the ability of bacteria to adapt to the environment. *Mikrobnaya biotekhnologiya: fundamental'nye i prikladnyye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 13* [Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: collection of scientific works. Volume 13]. Minsk, 2021, pp. 66–76 (in Russian).
11. Tupikin A. E., Kalmykova A. I., Kabilov M. Draft genome sequence of the probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strain MC-42. *Genome Announcements*, 2016, vol. 4, no. 6, pp. e01411-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01411-16>
12. Devika N. T., Raman K. Deciphering the metabolic capabilities of *Bifidobacteria* using genome-scale metabolic models. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, art. 18222. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54696-9>
13. Kaoutari A., Armougom F., Gordon J. I., Raoult D., Henrissat B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, vol. 11, no. 7, pp. 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
14. Juers D. H., Heightman T. D., Vasella A., McCarter J. D., Mackenzie L., Withers S. G., Matthews B. W. A Structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*), β -galactosidase. *Biochemistry*, 2001, vol. 40, no. 49, pp. 14781–14794. <https://doi.org/10.1021/bi011727i>
15. Janeček Š., Svensson B., MacGregor E. A. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, vol. 71, no. 7, pp. 1149–1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>
16. Morozova A., Golovnyova N., Ryabaya N., Safonova M. Galactosidases of strain *Bifidobacterium Longum* Bim B-813d with transglycosylating activity. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2021, no. 2. <https://doi.org/10.11134/btp.2.2021.5>
17. Guglielmetti S., Mayo B., Álvarez-Martín P. Mobilome and genetic modification of bifidobacteria. *Beneficial Microbes*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 143–166. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0031>
18. Wheatley R. W., Lo S., Jancewicz L. J., Dugdale M. L., Huber R. E. Structural explanation for allolactose (*lac* operon inducer) synthesis by *lacZ* β -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the *lac* repressor. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol. 288, no. 18, pp. 12993–3005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455436>
19. Zafar H., Saier M. H. (Jr.) Comparative analyses of the transport proteins encoded within the genomes of nine bifidobacterium species. *Microbial Physiology*, 2022, vol. 32, no. 1–2, pp. 30–44. <https://doi.org/10.1159/000518954>
20. Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V., Gunshin Y., Romero M. F., Boron W. F., Nussberger S., Gollan J. L., Hediger M. A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, vol. 388, no. 6641, pp. 482–488. <https://doi.org/10.1038/41343>
21. Ravcheev D. A., Khoroshkin M. S., Laikova O. N., Tsoy O. V., Sernova N. V., Petrova S. A., Rakhmaninova A. B., Novichkov P. S., Gelfand M. S., Rodiono D. A. Comparative genomics and evolution of regulons of the *LacI*-family transcription factors. *Frontiers in Microbiology*, 2014, vol. 5, art. 294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00294>
22. Milani Ch., Turrioni F., Duranti S., Lugli G. A., Mancabelli L., Ferrario Ch., Sinderen D., Ventura M. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, vol. 82, no. 4, pp. 980–991. <https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15>

Информация об авторах

Морозова Антонина Николаевна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bifidoby@yandex.by

Охремчук Артур Эдуардович – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: okhrem4ukartur@yandex.ru

Головнева Наталья Алексеевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: biochem_lab@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Antonina N. Morozova – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bifidoby@yandex.by

Artur E. Akhremchuk – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: okhrem4ukartur@yandex.ru

Natalia A. Golovnyova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: biochem_lab@mbio.bas-net.by