

применением современного кремнезёмного сорбента "Белый уголь".

У больных хроническим некалькулезным холециститом (ХНХ) на фоне синдрома экологического иммунодефицита (СЕИ) установлена активация процессов липопероксидации, что характеризовалось накоплением в сыворотке крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) - диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, а также повышением показателя перекисного гемолиза эритроцитов. Использование фитопрепарата из артишока колючего Гепар-ПОС и кремнезёмного энтеросорбента "Белый уголь" (аэросил) способствует нормализации показателей липопероксидации, что свидетельствует о патогенетическом значении использования указанной комбинации препаратов. Исходя из полученных данных, можно считать патогенетически обоснованным, целесообразным и клинически перспективным включение современного кремнезёмного энтеросорбента "Белый уголь" (аэросил) и фитопрепарата из артишока колючего Гепар-ПОС в комплексную терапию обследованных больных ХНХ.

**Ключевые слова:** хронический некалькулезный холецистит, синдром экологического иммунодефицита, липопероксидация, "Белый уголь", Гепар-ПОС, лечение.

#### Summary

**Bykadorov V.I.** Dynamics of parameters of lipid peroxidation in patients with chronic uncalculous cholecystitis on background of ecological immunodeficiency syndrome using phytopreparation of artichoke Hepar-POS and enterosorbition with sorbent "White coal".

In patients with chronic uncalculous cholecystitis (CUC) at the presence of ecological immunodeficiency syndrome (ECS) installed the activation of lipid peroxidation, which was characterized by the accumulation of serum lipid peroxidation products (LPO) - diene conjugates and malone dialdehyd and an increase in peroxidation index of erythrocyte hemolysis. The use of artichoke phytopreparation Hepar-POS and silicon enterosorbent "White Coal" (Aerosil) contributes to the normalization of lipid peroxidation, indicating that the pathogenic significance of this combination of using drugs. Based on the data, can be considered as pathogenetically substantiated, feasible and clinically promising inclusion of modern silicon unearthy enterosorbent "White Coal" (Aerosil) and herbal remedies from the artichoke Hepar-POS in the complex therapy of patients.

**Key words:** chronic uncalculous cholecystitis, ecological immunodeficiency syndrome, lipoperoxidation, "White Coal", Hepar-POS, treatment.

**Рецензент:** д.мед.н., проф. Я.А. Соцька

УДК 663.031:577.152.3+577.151

## ФЕРМЕНТ $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗА: АНАЛІЗ ДЖЕРЕЛ ОДЕРЖАННЯ, ВЛАСТИВОСТЕЙ, СПОСОБІВ ОЧИСТКИ

**А.В. Кузьменко, Н.В. Дехтяренко, О.М. Дуган**  
Національний технічний університет України "КПІ"

На даний час застосування ферментів для виробництва продукції у харчовій промисловості є актуальним завданням. На фоні погіршення екологічної ситуації та підвищення навантажень на здоров'я людини збільшується число людей, які страждають порушеннями травлення у зв'язку з недостатнім утворенням ферментів. Одним з важливих порушень ферментних систем являється дефіцит в організмі людини лактази (гіполактазія). Лактаза ( $\beta$ -галактозидаза) - фермент, що здійснює розщеплення лактози (молочного цукру) до глюкози і галактози. Відсутність або нестача даного ферменту призводить до того, що люди не можуть використовувати в своєму раціоні молоко та молочні продукти, які є такими необхідними для повноцінного росту та розвитку організму людини [4]. Але, особливо гостро стоїть питання відносно грудних немовлят, що мають вроджений дефіцит лактози, адже для них молоко являється єдиним джерелом харчування, що містить в збалансованому вигляді всі необхідні поживні речовини. Оскільки заміна молока на синтетичні суміші може привести до порушення розвитку організму, то не варто використовувати його штучні аналоги у такому ранньому віці [9]. З метою компенсації дефіциту  $\beta$ -галактозидази застосовують ферментні препарати, головним призначенням яких є розщеплення лактози, що міститься в молочних продуктах, у легко засвоювану форму для організму. Ці препарати також знайшли своє застосування у хлібопеченні, молочній та кондитерській галузях.

На даний час в більшості країн Західної Європи, Аргентині, Канаді, Японії, США вже налагоджено виробництво низьколактозних молочних продуктів. У зв'язку з тим, що більшість ферментних препаратів, використовуваних для гідролізу лактози,

є закордонними, а, отже, високовартісними, промислового низьколактозного молока в Україні на сьогодні не випускається. Так само не з'явилося на ринку і вітчизняних, більш дешевих препаратів  $\beta$ -галактозидази для отримання молочних продуктів з пониженим вмістом лактози. Тому, розробка ферментних препаратів з діючим ферментом  $\beta$ -галактозидазою мікробного походження є актуальним завданням для науковців. У середньому, близько 20% жителів нашої країни страждають на гіполактазію. Така статистика спонукає приділяти належну увагу до шляхів вирішення цієї проблеми. З кожним роком з'являються наукові праці, присвячені цьому питанню. Тому, метою даної роботи був аналіз інформації щодо джерел отримання  $\beta$ -галактозидази, властивостей цього ферменту та способів очистки.

Застосування  $\beta$ -галактозидази в різноманітних сферах народного господарства ґрунтується на її здатності гідролізувати погано розчинний, несолодкий, практично не придатний до зброджування, але здатний до кристалізації дисахарид лактозу до розчинних, солодких, легко зброджуваних та здатних легко включатися до обміну речовин цукрів глюкози і галактози (рисунок 1).

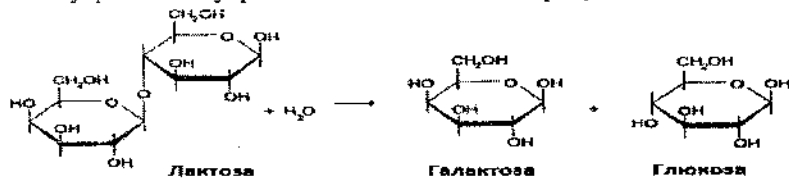


Рис.1. Реакція гідролізу лактози за участю фермента  $\beta$ -галактозидази [6].

$\beta$ -Галактозидаза ( $\beta$ -D-галактозидгалактогідролаза) відноситься до класу гідролаз і являється одним з найпоширеніших ферментів, що здійснюють гідроліз глікозидних зв'язків.  $\beta$ -галактозидаза міститься в тваринах, рослинних клітинах та мікроорганізмах. Цей фермент виявлений в яблуках, томатах, грушах, авокадо. Він міститься в тонкому кишечнику ссавців, особливо в період молочного вигодовування, та в молоці в період лактації [1]. Але, з метою промислового отримання ферменту найчастіше використовують мікроорганізми: бактерії, дріжджі та гриби, які синтезують  $\beta$ -галактозидази з необхідним різноманіттям вла-

стивостей за визначених умов. Крім того, вагомою перевагою мікробних продуцентів, що мають, як правило, індукцибельний механізм синтезу ферменту, являється можливість їх регульованого культивування в присутності індуктора на доступних субстратах, що часто являються відходами промисловості.

Активними продуцентами  $\beta$ -галактозидази є спороносні бактерії *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans* та молочнокислі бактерії *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*. Серед неспороносіх бактерій особливо ретельно вивчена  $\beta$ -галактозидаза *Escherichia coli*, але вона застосовується досить обмежено (в наукових цілях), адже цей продуцент являється потенційно патогенним мікроорганізмом. Висока активність  $\beta$ -галактозидази виявлена в багатьох дріжджових культурах, серед яких можна назвати *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces lactis*, *Candida pseudotropicalis*, *Torulopsis versatilis* [12].

Серед дріжджових мікроорганізмів знайдені перспективні продуценти  $\beta$ -галактозидази, особливо серед представників роду *Kluveromyces* (*Kluveromyces fragilis*, *Kluveromyces aestuarii*, *Kluveromyces wikenii*, *Kluveromyces bulgaricus*) [14]. Бактерії та дріжджі утворюють внутрішньоклітинну  $\beta$ -галактозидазу, для одержання якої необхідні додаткові стадії руйнування клітинної стінки та виділення фермента, що ускладнює технологічний процес і приводить до збільшення втрат кінцевого продукту.

Найбільш цікавими з точки зору промислового використання є міцеліальні гриби, які синтезують екзофермент, що накопичується у значній кількості в культуральній рідині при їх глибинному культивуванні. Широко досліджувалися  $\beta$ -галактозидази *Neurospora crassa*, але даний продуцент визнаний неперспективним для практичного використання внаслідок надзвичайної легкості його спор [18]. Відомі в якості продуцентів мікроскопічні гриби роду *Sclerotium*. Продуцент целюлолітичного комплексу ферментів - гриб *Trichoderma reesei* при вирощуванні на лактозі в неперевному режимі культивування утворює позаклітинну  $\beta$ -галактозидазу. Поширеними продуцентами являються *Alternaria tenuis*, *Curvularia inaequalis* [7]. Японськими дослідниками детально вивчені такі продуценти  $\beta$ -галактозидази, як *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori* [16]. Проводився пошук продуцентів  $\beta$ -

галактозидази серед термофільних мікроорганізмів, які здатні рости при температурі 45-60 С на середовищі з єдиним джерелом вуглецю - лактозою. Був виділений штам *Mucor pusillus*, що продукує термостабільну  $\beta$ -галактозидазу, яка може використовуватися для обробки молока під час пастеризації.

Більш активними продуцентами  $\beta$ -галактозидази визнані гриби роду *Penicillium*, а саме *Penicillium terlikowski*, *Penicillium multicolor*, *Penicillium canescens*. Для *Penicillium canescens* було показано, що на середовищі з буряковим жомом або з соєвим борошном в якості джерела вуглецю на долю позаклітинної  $\beta$ -галактозидази, активність якої може досягати 30-50 од/мл поживного середовища, приходиться до 20-30% всіх синтезованих клітиною білків [3]. При використанні в якості продуценту штаму *Penicillium canescens* F-178 розроблена технологія отримання ферментного препарату Лактоканесцин, який призначений для гідролізу лактози в молочній сироватці та може широко застосовуватися у харчовій промисловості [12].

$\beta$ -Галактозидази, виділені з різних продуцентів, відрізняються за своїми фізико-хімічними характеристиками.

Бактеріальні та дріжджеві  $\beta$ -галактозидази - внутрішньоклітинні ферменти з молекулярною масою більше 200 кД та складною четвертинною структурою, яка містить декілька субодиниць. Фермент, виділений з *Escherichia coli*, містить 4 субодиниці, а *Bacillus megaterium* - 2. Субодиничною будовою також характеризується дріжджева  $\beta$ -галактозидаза *Kluveromyces fragilis* [13].  $\beta$ -Галактозидази, виділені з бактерій та дріжджів, не стабільні у розчинах, так як еволюційно пристосовані до каталізу в закріпленому на клітинному рівні стані. Тому, такі ферменти частіше застосовуються іммобілізованими на різноманітних носіях, оскільки вони швидко розпадаються на менш активні субодиниці. рН-оптимум дії бактеріальних і дріжджевих  $\beta$ -галактозидаз знаходиться в нейтральній зоні (6,8-7,2). Враховуючи досить вузькі межі рН-стабільності, навіть незначні відхилення значень рН середовища від оптимального призводять до значного спаду активності ферменту.  $\beta$ -Галактозидази *Kluveromyces fragilis* та *Kluveromyces lactis* не проявляють свою дію при рН нижче 6,0 і вище 8,0 [10]. Температурний оптимум для бактеріальних та дріжджевих  $\beta$ -галактозидаз - 30-35 С. При підвищенні температури

ри більше 40 С спостерігається швидка інактивація ферменту.

$\beta$ -Галактозидази мікроскопічних грибів - позаклітинні ферменти. Даний факт суттєво відрізняє їх від бактеріальних та дріжджевих галактозидаз. Їх молекулярна маса менша 200 кД, активність не залежить від іонів металів, в молекулу ферменту входить вуглеводневий фрагмент у кількості 5-30%. Саме відмінністю вуглеводневого компоненту молекули ферменту можна пояснити існування декількох ізоформ  $\beta$ -галактозидази у одного й того ж продуцента та відмінності в їх властивостях [2]. При визначенні амінокислотного складу грибних  $\beta$ -галактозидаз відзначений високий вміст гліцину, аланіну, серину, глутамінової кислоти та проліну [10]. Відмічена висока стійкість грибних  $\beta$ -галактозидаз в широкому діапазоні рН (від 2,5 до 8,0 з оптимумом 3,5-5,5) і температур (від 1 С до 70 С з оптимумом 50-60 С) [12]. Відомо, що практично всі  $\beta$ -галактозидази інгібуються продуктами реакції - глюкозою і галактозою, що необхідно враховувати при одержанні продуктів з високим ступенем конверсії лактози [11].

Для одержання ферментних препаратів різного ступеню очистки застосовується велика кількість методик, які включають осадження органічними розчинниками, висолювання, ультрафільтрацію, гель-фільтрацію, іонообмінну хроматографію, гель-електрофорез, афінну хроматографію та інші. Обрання певного способу залежить від властивостей фермента, джерела його отримання та сфери застосування.

Для очистки бактеріальних  $\beta$ -галактозидаз часто застосовують афінну хроматографію. Так, дослідникам за допомогою афінної хроматографії вдалося з культури *Bacillus megaterium* за одну стадію отримати очищений у 300 разів фермент [17].

Вперше в очищеному вигляді з дріжджів *Saccharomyces lactis* була отримана  $\beta$ -галактозидаза з питомою активністю 139 од/мг білку. В результаті очистки за допомогою хроматографії на сефадексі та гідроксилапатиті був отриманий фермент, очищений в 90 разів, але він був не гомогенним [15]. З дріжджів *Kluveromyces fragilis* було отримано ферментний препарат з активністю до 1500 од/г. Схема його отримання включала вакуум-випарювання прозорих екстрактів дріжджів та сушку. Вихід препарату склав 90% при питомій активності ферменту 5 од/мг білку [10]. Вперше на теренах колишнього СРСР гриба  $\beta$ -галактозидаза була виділена

та очищена в 47 разів із культуральної рідини *Curvularia inaequalis* з питомою активністю 52 од./мг білку. Процедура очистки включала в себе осадження і переосадження органічними розчинниками, іонообмінну хроматографію і рехроматографію на целюлозі, сорбцію на гідроксилапатиті. Вихід продукту за активністю становив 19% [7].

Із культуральної рідини мікроскопічного гриба *Penicillium canescens* F-436 був отриманий препарат високоочищеної  $\beta$ -галактозидази з виходом активності 7% та ступенем очистки в 93,3 рази. Очистка включала в себе ультрафільтрацію, осадження органічними розчинниками та сульфатом амонію, гель-фільтрацію на сефадексі [8]. Практичний інтерес мають дослідження, які ведуться багатьма дослідниками, по отриманню  $\beta$ -галактозидази в іммобілізованому вигляді. Були отримані стабільні препарати іммобілізованої  $\beta$ -галактозидази із використанням ацилювання білків та іммобілізації на КМ-целюлозі. Активність карбоксильних груп полімера проходила з утворенням азиду. Були отримані препарати шляхом включення ферменту в поліакриламідний гель, а також шляхом зв'язування  $\beta$ -галактозидази з полімером.

Для іммобілізації галактозидази був також використаний новий метод адсорбції. Фермент модифікували включенням хлортриазинового барвника з введенням в фермент аніонних та гідрофобних активних груп. Барвник зв'язувався з галактозидазою при додаванні до ферменту шести сульфогруп. Така модифікація ферменту дозволяє використовувати широке коло носіїв з різними фізичними властивостями. В якості носіїв використовувалися різноманітні аніоніти. Найкращі результати були отримані при модифікації високоочищеної галактозидази, іммобілізації її на ДЕАЕ-сефадексі. Активність фермента досягла 380-400 од./г носія. Успішно проведена ковалентна іммобілізація галактозидаз на силохромі С-80, обробленому різноманітними модифікаторами. Найкращі результати отримані при іммобілізації на неорганічному носії, модифікованому карбоксильними групами [5]. Застосування іммобілізованої галактозидази є перспективним за рахунок багатократного і довготривалого використання ферменту.

#### Висновки

Враховуючи дані відносно властивостей  $\beta$ -галактозидаз мікроорганізмів різних таксономічних груп, можна зробити висновок, що  $\beta$ -

галактозидази, виділені з мікроскопічних грибів, володіють більш широким діапазоном дії та високою стійкістю до змін фізико-хімічних властивостей навколишнього середовища, здатні витримувати довготривалі операції при виділенні, очищенні та іммобілізації на різноманітних носіях та являються більш перспективними об'єктами для промислового застосування, ніж бактеріальні та дріжджові.

#### Література

1. Антошина Л.П. Динамика активності лактази тонкої кишки у телят етапа новорожденности / Л.П.Антошина, Л.П.Тельцов // Вестник Ветеринарии. - 1998. - Т. 8, № 2. - С.36-40.
2. Безбородов А.М. Секреция ферментов у микроорганизмов / А.М. Безбородов, Н.И.Астапович. - М.: Наука, 1984. - 72 с.
3. Штамм *Penicillium canescens* 20171 - продуцент  $\beta$ -галактозидазы / Билай В.И., Школьный А.Т., Эланская И.А. [и др.] / А.с. №1065476 (СССР). Опубл. 07.01.84. Бюл. №1.
4. Валенкевич Л.Н. Молоко и синдром гиполактазии / Л.Н.Валенкевич, О.И.Яхонтова, М.Э.Шубина. - Петрозаводск, 1998. - 120 с.
5. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М.Грачева, А.Ю.Кривова. - [3-е изд., перераб. и доп.]. - М.: Элевар, 2000. - 512 с.
6. Диксон М. Ферменты. Т.1. / М.Диксон, Э. Уэбб. - М.: Мир, 1982. - 390 с.
7. Загустина Н.А. Очистка и свойства  $\beta$ -галактозидазы из гриба *Curvularia inaequalis* / Н.А.Загустина, А.С. Тихомирова / Биохимия. - 1976. - Т.41, № 6. - С. 1061-1066.
8. Корнеева О.С. Идентификация каталитически активных групп  $\beta$ -галактозидазы *Penicillium canescens* F-436 / О.С.Корнеева, Н.А.Жеребцов, И.В. Черемушкина // Биохимия - 2001. - Т.66, №3. - С. 412-418.
9. Корниенко Е.А. Лактазная недостаточность у детей раннего возраста / Е.А.Корниенко, Н.И. Митрофанова, Л.В. Ларченкова // Вопросы современной педиатрии. - 2006. - № 5 (4). - С. 82-86.
10.  $\beta$ -Галактозидаза низших эукариот (грибов и дрожжей). Обзор / А.К.Куликова, М.М.Гоматрели, А.К.Церетели [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. - 1989. - Т.25, № 6. - С. 734-746.
11. Сравнительное изучение некоторых кинетических параметров грибных  $\beta$ -галактозидаз / Н.М.Самойлова, Е.Ю.Лотменцева, В.Н.Борисова, Л.А. Нахапетян // Прикладная биохимия и микробиология. - 1985. - Т.11. - № 6. - С. 745-751.

12. Сухих О.А. Получение препарата грибной  $\beta$ -галактозидазы для коррекции лактозной недостаточности: дис. канд. биолог. наук: 03.00.23 / О.А. Сухих. - М., 2007. - 177 с.

13. Очистка внутриклеточной галактозидазы *Kluyveromyces fragilis* / А.К.Церетели, А.К.Куликова, А.С.Тихомирова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. - 1980. - Т. 15, №6. - С. 902-908.

14. Bardosa M.S. Production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown in cheese whey / M.S.Bardosa, D.O.Silva, A.R.Pinheiro [et al.]/J. Dairy Sci. - 1985. - Vol.68, №7. - P.1618-1623.

15. Dickson R.C. Purification and properties of an inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from the yeasts / R.C.Dickson, L.R.Dickson, J.S. Markin//Bacteriol. - 1979. - Vol. 137, №1. - P. 51-61.

16. Gargova S. Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* / S.Gargova, I.Pishtijski, I.Stoilova // Biotechnol. Equip. - 1995. - Vol.9. - P. 47-51.

17. Pollard H. Bacillus megaterium KM  $\beta$ -galactosidase: purification by affinity chromatography and characterization of the active species / H.Pollard, E.Steers//Arch. Biochem. Biophys. - 1973. - Vol. 158. - №2. - P. 650-661.

18. Stephens R.  $\beta$ -Galactosidase from *Neurospora crassa* / R.Stephens, S.G.DeBusk // Methods Enzymol. - 1975. - Vol.42. - P.497-503.

#### Резюме

**Кузьменко А.В., Дехтяренко Н.В., Дуган О.М.** Фермент  $\beta$ -галактозидаза: аналіз джерел одержання, властивостей, способів очистки. У статті наведені основні мікробні продуценти  $\beta$ -галактозидази, властивості ферменту та способи його виділення і очистки.

**Ключові слова:**  $\beta$ -галактозидаза, гіполактазія, продуценти, хроматографія.

#### Резюме

**Кузьменко А.В., Дехтяренко Н.В., Дуган А.М.** Фермент  $\beta$ -галактозидаза: аналіз источников получения, свойств, способов очистки.

В статье приведены основные микробные продуценты  $\beta$ -галактозидазы, свойства фермента и способы его выделения и очистки.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -галактозидаза, гиполактазия, продуценты, хроматография.

#### Summary

**Kuzmenko A.V., Dekhtyarenko N.V., Dugan O.M.** The enzyme  $\beta$ -galactosidase: analysis of sources of receipt, properties, methods of purification.

Basic microbial producers of  $\beta$ -galactosidase, properties of enzyme and methods of his selection and purification have resulted in the article.

**Key words:**  $\beta$ -galactosidase, hypolactasia, producers, chromatography.

**Рецензент: д.біол.н., проф. І.О.Іванюра**

## СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ БРОНХІТ У СПОЛУЧЕННІ З ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНІСТЮ

А.Л.Лоскутов

ДЗ "Луганський державний медичний університет"

### Вступ

Провідне місце у структурі хронічних захворювань органів дихання належить хронічному бронхіту (ХБ), який за даними різних авторів складає 70-80% [9,10]. По даним авторів, важливе значення в розвитку та підтриманні неспецифічного захворювання в бронхолегеневій системі належить імунному статусу.

У відповідь на впровадження бактеріальних та вірусних антигенів формується захисна реакція організму, яка припускає термінову мобілізацію всіх неспецифічних факторів протиінфекційного захисту з послідовним включенням специфічних форм захисту - розвитком запалення, імунної відповіді. Захисно-компенсаторні процеси з боку імунної і запальної реакції організму мають низку загальних ознак, які спрямовані на підтримку збереження імунного та генетичного гомеостазу організму шляхом знищення генетично чужинних еукаріотичних клітин, мікроорганізмів та продуктів їх життєдіяльності [7]. Сучасні уявлення про сутність патологічних процесів в організмі ґрунтуються на признанні провідної ролі ушкодження клітинних та субклітинних біомембран [6, 10]. Порушення бар'єрних властивостей (збільшення проникності, в'язкості, порушення цілісності ліпідного шару) клітинних мембран призводить до розвитку патологічного процесу [8]. Підвищення активності процесів вільнорадикального окислення у фізіологічних умовах розглядається як адаптаційна реакція організму на дію стресових чинників [7, 8]. В нормі рівновага процесів пероксидації ліпідів в організмі підтримується завдяки системі антиоксидантного захисту (АОЗ), до якого належить ряд ферментів - каталаза (КТ), яка запобігає акумуляції перекису водню, що утворюється при аеробному окисленні, та супероксиддисмутаза (СОД),