ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2533
https://elibrary.ru/SETXHC

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Биосинтез лактулозы с использованием ферментов лактозосбраживающих микромицет и бактерий

С. А. Рябцева*, М. А. Шпак, А. Д. Лодыгин, А. В. Серов, С. Н. Сазанова, М. В. Скороходова, В. Ю. Ромахова

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Поступила в редакцию: 14.03.2024
Принята после рецензирования: 16.04.2024
Принята к публикации: 07.05.2024

**С. А. Рябцева: ryabtseva07@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9803-8709*
М. А. Шпак: https://orcid.org/0000-0002-0119-9061
А. Д. Лодыгин: https://orcid.org/0000-0001-8460-2954
А. В. Серов: https://orcid.org/0000-0002-2581-556X
С. Н. Сазанова: https://orcid.org/0000-0002-8200-3007
М. В. Скороходова: https://orcid.org/0009-0009-9593-6074
В. Ю. Ромахова: https://orcid.org/0009-0000-1066-4394

© С. А. Рябцева, М. А. Шпак, А. Д. Лодыгин, А. В. Серов, С. Н. Сазанова, М. В. Скороходова, В. Ю. Ромахова, 2024

Аннотация.
Лактулоза относится к хорошо изученным пребиотикам и давно используется в медицине и пищевой промышленности. Альтернативой традиционным химическим способам является получение лактулозы с применением бета-галактозидаз. Целью работы было исследование процессов биосинтеза лактулозы с использованием неочищенных ферментных препаратов β-галактозидаз, полученных при раздельном и совместном культивировании лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий в пермеате молочной сыворотки.
В качестве продуцентов бета-галактозидаз использовали штаммы лактозосбраживающих дрожжей *Kluyveromyces lactis* ВКМ Y-1333 и Y-1339, *Kluyveromyces marxianus* ВКМ Y-459 и Y-1338, а также вязкие расы молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* БК-Углич-АВ и *Streptococcus thermophilus* БК-Углич-ТВ. Определение активности β-галактозидазы было основано на гидролизе о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида. Определение углеводного состава проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографией на хроматографе SHIMADZU LC-20 Prominence.
К общим закономерностям образования лактулозы при использовании ферментов исследованных дрожжей можно отнести быстрый рост ее концентрации в течение первых 30 мин реакции с последующим снижением или стабилизацией. Активность некоторых комбинированных неочищенных ферментных препаратов дрожжей и молочнокислых микроорганизмов существенно превышает активность бета-галактозидаз продуцентов после их раздельного культивирования. Закономерности образования лактулозы зависят как от штамма дрожжей, так и от вида молочнокислых бактерий. Самые высокие выходы лактулозы были получены при использовании комбинированных β-галактозидаз всех исследованных штаммов дрожжей с вязкими расами *S. thermophilus*.
Совместное культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий в некоторых сочетаниях позволило получить комбинированные неочищенные ферментные препараты с более высокой активностью и более высокие выходы лактулозы, чем отдельное культивирование дрожжей. Данные результаты могут быть использованы для получения очищенных ферментных препаратов β-галактозидаз и лактулозосодержащих продуктов из вторичного молочного сырья.

Ключевые слова. Лактулоза, лактоза, трансгликозилирование, β-галактозидазы, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства по теме: «Создание первого в России высокотехнологичного производства пребиотика лактулозы и функциональных молочных ингредиентов для импортозамещения в медицине, ветеринарии, детском питании, производстве лечебно-профилактических продуктов для людей и животных» (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации государственного научного учреждения и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства № 075-11-2022-021 от 07.04.2022 г.) в рамках Постановления Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 на базе ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет».

Для цитирования: Биосинтез лактулозы с использованием ферментов лактозосбраживающих микромицет и бактерий / С. А. Рябцева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 645–657. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2533

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2533
https://elibrary.ru/SETXHC

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Lactulose Biosynthesis with Enzymes of Lactose-Fermenting Micromycetes and Bacteria

Svetlana A. Ryabtseva*, Maria A. Shpack, Aleksei D. Lodygin, Alexander V. Serov, Serafima N. Sazanova, Marina V. Skorokhodova, Vera Yu. Romakhova

North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

Received: 14.03.2024
Revised: 16.04.2024
Accepted: 07.05.2024

**Svetlana A. Ryabtseva: ryabtseva07@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9803-8709*
Maria A. Shpack: https://orcid.org/0000-0002-0119-9061
Aleksei D. Lodygin: https://orcid.org/0000-0001-8460-2954
Alexandr V. Serov: https://orcid.org/0000-0002-2581-556X
Serafima N. Sazanova: https://orcid.org/0000-0002-8200-3007 Marina V. Skorokhodova: https://orcid.org/0009-0009-9593-6074
Vera Yu. Romakhova: https://orcid.org/0009-0000-1066-439

© S.A. Ryabtseva, M.A. Shpack, A.D. Lodygin, A.V. Serov, S.N. Sazanova, M.V. Skorokhodova, V.Yu. Romakhova, 2024

Abstract.
Lactulose is a well-studied prebiotic popular in medicine and the food industry. *β*-Galactosidases offer an alternative to traditional chemical methods of lactulose production. The article describes lactulose biosynthesis with crude enzyme preparations of *β*-galactosidases obtained by separate and joint cultivation of lactose-fermenting yeasts and lactic acid bacteria in whey permeate. The research featured the following producers of *β*-galactosidases: lactose-fermenting yeasts of *Kluyveromyces lactis* VKM Y-1333 and Y-1339, *Kluyveromyces marxianus* VKM Y-459 and Y-1338, and viscous strains of lactic acid bacteria of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilis*. The *β*-galactosidase activity was measured using the method of o-nitrophenyl-*β*-D-galactopyranoside hydrolysis. The method of high-performance liquid chromatography made it possible to reveal the carbohydrate composition.
The lactulose formation by yeast enzymes demonstrated the following pattern: its concentration increased rapidly during the first 30 min of reaction with subsequent decrease or stabilization. Some combined unpurified enzyme preparations of yeasts and lactic acid microorganisms were more active than *β*-galactosidases obtained by separate cultivation. The patterns of lactulose formation depended on both the yeast strain and the type of lactic acid bacteria. The highest yields of lactulose belonged to the samples that combined *β*-galactosidases of all yeast strains with *Streptococcus thermophilis*.
Co-cultivation of yeast and lactic acid bacteria in some combinations produced combined crude enzyme preparations with higher activity and greater lactulose yields than separate yeast cultivation. These results can help to obtain purified enzyme preparations of *β*-galactosidases and lactulose-containing products from secondary dairy raw materials.

Keywords. Lactulose, lactose, transglycosylation, *β*-galactosidases, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*

Funding. The research was supported by t he Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a comprehensive high-tech project of First Russian high-tech lactulose prebiotic and functional dairy ingredients for import substitution in medicine, veterinary practice, baby food, and medical preventive products for humans and animals (Agreement No. 075-11-2022-021, April 7, 2022, on federal budget subsidies for cooperation between state scientific institutions and the real sector of the economy in the sphere of high-tech production); Decree No. 218, April 9, 2010, of the Government of the Russian Federation to the North Caucasian Federal University.

For citation: Ryabtseva SA, Shpack MA, Lodygin AD, Serov AV, Sazanova SN, Skorokhodova MV, *et al.* Lactulose Biosynthesis with Enzymes of Lactose-Fermenting Micromycetes and Bacteria. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):645–657. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2533

Введение

Среди множества стратегий преобразования лактозы в продукты с добавленной стоимостью выделяется ее использование в качестве сырья для производства биологически активных соединений. Среди таких соединений особую ценность приобретают пребиотики, которые способны стимулировать рост полезной для здоровья микрофлоры. Благодаря этому они стали

важными компонентами функциональных пищевых продуктов. К активным и хорошо изученным пребиотикам относятся галактоолигосахариды и лактулоза (производные лактозы), которые могут быть получены из побочного молочного сырья. Это соответствует мировым тенденциям формирования устойчивой экономики замкнутого цикла [1].

Лактулоза – изомер лактозы – используется более 60 лет в медицине для лечения печеночной энцефалопатии и хронических запоров и обладает активными пребиотическими свойствами. Лактулозу рассматривают как многофункциональный пищевой ингредиент и применяют в молочной, кондитерской, хлебобулочной и других отраслях пищевой промышленности [2]. В нашей стране спрос на лактулозу пока удовлетворяют иностранные фирмы, поэтому задача организации ее отечественного производства остается актуальной [3].

Получение лактулозы в промышленных масштабах основано на LA-трансформации лактозы, которая катализируется щелочными реагентами. К недостаткам таких способов относится необходимость удаления побочных продуктов реакции и катализаторов, а также сложность выделения лактулозы из смеси углеводов [4, 5]. Альтернативой являются ферментативные способы синтеза лактулозы, которые считаются экологически чистыми и позволяют проводить процессы в более мягких условиях. Еще одно преимущество биотехнологии лактулозы – это возможность использования в качестве источников лактозы вторичного молочного сырья, в т. ч. пермеатов молочной сыворотки [5, 6]. Все это соответствует современным требованиям к экологически безопасным технологиям и натуральным продуктам [7, 8].

Для биоконверсии лактозы в лактулозу существует два основных пути: прямой и с промежуточным гидролизом. Для первого необходима изомераза, которая бы трансформировала глюкозный остаток лактозы во фруктозный, но такой фермент пока не найден. Подобную реакцию могут катализировать целлюлозо-2-эпимеразы некоторых микроорганизмов, безопасность которых пока не подтверждена. Второй путь предполагает применение класса гидролаз, которые сначала расщепляют лактозу до галактозы и глюкозы, а затем могут присоединять галактозный остаток к фруктозе (т. е. проводить трансгалактозилирование). Такими свойствами обладают β-галактозидазы, в т. ч. имеющие международный статус безопасности, промышленное производство которых организовано в значительных объемах [5, 6, 8]. В связи с этим второй путь ферментативного синтеза лактулозы привлекает внимание ученых уже более 20 лет и сохраняет свою актуальность [9].

Проведенный ранее анализ литературы показал, что микромицеты (дрожжи рода *Kluyveromyces* и плесени рода *Aspergillus*) относятся к основным продуцентам β-галактозидаз для получения лактулозы. При этом результаты реакции существенно отличаются при использовании разных ферментов и условий ее проведения. Максимальный выход лактулозы в случае применения β-галактозидаз *Kluyveromyces lactis* варьировал в диапазоне от 4 до 28 %, *Aspergillus oryzae* – от 1,7 до 60 % [9]. Именно лактозосбраживающие аскомицеты *K. lactis*, как наиболее безопасные продуценты, обычно используют для промышленного производства лактаз пищевого назначения [10]. Анализ литературы показал, что дрожжевые β-галактозидазы позволяют проводить биосинтез лактулозы при более низких значениях соотношения молярных концентраций фруктозы и лактозы, чем ферменты из плесеней. Это более выгодно с экономической точки зрения, т. к. добавление фруктозы приводит к повышению стоимости затрат на сырье и процессы выделения лактулозы из реакционной смеси. Для снижения себестоимости производства лактулозы целесообразно также использовать в качестве источника лактозы побочное молочное сырье, в т. ч. пермеат молочной сыворотки, а также неочищенные ферментные препараты [9].

Данные об условиях процессов, при которых были получены максимальные концентрации лактулозы, в литературе широко варьируются и не всегда совпадают с оптимальными для данного вида ферментов. Например, биосинтез лактулозы с β-галактозидазами *K. lactis* (оптимум pH 7,0, температуры 50 °C) проводили в диапазоне pH от 6,0 до 7,5 при температурах от 6 до 60 °C, время реакции составляло от нескольких минут до нескольких суток [10]. В большинстве случаев использовали дорогостоящие ферменты зарубежного производства [9].

Учитывая необходимость обеспечения технологического суверенитета, можно считать актуальным исследование процессов получения β-галактозидаз отечественных коллекционных культур-продуцентов и их применения для биосинтеза лактулозы и других пребиотиков в рамках единого технологического цикла. Всероссийская коллекция микроорганизмов насчитывает большое количество штаммов лактозосбраживающих дрожжей, которые всесторонне, в т. ч. на генетическом уровне, изучены учеными [11, 12]. Обнаружено, что некоторые штаммы *Kluyveromyces marxianus* превосходили *K. lactis* по скорости ферментации растворов лактозы [13]. Также подтверждено, что межштаммовая гибридизация дрожжей является перспективным методом повышения активности ферментов [13].

К лактозосбраживающим микроорганизмам относятся не только дрожжи, но и молочнокислые бактерии. Поэтому выделение и применение их β-галактозидаз, в т. ч. для получения галактоолигосахаридов и лактулозы, привлекает внимание исследователей разных стран [14–17]. Данные бактерии могут вырабатывать метаболиты, стимулирующие или подавляющие рост дрожжей [18]. Совместное культивирование продуцентов разных по свойствам β-галактозидаз может повлиять как на гидролитическую, так и на трансгликозилирующую активность этих ферментов. Зарубежные

исследователи показали, что применение некоторых сочетаний коммерческих β-галактозидаз привело к существенному увеличению выхода галактоолигосахаридов, которые также являются продуктами трансгликозилирования лактозы [19].

Целью работы являлось исследование процессов биосинтеза лактулозы с использованием неочищенных ферментных препаратов β-галактозидаз, полученных при раздельном и совместном культивировании лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий в пермеате молочной сыворотки.

Объекты и методы исследования

В качестве продуцентов бета-галактозидаз использовали штаммы лактозосбраживающих дрожжей *Kluyveromyces lactis* ВКМ Y-1333 и Y-1339, *Kluyveromyces marxianus* ВКМ Y-459 и Y-1338 (Всероссийская коллекция микроорганизмов, «Пущинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук», г. Пущино), а также молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus* (концентрат вязких рас ацидофильной палочки БК-Углич-АВ, оптимальная температура 37–38 °С) и *Streptococcus thermophilus* (концентрат вязких рас термофильного стрептококка БК-Углич-ТВ, оптимальная температура 40–45 °С) производства «Экспериментальная биофабрика» Россельхозакадемии, г. Углич. Для получения среды культивирования продуцентов и в качестве источника лактозы для биосинтеза лактулозы использовали сывороточный продукт сухой (пермеат), (Молочный комбинат «Воронежский», филиал «Калачеевский сырзавод») с массовой долей влаги 1,38 %, белка 3,44 %, золы 4,1 %, pH восстановленного продукта 6,5.

Объектами исследования выступали неочищенные ферментные препараты (в виде культуральной жидкости, содержащей β-галактозидазы, полученные из дрожжей или дрожжей и молочнокислых бактерий, а также ферментированные полученными неочищенными ферментными препаратами, растворы лактозы (источник – пермеат) и фруктозы (D (-) (производитель TATELYLE PLC (Великобритания), содержание основного вещества не менее 98 %).

Для получения неочищенных ферментных препаратов дрожжей сначала проводили их культивирование для накопления биомассы. Дрожжи активизировали путем пересева из коллекционных культур на плотную питательную среду Сабуро (Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, г. Углич, скошенный агар) и инкубации в течение 24 ч при оптимальной температуре 30 °С, после чего готовили суспензию клеток в фосфатном буфере с оптической плотностью D_{460} = 0,15 ± 0,02, которая соответствовала концентрации клеток дрожжей lg N = 5,4 ± 0,2. Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр UNICO 2800 UV/VIS (UNITED PRODUCTS AND INSTRUMENTS, США). Для перемешивания суспензии использовали встряхиватель медицинский вибрационный Vortex V – 3 (SIA «ELMI», Латвия). 1 см^3 полученной суспензии вносили в коническую колбу со 150 см^3 стерилизованного восстановленного УФ-пермеата с массовой долей сухих веществ 6,5 %, тщательно перемешивали и инкубировали в условиях аэрации в шейкер-инкубаторе ES 20/60 (SIA Biosan, Латвия) при температуре 30 °С и перемешивании 100 об/мин в течение 24 ч для накопления биомассы.

После этого проводили культивирование дрожжей в анаэробных условиях в инкубаторе с углекислой средой SANYO MCO-20AIC (AWTech, Япония) при температуре 30 °С, концентрации CO_2 6 % в течение 24 ч для дополнительного накопления их биомассы и продуктов метаболизма, в т. ч. этилового спирта, который способствует пермеабилизации клеток и выделению ферментов. Далее полученные образцы подвергали тепловой обработке при 50 °С в течение 24 ч для разрушения клеток продуцентов бета-галактозидаз путем термоавтолиза и получения неочищенных ферментных препаратов. Определяли гидролитическую активность полученных неочищенных ферментных препаратов β-галактозидаз (описание ниже).

Отличием экспериментов с использованием молочнокислых бактерий были дополнительные операции их активизации и их отдельного культивирования. Активизацию проводили в обезжиренном молоке в течение 24 ч при оптимальной температуре (37–38 °С для *L. acidophilus* и 40–45 °С для *S. thermophilus*), после чего 5 % полученной закваски вносили в стерилизованный восстановленный пермеат, тщательно перемешивали и инкубировали при оптимальной температуре в течение 24 ч для накопления биомассы. Параллельно дрожжи активизировали и культивировали в течение 24 ч аналогично вышеописанному. Затем проводили совместное культивирование, для чего ферментированный дрожжами пермеат смешивали в соотношении 1:1 с пермеатом, ферментированным молочнокислыми микроорганизмами, полученную смесь инкубировали в анаэробных условиях при вышеописанных режимах для дополнительного накопления их биомассы и продуктов метаболизма (спирта и молочной кислоты соответственно). Далее проводили термоавтолиз при вышеописанных режимах и определяли активность полученных неочищенных ферментных препаратов.

Затем проводили биосинтез лактулозы, для чего 5 см^3 каждого образца неочищенных ферментных препаратов смешивали с 5 см^3 субстрата, в качестве которого использовали водный 18 % (вес/объем) раствор лактозы и фруктозы с молярным соотношением 1:2 при pH = 6,8 ± 0,2. Полученные смеси термостатировали при 40 °С в течение 30 мин, 1 ч и 3 ч, после чего выдерживали 5 мин в кипящей водяной бане для инактивации фермента, охлаждали до 20 ± 22 °С и замораживали. Полученные образцы анализировали на углеводный состав методом высокоэффективной жидкостной хроматографией (описание ниже).

Определение активности β-галактозидаз неочищенных ферментных препаратов проводили в соответствии с методикой, основанной на измерении интенсивности окраски о-нитрофенола, образующегося при гидролизе β-галактозидазой синтетического субстрата о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида [20]. К 50 мкл раствора β-галактозидазы (суспензии с клетками после термоавтолиза) добавляли 2 см^3 1,25 мМ раствора ONPG в буфере (50 мМ KH_2PO_4, pH 6,6–6,8), смесь инкубировали при температуре 37 °С в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,5 см^3 1М раствора Na_2CO_3. Образующийся в ходе реакции о-нитрофенол имеет желтый цвет. Измерение оптической плотности полученной пробы проводили при длине волны 420 нм. Активность β-галактозидазы (А) рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D \times V}{\varepsilon \times t \times V_{пр}} \quad (1)$$

где D – оптическая плотность раствора при 420 нм; ε – коэффициент молекулярной экстинкции о-нитрофенола, л/ммоль·см (ε = 4,5); t – время инкубации, мин; V – объем реакционной смеси, см^3; $V_{пр}$ – объем ферментного препарата, см^3.

Определение углеводного состава проводили методом высокоэффективной жидкостной хромотографией на жидкостном хроматографе SHIMADZU LC-20 Prominence (SHIMADZU, Япония), снабженным рефрактометрическим детектором RID-20A, использовали колонку CarboSep 87C 300*7,8 mm. В качестве подвижной фазы применяли деионизованную воду, условия хроматографии: скорость потока 0,6 см^3/мин, температура 85 °С. В анализируемых образцах осаждали жир и белок с использованием реагентов Каррез I и Каррез II, смесь выдерживали в течение 15 мин при комнатной температуре, затем отделяли осадок при центрифугировании в течение 15 мин при 8000 об/мин. Заключительное фильтрование проводили с помощью шприцевых фильтров (производство ALWSCI, диаметр 25 мм, гидрофильные PTFE, диаметр пор 0,22 мкм). Образцы были разбавлены деионизованной водой в 2 раза.

Для построения калибровочного графика использовали аналитические стандарты углеводов (лактоза – CAS № 63-42-3, лактулоза – CAS № 4618-18-2, глюкоза – CAS № 50-99-7, галактоза – CAS № 59-23-4, фруктоза – CAS № 17598-81-1, тагатоза – CAS № 87-81-0) с содержанием чистых веществ 99,9 % производства Sigma-ALDRICH. Для прослеживания линейной зависимости были приготовлены калибровочные растворы с концентрацией от 100 мг/л до 10 г/л. Приготовление всех реактивов, стандартов, проб производилось с использованием деионизованной воды 18,2 MΩ*см, полученной с использованием прибора для получения особо чистой воды Hydrolab HLP 5UV. Полученные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения SHIMADZU Lab Solutions, release 5.73. Согласно паспортным данным и результатам исследований, порядок элюирования индивидуальных компонентов: лактоза, лактулоза, глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза, тагатоза.

Выход лактулозы ($B_{лл}$, %) рассчитывали по формуле:

$$B_{лл} = \frac{C_{лл}}{C_{л0}} \times 100 \quad (2)$$

где $C_{лл}$ – концентрация лактулозы, мг/л; $C_{л0}$ – исходная концентрация лактозы, мг/л.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы было проведено исследование процессов биосинтеза лактулозы с использованием неочищенных ферментных препаратов β-галактозидаз дрожжей. Результаты определения активности неочищенных ферментных препаратов и углеводного состава образцов после биосинтеза лактулозы с использованием неочищенных ферментных препаратов штаммов вида *Kluyveromyces marxianus* представлены на рисунке 1, *Kluyveromyces lactis* – на рисунке 2.

Анализ результатов показал, что к общим закономерностям образования лактулозы при использовании ферментов разных видов и штаммов дрожжей можно отнести быстрый рост ее концентрации в течение первых минут реакции. Результаты этого этапа процесса существенно отличалась для разных штаммов: минимальный выход лактулозы в субстрате через 3 мин ферментации (0,7 %) был получен в опытах с *K. marxianus* Y-1338, максимальный в 2,1 раза выше – с *K. lactis* Y-1339. Высокая скорость биосинтеза лактулозы на первых этапах реакции с последующим ее снижением была отмечена и в других работах, в т. ч. с применением очищенных ферментных препаратов [21–25].

В дальнейшем концентрация лактулозы изменялась по-разному. В опытах с *K. marxianus* Y-459 она продолжала расти, достигнув максимума (1,5 %) через 30 мин. После этого наблюдали снижение концентрации лактулозы, сначала быстрое (почти в 1,5 раза через 30 мин), затем медленное в последующие 2 ч. При использовании фермента из *K. marxianus* Y-1338 концентрация лактулозы медленно увеличивалась на протяжении всего опыта, но максимальное значение ее выхода через 3 ч ферментации не превышало 1 % и было сопоставимо с результатами, полученными к этому времени в опытах с *K. marxianus* Y-459. В случае применения *K. lactis* Y-1333 концентрация лактулозы продолжала увеличиваться в течение 60 мин, достигнув максимальных значений выхода 1,3 %, после чего снизилась почти в 2 раза за 2 ч. Другие закономерности изменения концентрации лактулозы установлены в опытах с *K. lactis* Y-1339: после достижения максимума в первые минуты реакции наблюдали ее незначительное снижение через 1 ч и дальнейшую стабилизацию выхода на уровне 1,4 % до конца опыта.

Данные экспериментов близки к результатам работы, проведенной с пермеабилизованными клетками

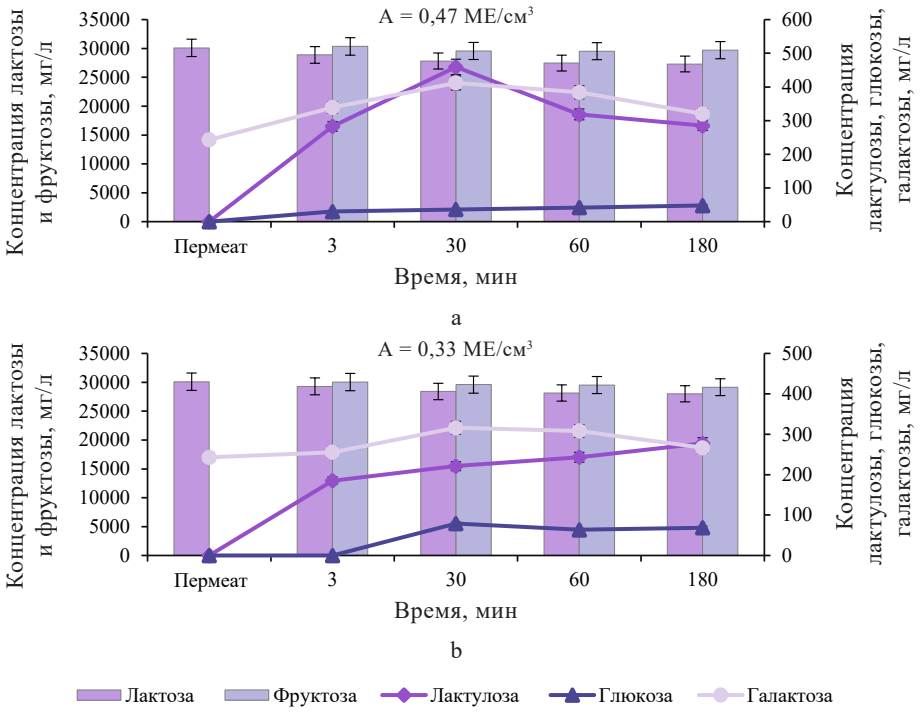

Рисунок 1. Влияние времени ферментации на углеводный состав образцов с использованием штаммов *Kluyveromyces marxianus*: a – *Kluyveromyces marxianus* Y-459; b – *Kluyveromyces marxianus* Y-1338; A – активность бета-галактозидаз

Figure 1. Effect of fermentation time on carbohydrate composition with *Kluyveromyces marxianus*: a – *Kluyveromyces marxianus* Y-459; b – *Kluyveromyces marxianus* Y-1338; A – *β*-galactosidase activity

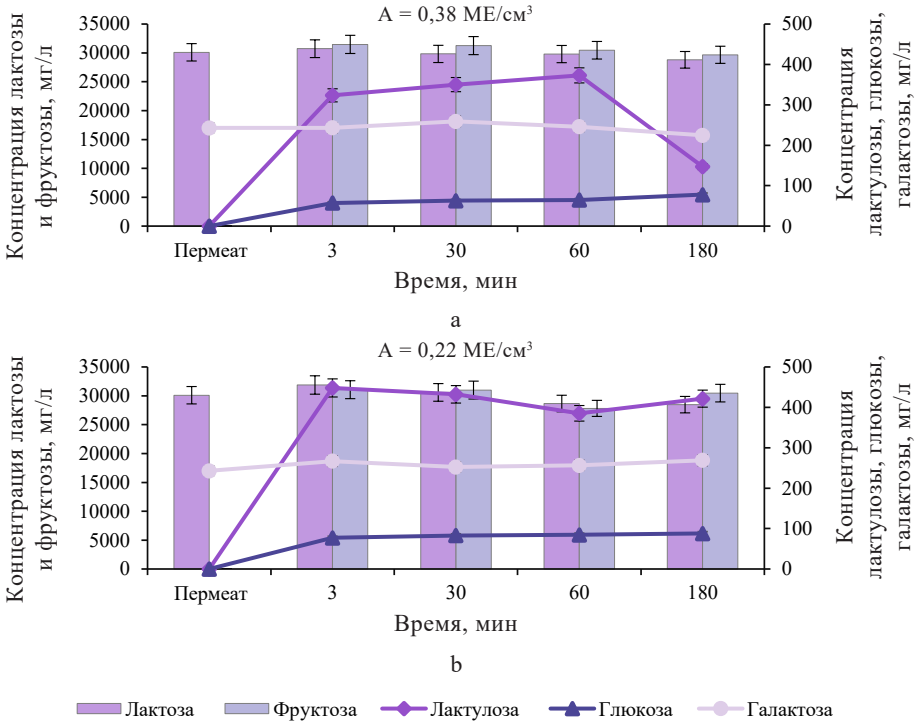

Рисунок 2. Влияние времени ферментации на углеводный состав образцов с использованием штаммов *Kluyveromyces lactis*: a – *Kluyveromyces lactis* Y-1333; b – *Kluyveromyces lactis* Y-1339; A – активность бета-галактозидаз

Figure 2. Effect of fermentation time on carbohydrate composition with *Kluyveromyces lactis* (a – *Kluyveromyces lactis* Y-1333; b – *Kluyveromyces lactis* Y-1339; A – *β*-galactosidase activity)

K. lactis в близких условиях (при 40 °C, pH 7, молярном соотношении фруктозы к лактозе 2:1) [26]. Продуктивность по лактулозе составила 0,18–2 г/л·ч в зависимости от концентрации и обработки клеток дрожжей и времени (расчетные значения аналогичного показателя в опытах *K. marxianus* Y-459 составили 0,3–1 г/л·ч). Сопоставление с результатами других работ, в которых были получены более высокие выходы лактулозы [21–25], затруднено, т. к. при этом использовали другие условия проведения реакции, включая применение более высоких молярных соотношений концентраций фруктозы и лактозы, очищенных бетагалактозидаз, и/или иммобилизацию ферментов.

Полученные результаты соответствуют литературным данным о том, что процессы биосинтеза лактулозы являются сложными, они могут сопровождаться другими ферментативными реакциями и образованием разных углеводов [9]. Реакция трансгликозилирования включает 3 стадии: образование комплекса β-галактозидазы с лактозой; образование галактозильного комплекса с ферментом с высвобождением глюкозы; перенос галактозы к нуклеофильному акцептору, содержащему гидроксильную группу. Таким акцептором может быть вода, тогда галактоза выделяется в свободном виде. Если роль акцептора играет фруктоза, продуктом реакции становится лактулоза. Реакции, в которых ферменты класса гидролаз выполняют функцию псевдотрансфераз, считаются кинетически контролируемыми. Для них характерны кратковременные максимальные выходы, зависящие от соотношения скоростей синтеза и гидролиза. В этом случае главным фактором, определяющим результат процесса, является происхождение фермента, влияющее на его структуру и свойства [8, 27].

Данные о снижении концентрации лактулозы после достижения максимума соответствуют известным положениям о том, что она может подвергаться гидролизу или трансгликозилированию с образованием фруктогалактоолигосахаридов. Лактоза тоже может быть акцептором для галактозила с образованием галактоолигосахаридов [1, 7]. Возможность протекания таких реакций подтверждается данными высокоэффективной жидкостной хромотографией – анализа полученных образцов, в частности, наличием на хроматограммах заметного пика (перед пиком лактозы) со временем удержания около 7 мин, который могут давать трисахара. Эти процессы требуют дополнительных исследований, в т. ч. с более высокими концентрациями лактозы.

Сопоставление данных об активности ферментов дрожжей и синтезе лактулозы показало, что между этими выходными параметрами есть взаимосвязь. Ряд штаммов дрожжей по убыванию значений активности полученных из них бета-галактозидаз выглядит так: *K. marxianus* Y-459 > *K. lactis* Y-1333 > *K. marxianus* Y-1338 > *K. lactis* Y-1339. Ряд штаммов дрожжей по выходу лактулозы, полученной с использованием выделенных из них ферментов (*K. marxianus* Y-459 > *K. lactis* Y-1339 > *K. marxianus* Y-1333 > *K. lactis* Y-1338), имеет похожую последовательность. Исключением стал штамм *K. lactis* Y-1339, который дал неочищенные ферментные препараты с минимальной активностью, но второй результат по концентрации лактулозы.

Второй этап работы был посвящен исследованию процессов биосинтеза лактулозы с использованием комбинированных неочищенных ферментных препаратов β-галактозидаз дрожжей и молочнокислых бактерий. Результаты определения углеводного состава образцов после биосинтеза лактулозы с использованием комбинированных неочищенных ферментных препаратов, полученных после совместного культивирования дрожжей с молочнокислыми бактериями, представлены в таблице 1. Для сравнения результатов биосинтеза данные расчета выхода лактулозы с использованием ферментов дрожжей *K. marxianus* и молочнокислых бактерий при раздельном и совместном культивировании были обобщены и показаны на рисунке 3, с *K. lactis* – на рисунке 4.

Анализ графиков на рисунке 3а показал, что синтез лактулозы с использованием ферментов, полученных при раздельном культивировании *K. marxianus* Y-459, протекает даже лучше, чем при совместном их культивировании с вязкой ацидофильной палочкой: максимальный выход лактулозы в ферментированном субстрате был получен через 30 мин реакции и составил 1,5 и 0,8 % соответственно. По-другому проходил синтез лактулозы в случае применения комбинированного неочищенного ферментного препарата, полученного при совместном культивировании *K. marxianus* Y-459 с вязким термофильным стрептококком. Максимальный выход лактулозы в ферментированном субстрате был получен через 60 мин реакции и достигал уровня 3,3 %, т. е. более чем в два раза выше, чем с другими ферментами. Активность β-галактозидаз, полученных при совместном культивировании *K. marxianus* Y-459 и *L. acidophilus* B, была в 1,7 раз выше, чем активность β-галактозидазы самих дрожжей, а при совместном культивировании *K. marxianus* Y-459 и *S. thermophilus* B – выше только в 1,4 раза.

С другим штаммом этого же вида дрожжей, *K. marxianus* Y-1338, были выявлены другие закономерности биосинтеза лактулозы (рис. 3b). При совместном его культивировании с вязкой ацидофильной палочкой были выделены β-галактозидазы, позволившие получить максимальный выход лактулозы на уровне около 2 % через 3 ч реакции, что почти в 2 раза выше, чем этот показатель для фермента самих дрожжей, полученный в тех же условиях. В случае применения комбинированных ферментов *K. marxianus* Y-1338 и *S. thermophilus* B был получен еще более высокий выход лактулозы – 2,7 % через 30 мин реакции (с незначительным снижением этого показателя к концу опыта). В то же время активность β-галактозидаз, полученных при совместном культивировании *K. marxianus* Y-1338 и *L. acidophilus* B, была в 2,6 раз выше, чем

активность β-галактозидазы самих дрожжей, а при совместном культивировании *K. marxianus* Y1338 и *S. thermophilus* B – выше только в 1,2 раза.

Анализ графиков на рисунке 4а показал, что процесс синтеза лактулозы с использованием ферментов *K. lactis* Y-1333, полученных при его раздельном и совместном культивировании с вязкой ацидофильной палочкой, протекал примерно одинаково, и выход лактулозы был низким (не превышал 1,5 %). В случае применения комбинированного неочищенного ферментного препарата, полученного при совместном культивировании *K. lactis* Y-1333 с вязким термофильным

Таблица 1. Влияние времени ферментации на углеводный состав образцов с использованием комбинированных ферментов (средние по трем повторностям, $p \leq 0{,}05$; А – активность бета-галактозидаз)

Table 1. Effect of fermentation time on carbohydrate composition of samples with combined enzymes (mean of three replicates, $p \leq 0.05$; A – β-galactosidase activity)

Время ферментации, мин	Концентрация углеводов, мг/л					
	лактоза	лактулоза	глюкоза	галактоза	фруктоза	тагатоза
Kluyveromyces marxianus Y-459 + *Lactobacillus acidophilus* B (A = 0,78 МЕ/см^3)						
3	58733	268,39	58,192	253,59	52175	204,59
30	57862	384,31	68,354	238,83	51836	257,05
60	55988	307,50	79,112	255,07	49600	262,10
180	54451	332,78	81,319	244,41	47859	243,82
Kluyveromyces marxianus Y-1338 + *Lactobacillus acidophilus* B (A = 0,86 МЕ/см^3)						
3	52575	364,56	72,877	272,07	52137	123,95
30	52200	528,10	94,494	277,52	51858	97,005
60	51870	827,67	96,892	292,12	51130	143,94
180	50946	970,40	96,765	280,01	50603	207,78
Kluyveromyces lactis Y-1333 + *Lactobacillus acidophilus* B (A = 0,81 МЕ/см^3)						
3	55019	494,66	133,82	297,43	51988	н/о
30	54497	411,20	196,11	320,32	51765	н/о
60	53372	450,73	138,55	290,08	50133	н/о
180	53256	486,03	181,65	300,31	51820	н/о
Kluyveromyces lactis Y-1339 + *Lactobacillus acidophilus* B (A = 0,59 МЕ/см^3)						
3	54811	746,25	399,86	362,45	51895	51,480
30	54612	788,21	400,93	446,41	51697	52,014
60	54349	561,23	396,76	361,10	49860	18,184
180	53436	564,69	320,39	380,95	50212	26,373
Kluyveromyces marxianus Y-459 + Streptococcus thermophilus B (*A* = 0,65 *МЕ/см*3)						
3	49378	1308,04	29,697	453,86	48428	н/о
30	47970	1539,09	26,838	483,04	47993	н/о
60	47608	1640,49	26,450	484,67	46604	н/о
180	45473	332,78	23,505	421,90	47533	н/о
Kluyveromyces marxianus Y-1338 + *Streptococcus thermophilus* B (A = 0,38 МЕ/см^3)						
3	59916	576,46	408,02	1320,26	49076	н/о
30	55496	1343,36	462,52	531,68	45772	н/о
60	54090	1077,23	458,45	1452,79	43252	н/о
180	53673	1253,35	462,47	525,983	44656	н/о
Kluyveromyces lactis Y-1333 + *Streptococcus thermophilus* B (A = 0,72 МЕ/см^3)						
3	57828	1211,07	95,116	715,62	46224	н/о
30	56313	1872,15	151,069	481,13	42620	н/о
60	52616	1836,19	160,282	453,03	41252	н/о
180	52133	1466,95	508,10	1296,60	42130	н/о
Kluyveromyces lactis Y-1339 + *Streptococcus thermophilus* B (A = 0,39 МЕ/см^3)						
3	57103	793,05	60,751	716,54	46459	н/о
30	57012	1708,9	87,356	1202,55	45530	н/о
60	54915	1659,2	271,34	805,49	41635	н/о
180	57963	1367,3	576,20	1314,22	41061	н/о

Примечание: н/о – не обнаружено.

Note: н/о – not detected.

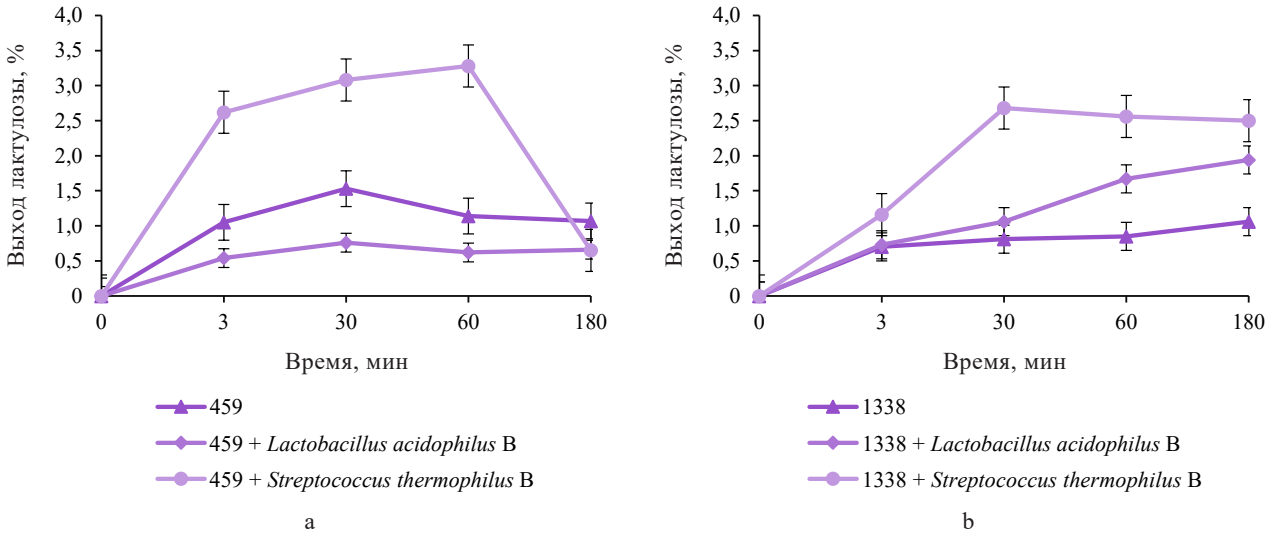

Рисунок 3. Влияние времени ферментации на биосинтез лактулозы с использованием ферментов дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-459 (a) и *Kluyveromyces marxianus* Y-1338 (b) при раздельном и совместном культивировании с вязкими штаммами молочнокислых бактерий

Figure 3. Effect of fermentation time on lactulose biosynthesis with enzymes of *Kluyveromyces marxianus* Y-459 (a) and *Kluyveromyces marxianus* Y-1338 (b) in separate and combined cultivation with lactic acid bacteria

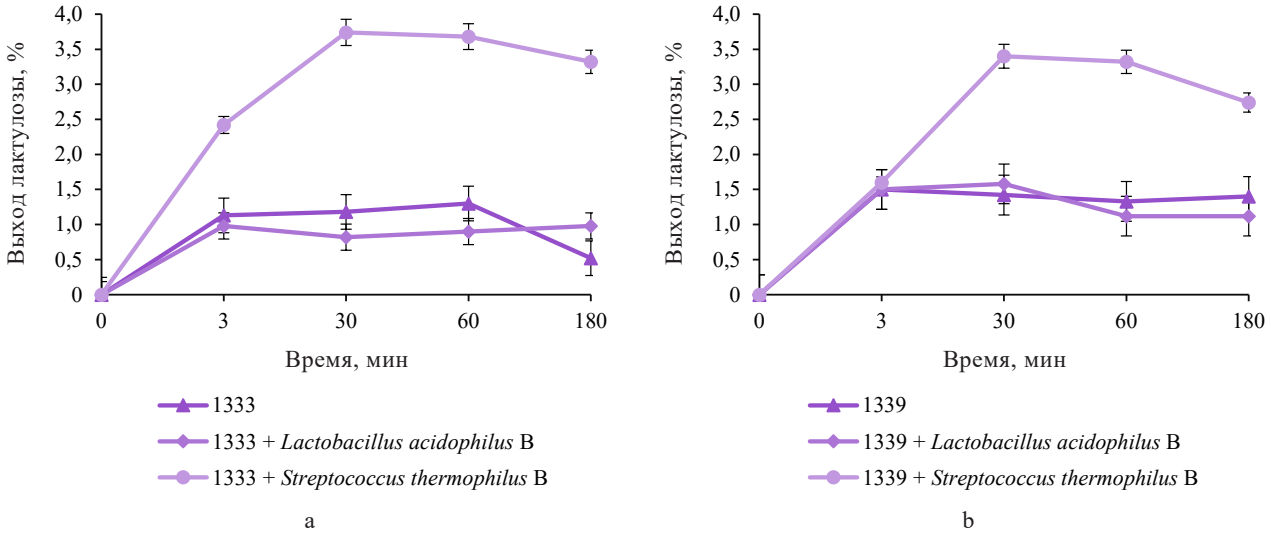

Рисунок 4. Влияние времени ферментации на биосинтез лактулозы с использованием ферментов дрожжей *Kluyveromyces lactis* Y-1333 (a) и *Kluyveromyces lactis* Y-1339 (b) при раздельном и совместном культивировании с вязкими штаммами молочнокислых бактерий

Figure 4. Effect of fermentation time on lactulose biosynthesis with enzymes of *Kluyveromyces lactis* Y-1333 (a) and *Kluyveromyces lactis* Y-1339 (b) in separate and combined cultivation with lactic acid bacteria

стрептококком, максимальный выход лактулозы был получен через 30–60 мин реакции и достигал уровня 3,7 %, т. е. более чем в 2,6 раза выше, чем с другими ферментами в этой серии опытов. При этом активность β-галактозидаз, полученных при совместном культивировании *K. lactis* Y-1333 и *L. acidophilus* B, была в 2,1 раз выше, чем активность β-галактозидазы дрожжей, а при совместном культивировании *K. lactis* Y-1333 и *S. thermophilus* B – выше в 1,9 раза.

С ферментами другого штамма этого же вида дрожжей, *K. lactis* Y-1339, биосинтез лактулозы проходил похожим образом (рис. 4b). Отличием было получение более высоких концентраций лактулозы в первые 30 мин реакции с β-галактозидазами *K. lactis* Y-1339

и после совместного культивирования с *L. acidophilus* B, однако в дальнейшем выход лактулозы не увеличивался. В случае применения комбинированных ферментов *K. lactis* Y-1339 и *S. thermophilus* B максимальный выход лактулозы был получен на уровне 3,5 % через 30 мин реакции, что в 2,3 раза выше, чем в опытах с ферментом дрожжей *K. lactis* Y-1339. В то же время активность *β*-галактозидаз, полученных при совместном культивировании *K. lactis* Y-1339 и *L. acidophilus* B, была в 2,7 раз выше, чем активность *β*-галактозидазы самих дрожжей, а при совместном культивировании *K. lactis* Y-1339 и *S. thermophilus* B – выше только в 1,7 раза.

В целом можно сказать, что закономерности образования лактулозы под влиянием комбинированных неочищенных ферментных препаратов были похожи на ранее установленные для ферментов из дрожжей и больше зависят от штамма, чем от вида дрожжей. Максимальный выход лактулозы был достигнут в большинстве случаев в первые 3–30 мин реакции и варьировался от 0,5 до 3,7 %, после чего снижался или стабилизировался. Самые высокие выходы лактулозы были получены в экспериментах с совместным культивированием дрожжей и *S. thermophilus* B.

Для сравнения значений активности, комбинированных *β*-галактозидаз и максимальных концентраций лактулозы также были построены ряды штаммов дрожжей по убыванию значений:

– активности полученных из них бета-галактозидаз: *K. marxianus* Y-1338 + *L. acidophilus* B > *K. lactis* Y-1333 + *L. acidophilus* B > *K. marxianus* Y-459 + *L. acidophilus* B > *K. marxianus* Y-459 + *S. thermophilus* B > K. lactis Y-1333 + *S. thermophilus* B > *K. lactis* Y-1339 + *L. acidophilus* B > *K. lactis* Y-1339 + *S. thermophilus* B > *K. marxianus* Y-1338 + *S. thermophilus* B;

– максимальной концентрации лактулозы, полученной с использованием выделенных из них ферментов:

K. lactis Y-1333 + *S. thermophilus* B > *K. lactis* Y-1339 + *S. thermophilus* B > *K. marxianus* Y-459 + *S. thermophilus* B > *K. marxianus* Y-1338 + *S. thermophilus* B > *K. marxianus* Y-1338 + *L. acidophilus* B > *K. lactis* Y-1339 + *L. acidophilus* B > *K. lactis* Y-1333 + *L. acidophilus* B > *K. marxianus* Y-459 + *L. acidophilus* B.

Анализ полученных данных показал, что ряд сочетаний культур с максимальной гидролитической активностью фермента не совпадает полностью с рядом сочетаний культур, давших неочищенные ферментные препараты с максимальным выходом лактулозы, т. е. с максимальной трансгликозилирующей активностью. Если три первых места по гидролитической активности занимают сочетания дрожжей с *L. acidophilus* B (выделено жирным шрифтом), то три первых места по концентрации лактулозы принадлежат сочетаниям дрожжей с *S. thermophilus* B. Дрожжи *K. marxianus* Y-459 и *K. lactis* Y-1333 дали высокую активность фермента в сочетании и с *L. acidophilus* B, и с *S. thermophilus* B, причем сочетание *K. lactis* Y-1333 + *S. thermophilus* B стало первым в ряду максимальных концентраций лактулозы. Дрожжи *K. lactis* Y-1338 в сочетании с *L. acidophilus* B дали ферменты с самой высокой гидролитической активностью и в сочетании с обеими культурами вязких молочнокислых бактерий попали в пятерку лучших по биосинтезу лактулозы. Тот факт, что три сочетания культур (подчеркнуты) в обоих рядах входят в число первых пяти, указывает на тесную взаимосвязь гидролитической и трансгликозилирующей активности ферментов, однако прямой зависимости между ними не установлено.

Следует отметить, что штамм *K. lactis* Y-1339 показывал низкую скорость роста на пермеате и относительно низкую гидролитическую активность ферментов как в чистых культурах, так и в сочетаниях с молочнокислыми бактериями. Сочетание *K. lactis* Y-1339 + *S. thermophilus* B стало вторым в ряду максимальных концентраций лактулозы, а сочетание *K. lactis* Y-1339 + *L. acidophilus* B дало 6 результат в этом ряду. Это свидетельствует о довольно высокой трансгликозилирующей активности комбинированных ферментов, полученных с использованием этого штамма дрожжей.

Представляют интерес данные о синтезе тагатозы, существенные концентрации которой были получены в опытах с тремя штаммами дрожжей (*K. marxianus* Y-459, *K. marxianus* Y-1338 и *K. lactis* Y-1339) и *L. acidophilus* B, но не обнаружены ни в одном эксперименте с раздельным культивированием дрожжей и совместным культивированием дрожжей с *S. thermophilus*. Тагатоза может применяться как низкокалорийный заменитель сахарозы в различных пищевых продуктах, в т. ч. для людей с диабетом, ожирением, анемией и гемофилией [1]. В результате биосинтеза были также получены неидентифицированные олигосахариды со временем выхода пиков раньше лактозы (7,4–7,7 мин), причем их концентрация была выше в опытах со всеми дрожжами и *L. acidophilus* B, чем с *S. thermophilus* B (типичные хроматограммы показаны на рис. 5). Согласно результатам ряда исследований, это могут быть галактоолигосахариды, обладающие активными пребиотическими свойствами [1, 7].

Одной из причин повышения активности комбинированных ферментов по сравнению с ферментами дрожжей может быть интенсификация разрушения и пермеабилизации клеток продуцентов под воздействием метаболитов разных продуцентов (молочной кислоты, спирта), образовавшихся при их совместном культивировании [28]. Высокий выход лактулозы при комбинированных ферментах дрожжей с термофильным стрептококком может быть обусловлен отсутствием у него способности утилизировать галактозу, что характерно для большинства штаммов этого вида [29]. Следствием этого было повышенное содержание галактозы в субстрате, что подтверждается данными экспериментов (табл. 1), и ее возможное участие в образовании лактулозы. Аналогичные эксперименты, проведенные с невязкими расами *L. acidophilus* и *S. thermophilus*, не поз-

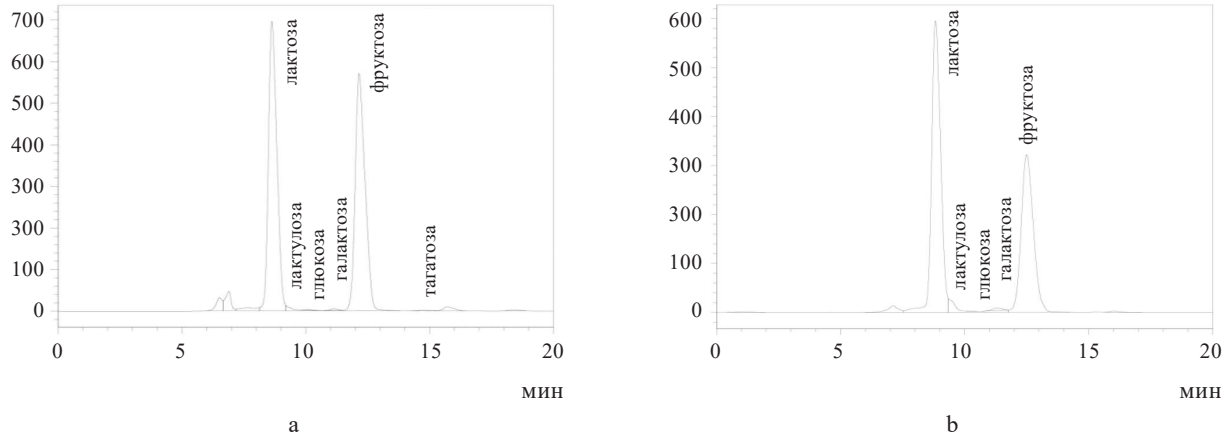

Рисунок 5. Хроматограммы образцов: a – с использованием ферментов *Kluyveromyces marxianus* 1338 и *Lactobacillus acidophilus* B через 3 ч ферментации; b – *Kluyveromyces lactis* 1333 и *Streptococcus thermophilus* B через 30 мин ферментации

Figure 5. Chromatograms: a – enzymes of *Kluyveromyces marxianus* 1338 and *Lactobacillus acidophilus* B after 3 h of fermentation; b – *Kluyveromyces lactis* 1333 and *Streptococcus thermophilus* B after 30 min of fermentation

волили получить выход лактулозы выше 1 %, поэтому можно предположить, что штаммовый состав этих микроорганизмов существенно влияет на трансгликозилирующую активность ферментов. Все эти предположения требуют дополнительных исследований.

Выводы

К общим закономерностям образования лактулозы при использовании ферментов исследованных дрожжей можно отнести быстрый рост ее концентрации в течение первых 30 мин реакции, после чего происходит ее снижение или стабилизация. В дальнейшем закономерности биосинтеза лактулозы значительно отличались в опытах с ферментами, полученными из дрожжей не только разных видов, но и разных штаммов одного вида. Полученные данные соответствуют известным теоретическим положениям о кинетически контролируемых реакциях, для которых характерны кратковременные максимальные выходы, зависящие от соотношения скоростей синтеза и гидролиза.

Активность некоторых комбинированных неочищенных ферментных препаратов дрожжей и молочнокислых микроорганизмов существенно превышает активность бета-галактозидаз продуцентов после их раздельного культивирования. Анализ полученных данных показал, что ряд сочетаний культур с максимальной гидролитической активностью фермента не совпадает полностью с рядом сочетаний культур, давших неочищенные ферментные препараты с максимальным выходом лактулозы. Показана взаимосвязь гидролитической и трансгликозилирующей активности полученных β-галактозидаз, однако прямой зависимости между ними не установлено.

Закономерности образования лактулозы под влиянием комбинированных неочищенных ферментных препаратов зависят как от штамма дрожжей, так и от вида молочнокислых бактерий. Это подтверждают полученные другими исследователями выводы о том, что при биосинтезе лактулозы главным фактором, определяющим результат процесса, является происхождение фермента, влияющее на его структуру и свойства. Самые высокие выходы лактулозы были получены при использовании комбинированных β-галактозидаз исследованных штаммов дрожжей (*Kluyveromyces lactis* ВКМ Y-1333 и Y-1339, *Kluyveromyces marxianus* ВКМ Y-459 и Y-1338) с вязкими расами *S. thermophilus*.

Совместное культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий, продуцентов разных по свойствам β-галактозидаз в некоторых сочетаниях позволило получить комбинированные неочищенные ферментные препараты с более высокой активностью и более высокие выходы лактулозы, чем отдельное культивирование дрожжей. Данные результаты могут быть использованы для получения очищенных ферментных препаратов β-галактозидаз и лактулозосодержащих продуктов из вторичного молочного сырья.

Критерии авторства

С. А. Рябцева – концептуализация, курирование данных, методология, проверка, визуализация, написание – оригинальный черновик, написание – обзор и редактирование. М. А. Шпак – курирование данных, формальный анализ, исследование, проверка, написание – обзор и редактирование. А. Д. Лодыгин – привлечение финансирования, методология, администрация проекта, надзор, проверка, написание – обзор и редактирование. А. В. Серов – курирование данных, формальный анализ, проверка, написание – обзор и редактирование. С. Н. Сазанова – формальный анализ, исследование, написание – обзор и редактирование.

М. В. Скороходова – формальный анализ, исследование, написание – обзор и редактирование. В. Ю. Ромахова – формальный анализ, исследование, написание – обзор и редактирование.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

S.A. Ryabtseva was responsible for the research concept, data curation, methodology, validation, visualization, original draft, and proofreading; M.A. Shpak provided the data curation, formal analysis, research, review, and proofreading; A.D. Lodygin dealt with the fundraising, methodology, project administration, supervision, review, and proofreading; A.V. Serov was responsible for the data curation, formal analysis, verification, review, and proofreading; S.N. Sazanova did the formal analysis, research, review, and proofreading; M.V. Skorokhodova provided the formal analysis, research, review, and proofreading; V.Yu. Romakhova was responsible for the formal analysis, research, review, and proofreading.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Vera C, Guerrero C, Illanes A. Trends in lactose-derived bioactives: synthesis and purification. Systems Microbiology and Biomanufacturing. 2022;2:393–412. http://doi.org/10.1007/s43393-021-00068-2

2. Nooshkam M, Babazadeh A, Jooyandeh H. Lactulose: Properties, technofunctional food applications, and food grade delivery system. Trends in Food Science and Technology. 2018;80:23–34. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.028

3. Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Budkevich RO, Anisimov GS, Chuklo AO, Shpak MA. Physiological effects, mechanisms of action and application of lactulose. Problems of Nutrition. 2020;89(2):5–20. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10012; https://www.elibrary.ru/TNXHMW

4. Ryabtseva SA. Lactulose technology. Moscow: DeLi print; 2003. 232 p. (In Russ.). [Рябцева С. А. Технология лактулозы. М.: ДеЛи принт, 2003. 232 с.].

5. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Recent advances on prebiotic lactulose production. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2016;32(9):154. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2103-7

6. Silvério SC, de Macedo EA, Teixeira JA, Rodrigues LR. Biocatalytic approaches using lactulose: end product compared with substrate. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2016;15(5):878–896. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12215

7. Vera C, Illanes A. Lactose-derived nondigestible oligosaccharides and other high added-value products. In: Illanes A, Guerrero C, Vera C, Wilson L, Conejeros R, Scott F, editors. Lactose-derived prebiotics. A process perspective. Academic Press; 2016. pp. 87–110. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2

8. Wang M, Wang L, Lyu X, Hua X, Goddard JM, Yang R. Lactulose production from lactose isomerization by chemocatalysts and enzymes: Current status and future perspectives. Biotechnology Advances. 2022;60:108021. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108021

9. Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Shpak MA, Lodygin AD, Anisimov GS, Sazanova SN, *et al.* Biotechnology of Lactulose Production: Progress, Challenges, and Prospects. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(1):97–122c. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2419; https://www.elibrary.ru/DVBEZS

10. de Albuquerque TL, de Sousa M, Gomes e Silva NC, Girão Neto CAC, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R, *et.al.* *β*-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. International Journal of Biological Macromolecules. 2021;191:881–898. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133

11. Lyutova LV, Naumov GI, Shnyreva AV, Naumova ES. Molecular polymorphism of *β*-galactosidase LAC4 genes in dairy and natural strains of *Kluyveromyces yeasts*. Molecular Biology. 2021;55(1):75–85. (In Russ.). https://doi.org/10.31857/S0026898421010109; https://www.elibrary.ru/DXUCCI

12. Lyutova LV, Naumova ES. Inter-strain hybridization of *Kluyveromyces lactis* for creating efficient lactose-fermenting yeast. Biotekhnologiya. 2021;37(4):43–50. (In Russ.). https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-4-43-50; https://www.elibrary.ru/XZBKCB

13. Lyutova LV, Naumova ES. Comparative analysis of fermentation of lactose and its components, glucose and galactose, by interstrain hybrids of dairy yeast *Kluyveromyces lactis*. Biotechnology. 2023;39(1):3–11. (In Russ.). https://doi.org/10.56304/S0234275823010064; https://www.elibrary.ru/BMMPOR

14. Ruiz-Ramírez S, Jiménez-Flores R. Properties of *β*-Galactosidases derived from *Lactobacillaceae* species and its capacity for galacto-oligosaccharides production. Journal of Dairy Science. 2023;106(12):8193–8206. https://doi.org/10.3168/jds.2023-23392

15. Dorau R, Jensen PR, Solem C. Purified lactases versus whole-cell lactases-the winner takes it all. Applied Microbiology and Biotechnology. 2021;105:4943–4955. https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11388-7

16. Wang Q, Lillevang SK, Rydtoft SM, Xiao H, Fan M-T, Solem C, *et.al.* No more cleaning up - Efficient lactic acid bacteria cell catalysts as a cost-efficient alternative to purified lactase enzymes. Applied Microbiology and Biotechnology. 2020;104:6315–6323. https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10655-3

17. Hashem AM, El-Azeem Ismail SA, Helmy WA, El-Mohamady Y, Abou-Romia R. Factors affecting the production of lactulose by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495 b-galactosidase and its biological activity. Malaysian Journal of Microbiology. 2013;9(1):1–6. http://doi.org/10.21161/mjm.43612

18. Ryabtseva SA, Kotova AA, Skripnyuk AA. Yeast in the processing of dairy raw materials. St. Petersburg: Lan; 2019. 120 p. (In Russ.). [Рябцева С. А., Котова А. А., Скрипнюк А. А. Дрожжи в переработке молочного сырья: монография. СПб: Лань, 2019. 120 с.].

19. Botvynko A, Bednářová A, Henke S, Shakhno N, Čurda L. Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial *β*-galactosidases. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2019;517(4):762–766. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.001

20. Inchaurrondo VA, Yantorno OM, Voget CE. Yeast growth and beta-galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. Process biochemistry. 1994;29(1):47–54. https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80058-8

21. Guerrero C, Vera C, Plou F, Illanes A. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial b-galactosidases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2011;72(3–4):206–212. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.007

22. Hua X, Yang R, Shen Q, Ye F, Zhang W, Zhao W. Production of 1-lactulose and lactulose using commercial b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the presence of fructose. Food Chemistry. 2013;137(1–4):1–7. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.003

23. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Influences of operating conditions on continuous lactulose synthesis in an enzymatic membrane reactor system: A basis prior to long-term operation. Journal of Biotechnology. 2015;203:89–96. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.016

24. De Albuquerque TL, Gomes SDL, D'Almeida AP, Fernandez-Lafuente R, Gonçalves LRB, Rocha MVP. Immobilization of *β*-galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. Process Biochemistry. 2018;73:65–73. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.010

25. Neto CACG, Silva NCGE, de Oliveira Costa T, de Albuquerque TL, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R, *et.al.* The beta-galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. International Journal of Biological Macromolecules. 2021;176:468–478. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078

26. Lee Y-J, Kim CS, Oh D-K. Lactulose production by beta-galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2004;64:787–793. http://doi.org/10.1007/s00253-003-1506-1

27. 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;70:9–17. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006

28. Ryabtseva SA, Skripnyuk AA, Kotova AA, Khramtsov AG, Rodnaya AB, Lodygin AD, *et al.* Method for combined enzyme beta-galactosidase production. Russia Patent Ru 2622078. 2017. [Способ получения комбинированного ферментного препарата бета-галактозидаз: пат. 2622078 Рос.Федерация. № 2016100779 / Рябцева С. А. [и др.]; заявл. 21.01.2016; опубл. 09.06.2017. Бюл. № 16.].

29. Zhao R, Chen Z, Liang J, Dou J, Guo F, Xu Z, *et.al.* Advances in Genetic Tools and Their Application in *Streptococcus thermophilus*. Foods. 2023;12(16):3119. https://doi.org/10.3390/foods12163119