УДК 637.345:579.222.7

А.Н. Петров, А.С. Матвеенко, М.Н. Стрижко

ИССЛЕДОВАНИЕ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБЛАДАЮЩИХ β-ГАЛАКТОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И ИХ АНАЛИЗ

Лактаза (β-галактозидаза) – фермент класса гидролаз, катализирующий расщепление лактозы в желудочно-кишечном тракте на галактозу и лактулозу. В нашей стране производство низколактозных молочных продуктов и лекарственных средств для восполнения дефицита лактозы отсутствует. Получение их является перспективным направлением. В связи с этим проведен анализ микроорганизмов-продуцентов фермента β-галактозидазы, сделан вывод по полученным результатам, которые будут использованы в дальнейших исследованиях.

Лактаза, препараты β-галактозидазы, биосинтез, дрожжи.

Введение

Препараты β-галактозидазы прежде всего находят широкое применение в молочной промышленности и в тех отраслях, где возможно использование отходов молокоперерабатывающей промышленности, содержащих дисахарид лактозу. Лактоза является очень ценным углеводом, но сахар этот плохорастворим, несладкий, не усваивается часто животными организмами, не сбраживается дрожжами. Если с помощью β-галактозидазы осуществить его расщепление до галактозы и глюкозы, то эта смесь уже имеет сладкий вкус, хорошо растворяется в воде, глюкоза усваивается как животными, так и микроорганизмами. Обработка молока и молочных изделий препаратами β-галактозидазы позволяет обеспечить часть населения, страдающего лактазной недостаточностью, молочными продуктами, почти не содержащими лактозу [2].

Обработка молока ферментом при концентрировании, особенно при его последующем хранении при низких температурах, позволяет повысить стабильность продукта при регенерации. Гидролиз около 20–30 % лактозы молока при приготовлении мороженого позволяет предотвратить явление его кристаллизации и уменьшить на 1–2 % добавку сахарозы. Использование β-галактозидазы при приготовлении кисломолочных продуктов способствует более быстрому развитию молочнокислых микроорганизмов, что позволяет ускорить технологические процессы [3].

Использование β-галактозидазы делает перспективным утилизацию различных молочных отходов, особенно молочной сыворотки, во многих отраслях, например в хлебопечении, в кондитерской промышленности, при производстве мороженого, в качестве компонента питательных сред при получении белковых обогатителей кормов или различных биологически активных веществ, в кормопроизводстве, в медицинской промышленности, медицине и других областях. Большое значение придается β-галактозидазе при ее использовании в аналитических целях и для диагностики ряда заболеваний [1].

Непереносимость молока встречается у 15–30 % населения России и обусловлена дефицитом в организме человека фермента лактазы, который вырабатывается в тонком кишечнике и катализирует расщепление лактозы (молочного сахара) на глюкозу и галактозу, которые затем легко всасываются в кровь.

Коррекция лактазной недостаточности может быть осуществлена двумя путями: использованием молочных продуктов с частично гидролизованной лактозой либо приемом лекарственных препаратов, содержащих фермент лактазу.

В нашей стране производство низколактозных молочных продуктов и лекарственных средств для восполнения дефицита лактозы отсутствует. Импортные препараты, закупаемые в ограниченном количестве, не удовлетворяют спрос в нужном объеме. В связи с этим создание конкурентоспособного отечественного универсального препарата β-галактозидазы, который может быть использован как для предварительного гидролиза лактозы в молочных продуктах, так и для приема внутрь, является весьма актуальным и практически важным [5].

Конкуренция в сфере производства и применения препаратов β-галактозидазы оправдывает все возрастающие усилия ученых и производственников, направленные на поиск новых штаммов-продуцентов, изучение закономерностей биосинтеза ферментов и свойств ферментных белков – основы создания рентабельных биотехнологий их производства и применения [4].

Лактазу получают из различных источников: животных, растений и микроорганизмов (бактерии, грибы, дрожжи). Однако бактериальные ферменты небезопасны для применения в пищевой промышленности. Ферменты из животных и растительных источников дороги и неактивны. Наиболее пригодны для практического применения грибные и дрожжевые β-галактозидазы.

Целью работы является анализ известных микроорганизмов-продуцентов фермента, выделение лучших для дальнейших исследований.

Объекты и методы исследований

Теоретические и экспериментальные исследования проведены в соответствии с поставленными задачами в научно-образовательном центре Государственного образовательного учреждения высшего

профессионального образования «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности». Весь цикл исследований состоял из нескольких взаимосвязанных этапов.

На первом теоретическом этапе для формулировки цели и задач собственных исследований проводили анализ доступной отечественной и зарубежной научной информации по теме работы.

Второй этап посвящен изучению микроорганизмов, обладающих наибольшей лактазной активностью. На этом этапе контролируемыми параметрами были изменение скорости роста биомассы в процессе культивирования, определение оптимальной температуры, продолжительность культивирования. Далее определяли основные параметры выросших микроорганизмов: содержание сухих веществ, прирост биомассы и β-галактозидазную активность.

Объектами исследований на разных этапах являлись:

– микроскопические грибы *Penicillium canescens* F178;

– бактерии *Bacillus subtilis* B2273, *Bacillus coagulans* B4521 и *Streptococcus thermophillus* B5329;

– дрожжи *Kluyveromyces marxianus* Y3240 и *Kluyveromyces lactis* Y3268.

Представленные микроорганизмы являются активными продуцентами фермента β-галактозидазы. Питательные среды для вышеперечисленных штаммов микроорганизмов представлены в табл. 1–5.

Таблица 1

Состав среды для *Penicillium canescens*

Ингредиенты	Количество
Неохмеленное сусло 3,5 Б	1,0 л
Агар	20 г

Таблица 2

Состав среды для *Bacillus subtilis*

Ингредиенты	Количество
Дистиллированная вода	1,0 л
Пептон	10,0 г
Агар	20,0 г
NaCl	5,0 г

Таблица 3

Состав среды для *Bacillus coagulans*

Ингредиенты	Количество
Дистиллированная вода	1 л
Обезжиренный фарш	500 г
Пептон	10 г
Агар	20 г
NaCl	5 г

Таблица 4

Состав среды для *Streptococcus thermophillus*

Ингредиенты	Количество
Пептон	10,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Мясной экстракт	5,0 г
Na_2HPO_4	8,5 г
KH_2PO_4	2,0 г
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1,0 г
Лактоза	10,0 г
Агар	10,0 г
Дистиллированная вода	1,0 л

Таблица 5

Состав среды для *Kluyveromyces marxianus* и *Kluyveromyces lactis*

Ингредиенты	Количество
$NaNO_3$	3,0 г
KH_2PO_4	1,0 г
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,5 г
KCl	0,5 г
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,01 г
Глюкоза	30,0 г
Агар	20,0 г
Дистиллированная вода	1,0 л

Определение активной кислотности (pH) осуществляют потенциометрическим методом, используя электронный pH-метр. Использование данного прибора позволяет измерять pH в более широком диапазоне и более точно (до 0,01 единицы pH), чем с помощью лакмусовой бумаги. Данные заносят в таблицу.

Титруемую кислотность определяют методом титрования культуральной жидкости 0,1 М раствором NaOH в присутствии индикатора фенолфталеина. Одновременно определение титруемой кислотности необходимо проводить в трех повторениях, в таблицу вносят средний результат.

Метод определения содержания сухих веществ – рефрактометрический. Этот метод основан на зависимости показателя преломления света от состава системы.

Для определения скорости прироста микроорганизмов используется метод отделения мицелия от культуральной жидкости при помощи фильтрования. Разность между массой фильтра с сухим мицелием и массой пустого фильтра является массой сухого мицелия, образовавшегося за период культивирования микроорганизма в термостате. Значения прироста биомассы заносят в таблицу. Исходя из полученных данных вычисляют общую скорость роста микроорганизма, измеряемую в г/ч.

Определение β-галактозидазной активности проводили в отфильтрованной культуральной жидкости,

гомогенизированной и без разрушения клеточной стенки на фотоэлектроколориметре при длине волны 405 нм.

Разрушение клеточных стенок осуществляют на гомогенизаторе SCIENTZ-II D, воздействуя на клетки ультразвуком с частотой 22 кГц, при следующем режиме: озвучивание клеток производится 4 раза, общее время 30 с, в течение которого импульсы продолжительностью 2 с чередуются с 2 с перерыва. Целью гомогенизации является высвобождение внутриклеточного фермента во внешнюю среду.

Результаты и их обсуждение

Существенным фактором, оказывающим влияние на рост и метаболизм микроорганизмов, является температура культивирования. Для выбора оптимальной температуры следили за изменением скорости роста биомассы, значения которой представлены в табл. 6.

Таблица 6

Изменение биомассы
в процессе культивирования микроорганизмов

Температура, °С	Количество микроорганизмов, тыс. КОЕ/г			
	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки
Penicilliun canescens				
28±2	24±2	70±2	120±3	180±5
32±2	8±1	20±2	34±2	44±3
Streptococcus thermophillus				
37±2	18±2	35±2	100±3	107±3
42±2	40±2	83±3	120±4	132±4
Bacillus subtilis				
37±2	400±12	сплошной рост		
42±2	сплошной рост			
Bacillus coagulans				
37±2	сплошной рост			
42±2	сплошной рост			
Kluyveromyces marxianus				
28±2	10±1	18±2	27±2	40±2
32±2	6±1	11±1	15±2	36±2
Kluyveromyces lactis				
28±2	43±3	50±3	93±4	120±4
32±2	18±2	25±2	72±3	112±4

В результате анализа данных, представленных в табл. 6, можно сделать вывод о том, что оптимальной температурой для роста микроорганизма *Penicilliun canescens* является 28 ºС, для *Streptococcus thermophillus* – 42 ºС, для *Bacillus coagulans* и *Bacillus subtilis* – 37 ºС, для *Kluyveromyces marxianus* и *Kluyveromyces lactis* – 28 ºС. Дальнейшее культивирование представленных штаммов в пробирках на скошенном агаре и в жидких питательных средах проводили при выбранных температурах. Продолжительность культивирования для каждого штамма будет составлять 1, 3, 5 и 7 суток.

После культивирования микроорганизмов на жидких питательных средах определяют основные контролируемые параметры. В табл. 7 представлено содержание сухих веществ в питательной среде до культивирования, а также в фильтрате для каждого исследуемого штамма.

Таблица 7

Массовая доля сухих веществ в фильтрате

Массовая доля сухих веществ, %					
До культивирования	Температура, °С	В процессе культивирования			
		1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки
Penicilliun canescens					
1,1±0,1	28±2	1,1±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,5±0,1
Streptococcus thermophillus					
1,7±0,1	42±2	1,8±0,1	2,1±0,1	2,2±0,1	3,1±0,1
Bacillus subtilis					
2,5±0,1	37±2	2,9±0,1	3,0±0,1	3,1±0,1	3,6±0,1
Bacillus coagulans					
2,5±0,1	37±2	2,5±0,1	3,1±0,1	3,6±0,1	4±0,1
Kluyveromyces marxianus					
3,1±0,1	28±2	3,0±0,1	3,1±0,1	3,1±0,1	3,2±0,1
Kluyveromyces lactis					
3,1±0,1	28±2	3,6±0,1	3,6±0,1	3,7±0,1	4±0,1

По данным табл. 7 видим, что массовая доля сухих веществ возрастает с увеличением продолжительности культивирования. Наибольшая массовая доля сухих веществ наблюдается у штамма *Bacillus coagulans* и составляет (1,5±0,1) %, наименьшая – у *Kluyveromyces marxianus* и составляет (0,2±0,1) %.

Определение прироста биомассы у изучаемых микроорганизмов представлено в табл. 8. Прирост биомассы – это количественное увеличение популяции клеток микроорганизма за определенный промежуток времени. Этот способ наиболее пригоден, в частности, для организмов, образующих мицелий, нити или скопления клеток.

Таблица 8

Прирост биомассы

Температура, °С	Биомасса, г				Общая скорость роста, г/ч
	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки	
Penicilliun canescens					
28±2	0,06±0,01	0,06±0,01	0,07±0,01	0,08±0,01	0,0028±0,01
Streptococcus thermophillus					
42±2	0,04±0,01	0,05±0,01	0,06±0,01	0,06±0,01	0,0022±0,01
Bacillus subtilis					
37±2	0,08±0,01	0,11±0,01	0,18±0,02	0,22±0,01	0,0061±0,01
Bacillus coagulans					
37±2	0,08±0,01	0,11±0,01	0,14±0,01	0,30±0,01	0,0065±0,01
Kluyveromyces marxianus					
28±2	0,16±0,01	0,2±0,01	0,23±0,01	0,56±0,01	0,0119±0,01
Kluyveromyces lactis					
28±2	0,03±0,01	0,06±0,01	0,16±0,01	0,33±0,01	0,00605±0,01

Наибольшим приростом биомассы отличаются дрожжи вида *Kluyveromyces marxianus*, общая скорость роста составляет (0,0119±0,01) г/ч, тогда как наименьшая скорость роста (0,0022±0,01) г/ч наблюдается у бактерий вида *Streptococcus thermophillus*. Таким образом, можно сделать вывод, что дрожжи активнее усваивают питательные и энергетические

источники среды.

Наличие определенного фермента в препарате может быть установлено по результатам той реакции, которую катализирует фермент, т.е. по количеству образовавшихся продуктов реакции или уменьшению исходного субстрата. Результаты измерения приведены в табл. 9 и 10.

Определение активности проводили в отфильтрованной культуральной жидкости, гомогенизированной и без разрушения клеточной стенки на фотоэлектроколориметре при длине волны 405 нм. По получившейся оптической плотности определили лактазную активность по калибровочному графику (рис. 1).

Пересчет лактазной активности из мкмоль/мл в ед/мг белка перевели по формуле

$$\text{Ауд.} = \frac{\text{Д} \times V_{\text{инк.ср.}}}{C \times Ve \times t \times m}, \qquad (1)$$

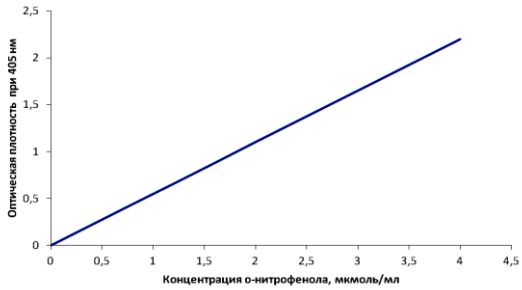

Рис. 1. Калибровочный график по о-нитрофенолу

где Д – оптическая плотность, измеренная на спектрофотометре при 405 нм; C – концентрация о-нитрофенола, определяемая по калибровочной кривой (см. рис. 1), мкмоль/мл; $V_{\text{инк.ср}}$. – объем инкубационной среды, мл; V_e – объем ферментного раствора, мл; t – время гидролиза, мин; m – содержание белка в 1 мл ферментного препарата, взятого для гидролиза, мг.

Таблица 9

Изменение β-галактозидазной активности в процессе культивирования микроорганизмов без разрушения клеточной стенки

Температура, °С	Лактазная активность, ед/мг белка				Общая лактазная активность, ед/мг белка
	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки	
Penicilliun canescens					
28±2	0,23±0,05	0,55±0,05	1,14±0,05	1,45±0,05	0,84±0,05
Streptococcus thermophillus					
42±2	0,15±0,05	0,25±0,05	0,40±0,05	0,55±0,05	0,34±0,05
Bacillus subtilis					
37±2	0,31±0,05	0,49±0,05	0,74±0,05	0,98±0,05	0,63±0,05
Bacillus coagulans					
37±2	0,62±0,05	0,68±0,05	1,35±0,05	2,68±0,05	1,33±0,05
Kluyveromyces marxianus					
28±2	2,95±0,05	3,03±0,05	3,38±0,05	4,06±0,05	3,36±0,05
Kluyveromyces lactis					
28±2	0,68±0,05	1,05±0,05	1,43±0,05	1,89±0,05	1,26±0,05

Таблица 10

Изменение β-галактозидазной активности в процессе культивирования микроорганизмов с разрушением клеточной стенки

Температура, °С	Лактазная активность, ед/мг белка				Общая лактазная активность, ед/мг белка
	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки	
Penicilliun canescens					
28±2	0,26±0,05	1,0±0,05	1,25±0,05	1,69±0,05	1,05±0,05
Streptococcus thermophillus					
42±2	0,19±0,05	0,33±0,05	0,49±0,05	0,77±0,05	0,45±0,05
Bacillus subtilis					
37±2	1,60±0,05	1,66±0,05	1,97±0,05	2,28±0,05	1,88±0,05
Bacillus coagulans					
37±2	0,86±0,05	2,18±0,05	4,31±0,05	5,14±0,05	3,12±0,05
Kluyveromyces marxianus					
28±2	3,38±0,05	4,25±0,05	4,65±0,05	5,48±0,05	4,44±0,05
Kluyveromyces lactis					
28±2	0,74±0,05	1,11±0,05	2,09±0,05	2,35±0,05	1,57±0,05

Анализируя данные табл. 9 и 10, делаем вывод, что наибольшей лактазной активностью обладает

штамм *Kluyveromyces marxianus* (общая лактазная активность составляет (3,36±0,05) и (4,44±0,05) ед/мг белка у негомогенизированной и гомогенизированной культуральной жидкости соответственно). Также высокой активностью отличается штамм *Bacillus coagulans* (общая лактазная активность составляет (1,33±0,05) и (5,14±0,05) ед/мг белка у негомогенизированной и гомогенизированной культуральной жидкости соответственно).

Наименьшая β-галактозидазная активность отмечается у штамма *Streptococcus thermophillus*, которая составляет (0,34±0,05) и (0,45±0,05) ед/мг белка для культуральной жидкости без разрушения биомассы и разрушенной. Заметное увеличение β-галактозидазной активности в процессе культивирования наблюдается на 5–7 сутки.

Выводы

Были исследованы штаммы микроорганизмов, обладающие β-галактозидазной активностью, и выбран наиболее продуктивный штамм – дрожжи *Kluyveromyces marxianus*.

Изучены основные показатели полученного фермента лактазы: общая β-галактозидазная активность неочищенного фермента составила (3,36±0,05) и (4,44±0,05) ед/мг белка у негомогенизированной и гомогенизированной культуральной жидкости соответственно.

Список литературы

1. Грачева, И.М. Технология ферментных препаратов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 335 с.
2. Докучаева, Г.А. Рынок ферментов: в ожидании перемен [Электронный ресурс]. – URL: http://www.abercade.ru/research/analysis/1988.html
3. Общая технология микробиологических производств / М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 264 с.
4. Особенности продукции внеклеточных β-галактозидаз мицелиальными грибами / Л.И. Сапунова, И.О. Тамкович, А.А. Костеневич [Электронный ресурс]. – URL: immunopathology.com
5. Сухих, О.А. Получение препарата грибной β-галактозидазы для коррекции лактазной недостаточности: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2007. – 21 с.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт консервной и овощесушильной промышленности,
142703, Россия, Московская область, г. Видное, ул. Школьная, 78.
Тел./факс: (495) 541-08-92
e-mail: vniikop@rambler.ru

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

A.N. Petrov, A.S. Matveenko, M.N. Strizhko

INVESTIGATION OF MICROORGANISM STRAINS WITH β-GALACTOSIDASE ACTIVITY

Lactase (β-galactosidase) is an enzyme of hydrolases class, catalyzing the splitting of lactose in the alimentary canal into galactose and lactulose. In our country, the production of low lactose dairy products and medicines to make up the deficiency of lactose is absent. Their production is a promising direction. In this regard, the analysis of microorganisms producing β-galactosidase enzyme is carried out. The conclusion based on the results obtained will be used in further studies.

Lactase, β-galactosidase preparations, biosynthesis, yeast.

VNIIKOP of the Rosselhosakademiya
78, ShkolnoyoStr., Vidnoye, 142703,
Moscow region, Russia
Phone/Fax: +7(495) 541-08-92
e-mail: vniikop@rambler.ru

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru