

УДК 663.15

**Карасева Анастасия Валерьевна, Куликова Ирина Кирилловна,
Анисимов Георгий Сергеевич, Слюсарев Геннадий Васильевич**

СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ ПРОМЫШЛЕННЫХ β -ГАЛАКТОЗИДАЗ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА ЛАКТОЗЫ В МОЛОЧНОМ СЫРЬЕ

В статье рассмотрены основные характеристики фермента β -галактозидазы, различные методы получения фермента. Проведена сравнительная оценка продуцентов фермента β -галактозидазы. Обработка молока и молочных изделий препаратами β -галактозидазы позволяет обеспечить часть населения, страдающего лактазной недостаточностью, молочными продуктами, почти не содержащими лактозу. Обработка молока ферментом при концентрировании, особенно при его последующем хранении при низких температурах, позволяет повысить стабильность продукта при регенерации.

Ключевые слова: фермент, β -галактозидаза, микроорганизмы, лактоза, продуценты.

Anastasiya Karaseva, Irina Kylikova, Georgy Anisimov, Gennady Slyusarev
**COMPARISON OF THE PROPERTIES OF INDUSTRIAL
 β -GALACTOSIDASE FOR LACTOSE HYDROLASE IN DAIRY RAW MATERIALS**

The main characteristics of β -galactosidase enzyme, various basic methods of enzyme preparation are considered in the article. A comparative evaluation of the β -galactosidase enzyme producers was carried out. Preparations of β -galactosidase make it possible to provide a portion of the population suffering from lactase deficiency, dairy products almost free of lactose. Processing the milk with the enzyme when concentrating, especially when it is stored at low temperatures, improves stability during regeneration

Key words: enzyme, β -galactosidase, microorganisms, lactose, producers.

Лактоза молока – единственный в природе углевод, выполняющий две функции: источника энергии (за счет нее покрывается 30–50 % энергозатрат человека) и строительного материала (галактоза, компонент лактозы, входит в состав тканей оболочки головного мозга) [1].

Лактоза обладает способностью стимулировать развитие молочнокислых бактерий, которые подавляют жизнедеятельность гнилостной микрофлоры, оказывают гепатозащитное действие, способствуют усвоению кальция, магния и фосфора. В то же время концентрация в молоке лактозы намного больше той, которую могут переносить люди с лактазной недостаточностью.

Непереносимость лактозы может наблюдаться у грудных детей, взрослых и пожилых людей. Лактоза может стать причиной серьезных проблем с пищеварением и работой желудочно-кишечного тракта. При недостатке или отсутствии лактазы гидролиз лактозы не происходит, и она достигает толстого кишечника в нативном состоянии, где расщепляется кишечной микрофлорой до органических кислот и углекислого газа. Накопление этих соединений способствует повышению осмотического давления, притоку в толстый кишечник жидкости, вызывая такие симптомы, как диарея, рвота, боли в кишечнике, повышенное газообразование (метеоризм).

Предлагаются разные способы снижения содержания лактозы: сбраживание молочнокислыми бактериями, в том числе с применением специальных штаммов и ассоциаций молочнокислых бактерий разных видов; гидролиз лактазой, специально вносимой в молочное сырье; смешение различных компонентов с молочным белком, выделенным ультрафильтрацией молока [2].

Один из распространенных способов получения низколактозных или безлактозных продуктов – применение ферментативного гидролиза лактозы с использованием фермента β -галактозидазы.

β -Галактозидаза (лактаза, КФ 3.2.1.23) – фермент класса гидролаз, катализирующий реакции гидролиза и трансгалактозилирования лактозы, действует на O-гликозильные соединения и отщепляет концевой нередуцированный остаток β -D галактозы в β -галактозидах, включая лактозу, с образованием свободных моносахаридов, либо переносит остаток β -D-галактозы на молекулу лактозы или других β -D-галактозидов с образованием галактоолигосахаридов [3].

β -галактозидаза имеет три ферментативные активности (рис. 1). Во-первых, она может расщеплять дисахарид лактозу с образованием глюкозы и галактозы, которые затем могут войти в гликолиз. Во-вторых, фермент может катализировать трансгалактозилирующую активность лактозы в аллолактозе, и, в-третьих, аллолактоза может быть расщеплена до моносахаридов. Аллолактоза привязывается к гену *LacZ* репрессор и создает положительную петлю обратной связи, которая регулирует количество β -галактозидазы в клетке.

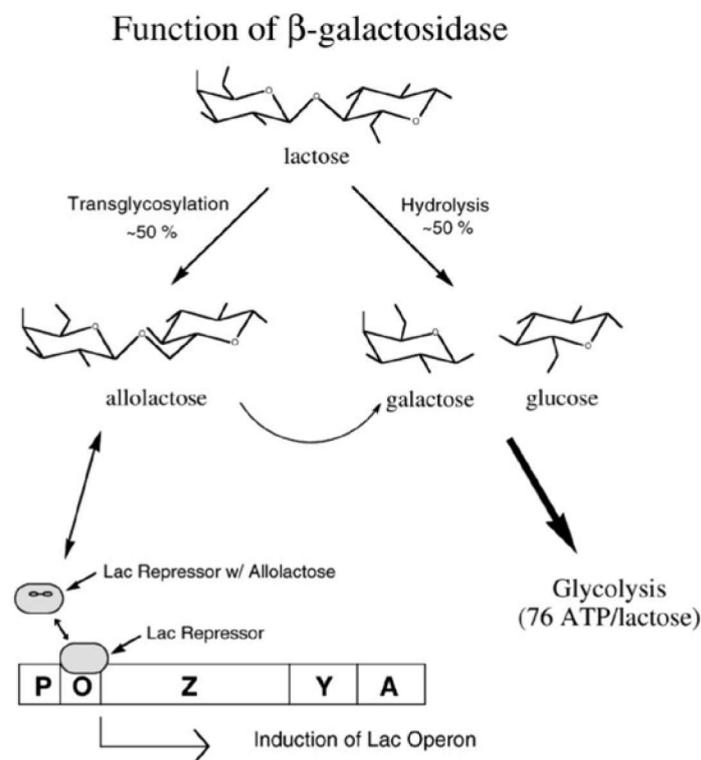


Рис. 1. Роль β -галактозидазы в клетке

β -Галактозидаза представляет собой тетрамер, состоящий из четырех идентичных полипептидных цепей, каждая – из 1023 аминокислот. Кристаллическая структура была первоначально определена в моноклинную кристаллическую форму с четырьмя тетрамерами в асимметричной единице. Впоследствии структура была усовершенствована до 1,7 разрешения в ромбическом кристалле с одним тетрамером в асимметричной единице. Последняя форма технически лучше и используется для последующих структурных и функциональных исследований.

В пределах каждого мономера, 1023 аминокислоты образуют пять четко определенных структурных доменов. Третий (центральный) домен (остатки 334-627), представляет собой так называемый триозофосфатизомеразу (ТИМ) или $\alpha\beta\delta$ -бочонок с активным центром, образуя глубокую яму на C-конце этого бочонка.

Общая структура тетрамера показана на рис. 2А.

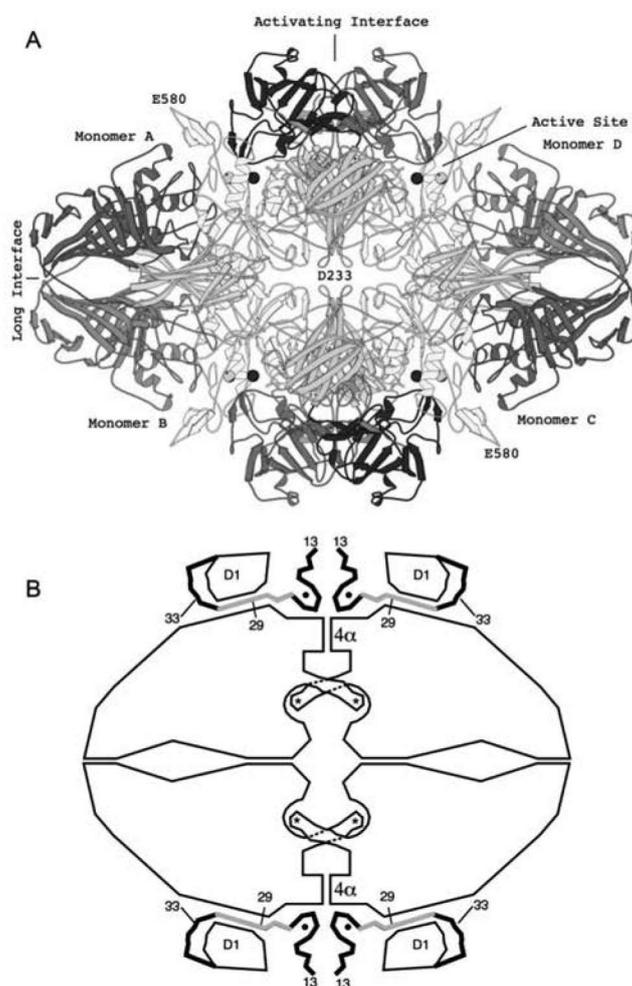


Рис. 2. Тетрамерная структура бета-галактозидазы (А), позвоночник структуры фермента (В)

Домен 1 – синий; Домен 2 – зеленый; Домен 3 – желтый; Домен 4 – голубой; Домен 5 – красный. Более темные затенения используются для различения эквивалентных доменов в разных субъединицах. Ионы металлов показаны в виде сфер, Na^+ , зеленый; Mg^{++} , синий. На рис. 2А есть одна двойная ось симметрии, которая расположена горизонтально относительно другой, которая является вертикальной, и третья, которая перпендикулярна к странице. Горизонтальная двойная ось образует так называемый «длинный» интерфейс, а по вертикальной оси симметрии образует «активирующий» интерфейс [4].

Эскиз тетрамера (рис. 2В), в соответствии со структурой (А) показывает особенности в частности, относящиеся к альфа-комплементации. Четыре активных участка (каждый выделен звездочкой) расположены по направлению к центру рисунка. В каждом случае контур включает остатки 272–288 отходит от одной субъединицы, чтобы завершить активный сайт соседней субъединицы. «Интерфейс активации» проходит вертикально через центр тетрамера. Часть интерфейса содержит пучок из четырех альфа-спиралей. Остаточные 13–50, показанные в виде толстых линий, проходят через туннель между первым доменом (меченой D1) и остальной частью белка. Область, заштрихованная серым цветом (остатки 23–31), удаляется в одном из альфа-доноров. Ионы магния (небольшие сплошные кружки) – мост между комплементационным пептидом и остальной частью белка.

Источники для выделения фермента обширны и разнообразны. В растениях β -галактозидаза встречается в эмульсине, в некоторых розовоцветных (миндале, сливе, абрикосах, персиках). Фермент найден в семенах сои, бобов. Широко распространена β -галактозидаза и в животном мире. Высокая активность β -галактозидазы обнаружена в слизистой оболочке тонкого кишечника телят, собак, крыс. Находят фермент в мозговой ткани, в слюне человека, в лейкоцитах, в тонком кишечнике, а также в почвах. Особенно много β -галактозидазы образуют некоторые микроорганизмы (бактерии, дрожжи, грибы) [5].

β -Галактозидазы микроорганизмов условно подразделяются на внутриклеточные и внеклеточные. Продуцентами внутриклеточной β -галактозидазы являются дрожжи и бактерии, внеклеточной – плесени. Внеклеточная β -галактозидаза плесеней – гликопротеин молекулярной массы 115–176 кДа, субъединичной структуры не имеет, не активируется металлами, оптимальный pH действия 3,6–5,3. Внеклеточная β -галактозидаза более стабильна, но менее активна, чем внутриклеточная β -галактозидаза дрожжей и бактерий [3].

Бактериальные β -галактозидазы – самая многочисленная группа ферментов среди гликозил-гидролаз с установленной первичной структурой, депонированной в электронных базах данных. Большую часть этих ферментов относят к семействам 2 и 42. Семейству 2 принадлежит также β -галактозидаза *Escherichia coli*, в активном центре которой присутствуют катионы магния [6].

Продуцентами β -галактозидазы являются лактозосбраживающие дрожжи видов: *Kluyveromyces marxianus*; *Kluyveromyces fragilis*; *Cryptococcus laurentii*; *Sporobolomyces singularis*; *Sterigmatomyces elviae*; *Rhodotorula minuta*; *Bullera singularis*; *Aureobasidium pullulans*; *Candida pseudotropicalis*, *Torulopsis versatilis* и ряд других.

У грибковых β -галактозидаз обычно кислый pH-оптимум в диапазоне 2,5–5,4, таким образом они являются самыми эффективными для гидролиза лактозы, существующей в кислых продуктах, такой как сыворотка. Грибковые β -галактозидазы – термостойкие ферменты, однако, они более чувствительны к продуктам ингибирования, главным образом, галактозы [7].

Практически все промышленные ферменты лактазы продуцируются дрожжами рода *Kluyveromyces* или плесенями рода *Aspergillus*. Основные отличия их заключаются в физико-химических и каталитических свойствах (таблица 1) [8, 9].

Таблица

Технические β -галактозидазы и их свойства

Происхождение	Оптимум pH	pH-диапазон стабильности	Температурный оптимум, °C	Активаторы
<i>Aspergillus niger</i>	3–4	2,5–8,0	55–60	
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	3,5–8,0	50–60	
<i>Kluyveroyces lactis</i>	6,9–7,3	6,0–7,0	35	Mn, K
<i>Kluyveroyces fragili</i>	6,6	5,8–7,5	37	Mn, K

β -галактозидазы, признанные безвредными (GRAS) или имеющие эквивалентный статус, которые могут быть использованы в технологическом производстве, представляют собой препараты из *A. oryzae*, *A. niger*, *K. lactis*, *K. fragilis* и *B. circulans*.

Кристаллическая структура β -галактозидазы, полученной с использованием *A. oryzae* была опубликована недавно: это мономерный многодоменный фермент с Glu 200 в качестве кислотно-основного катализатора и Glu 298 в качестве нуклеофила. Его молекулярная масса 113 кДа [10].

Препарат β -галактозидазы, полученный с использованием *A. Niger*, был экспрессирован в дрожжах и очищен иммобилизованной аффинной хроматографией на основе металл-иона для проведения экспериментов по кристаллизации. Мономерный гликозилированный фермент имеет молекулярную массу 129 кДа [11].

β -галактозидаза, продуцируемая *K. Lactis*, – тетрамер, сборка димеров с более высокой расчетной энергией диссоциации для димеров, чем для его сборки, которая может объяснить, что равновесие может существовать в растворе между его димерной и тетрамерной формами. Два активных центра расположены на границе раздела внутри каждого димера в узком канале шириной 10 Å, что делает каталитические карманы доступными для растворителя. Молекулярная масса каждой субъединицы составляет [12].

β -галактозидаза, продуцируемая *K. Fragilis*, – гомодимер, каждая субъединица имеет молекулярную массу 123 кДа. Другие авторы сообщали о тетрамерной структуре, но образование тетрамера является необязательным для катализа [13].

β -галактозидаза, продуцируемая *V. Circulans*, включает несколько изоферментов, которые были выделены в β -галактозидазные экстракты из *V. Circulans*. В самом последнем исследовании были выделены четыре изофермента, обозначенные как β -галА, β -галВ, β -галС и β -галD, их молекулярные массы составляют 206, 181, 164 и 112 кДа соответственно [14]. Эти изоферменты отличаются некоторыми свойствами, такими как удельная активность и стабильность, но их изоляция представляет собой высокую стоимость, которая не может быть оправдана для технологических целей [15].

Как было выше сказано, промышленные β -галактозидазы имеют оптимальную температуру от 37 °С до 45 °С, поэтому они не являются эффективными для проведения гидролиза лактозы при низких температурах. Фермент β -галактозидазы, высокоэффективный к гидролизу лактозы при низкой температуре, позволит оптимизировать текущий процесс для производства низколактозного молока и будет иметь важное значение для разработки нового процесса и, возможно, новых молочных продуктов.

В этой связи представляется интересным исследование антарктических микроорганизмов в качестве производителей β -галактозидазы [16]. Были исследованы 1094 микроорганизма (бактерии, 960 33 дрожжей и 101 мицелиарных грибов), ранее выделенные из различных мест окружающей среды Антарктики на наличие β -галактозидазной активности на 5 °С, 10 °С и 15 °С с использованием пластин с X-Gal (молекуле аналогичной лактозе). Результаты показывают, что 15 бактерий, 3 дрожжей и 15 мицелиарных грибов показали наиболее интенсивную галактозидазную активность при анализируемых температурах. В настоящее время эти штаммы характеризуются подробно. В заключение отметим, что микроорганизмы из антарктической окружающей среды имеют интересный потенциал в качестве производителей холодноактивных β -галактозидаз. В будущем эти ферменты могут быть полезны при гидролизе лактозы в молоке при низких температурах [16].

В исследованиях [17] было выявлено, что гидролиз с использованием иммобилизованного фермента был более эффективным, чем с использованием свободного фермента. Бета-галактозидаза была ковалентно иммобилизована на модифицированную мембрану из полипропилена, с использованием глутаральдегида. Оптимальные условия для гидролиза лактозы (4,7 %), с иммобилизованной бета-галактозидазой в периодическом процессе были определены: ферментативная активность 13,6; 40 °С; рН 6,8 и 10 ч. Было установлено, что гидролиз лактозы с помощью иммобилизованного фермента в 1,6 раза эффективнее, чем гидролиз лактозы свободного фермента. Было установлено, что стабильность иммобилизованного фермента была в 2 раза выше по сравнению со стабильностью свободного фермента. Полученная обездвиженная система бета-галактозидазы полипропилен мембрана применяется для производства глюкозо-галактозных сиропов из сыворотки. Были исследованы характеристики сыворотки и различные предварительные обработки. Затем был выполнен гидролиз лактозы в биореакторе с иммобилизованным ферментом на скрученной спиралью мембране. Были определены оптимальная поверхность мембраны и оптимального расхода сыворотки на основе мембранного модуля, соответственно, 100 см (2) и 1,0 мл мин (–1). После 10 ч, степень гидролиза лактозы возросла до 91 %. Была исследована надежность в работе. После 20-го цикла выход биореактора составила 69,7 % [17].

Существуют исследования высокоэффективных метагеном β -галактозидазы для гидролиза лактозы в молочной промышленности. Шесть новых метагеном бета-галактозидаз (M1-M6) были найдены с улучшенной производительностью гидролиза лактозы в молоке, непосредственно по сравнению с промышленной бета-галактозидазой из *Kluyveromyces Lactis* (GODO-YNL2). Лучший метагеном под названием M1 был получен рекомбинативно из штамма кишечной палочки BL21(DE3) в биореакторе (объемом 35 л), в результате чего общая активность бета-галактозидазы M1 около 1100 КАТ (0NPGal, 37 °C) L-1. Так как молоко является чувствительной и сложной средой в молочной промышленности, оно должно быть обработано при температуре 5–10 °C. Таким образом, β -галактозидаза M1 была испытана на 8 °C в молоке и обладала хорошей стабильностью [18].

Таким образом, фермент β -галактозидазу в основном применяют для гидролиза лактозы в молочной промышленности [19]. Процесс ферментативного гидролиза лактозы молочного сырья может быть использован для получения следующих групп продуктов и препаратов:

- низколактозные и делактозированные продукты цельномолочного производства;
- глюкозо-галактозные сиропы как сахарозаменители для кисломолочных продуктов, мороженого, кондитерского производства;
- углеводные модули на основе лактозосодержащего сырья полифункционального назначения;
- высокоочищенные препараты галактозы.

Очевидно, что именно пищевая и, в меньшей мере, фармацевтическая промышленность и сельское хозяйство являются основными потребителями препаратов β -галактозидазы различной степени очистки во все возрастающих объемах. Это, в свою очередь, объясняет непреходящий интерес исследователей к этому достаточно изученному ферменту.

Литература

1. Бедных Б. С. Молочные продукты для питания детей с лактазной недостаточностью / Б. С. Бедных, Р. И. Раманаускас, И. А. Евдокимов, Т. А. Антипова // Молочная промышленность. 2015. № 4. С. 70.
2. Трушина Ю. В. «Применение фермента «Lactafree» при получении низколактозных продуктов // Молочная промышленность. 2014. № 11. С. 70.
3. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase / P. S. Panesar et al. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2006. P. 530–543.
4. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance / Douglas H. Juers, Brian W. Matthews, Reuben E. Huber // 2012. № 21(12). Dec. P. 1792–1807.
5. Гаврилов В. Г. Разработка и исследование технологии производства безлактозного молока: дис. ... канд. техн. наук. Кемерово, 2014. С. 116.
6. Qayyum Husain. β -Galactosidases and their potential applications / a review Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University, Aligarh. India Critical Reviews in Biotechnology, 2010. P. 41–62.
7. Залашко М. В. Способность лактозосбраживающих дрожжей к образованию этанола / М. В. Залашко, А. Н. Капич, А. Н. Картель, М. М. Грушенко // Прикладная биохимия и микробиология. 1998. № 2. С. 164–167.
8. Михнева В. А., Евдокимов И. А., Сомов В. С. Гидролизаты лактозы для молочных продуктов с фруктово-ягодными наполнителям // Молочная промышленность. 2012. № 7. С. 58–59.
9. Тёпел А. Химия и физика молока / пер. с нем.; под ред. С. А. Фильчаковой. СПб.: Профессия, 2012. 832 с.
10. Maksimainen M. M. The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* / M. M. Maksimainen, A. Lampio, M. Mertanen, O. Turunen, J. Rouvinen // International Journal of Biological Macromolecules. 2013 P. 109–115.
11. O'Connell S., Walsh G. A novel acid-stable, acid-active β -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance // Applied Microbiology and Biotechnology. 2010. P. 517–524.
12. Pereira-Rodriguez A. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase / A. Pereira-Rodriguez, R. Fernandez-Leiro, M. I. Gonzalez-Siso, M. E. Cerdan, M. Becerra, J. Sanz-Aparicio // Journal of Structural Biology. 2012. P. 392–401.

13. Yoshida E. Role of a Pa14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus* / E. Yoshida, M. Hidaka, S. Fushinobu, T. Koyanagi, I. H. Minam, H. Tamaki, M. Kitaoka, T. Katayama, H. Kumagai // *Biochemical Journal*. 2010. P. 39–49.
14. Song J. Cloning and expression of a β -galactosidase gene of *Bacillus circulans*. *Bioscience* / J. Song, H. Imanaka, K. Imamura, M. Minoda, T. Katase, Y. Hoshi, S. Yamaguchi, K. Nakanishi // *Biotechnology and Biochemistry*. 2011. P. 1194–1197.
15. Warmerdam A. Galacto-oligosaccharide production with immobilized β -galactosidase in a packedbed reactor vs. free β -galactosidase in a batch reactor / A. Warmerdam, E. Benjamins, T. F. De Leeuw, T. A. Broekhuis, R. M. Boom, A. E. M. Janssen // *Food and Bioproducts Processing*. 2014. P. 383–392.
16. β -Galactosidase activity in microorganisms isolated from Antarctic environments / Jose Palacios, Carolina Faúndez, Rodrigo Pérez, Marcelo Montoya, Paris Lavin, Inmaculada Vaca, Claudio Martínez, Renato Chávez // *New Biotechnology*. 2016. P. 60.
17. Hydrolysis of whey lactose by immobilized beta-galactosidase in a bioreactor with a spirally wound membrane / N. Vasileva, Y. Ivanov, S. Damyanova, I. Kostova, T. Godjevargova // *International journal of biological macromolecules*. 2016. P. 65.
18. Novel high-performance metagenome beta-galactosidases for lactose hydrolysis in the dairy industry / S. Erich, B. Kuschel, T. Schwarz, J. Ewert, N. Bohmer, F. Niehaus, J. Eck, S. Lutz-Wahl; T. Stressler; L. Fischer // *Journal of biotechnology*. 2015. P. 76.
19. Калинина Е. Д., Коваленко А. В. Исследование и установление технологических параметров проведения гидролиза лактозы молока // *Восточно-Европейский журнал передовых технологий*. 2014. № 10. С. 26–31.