

# СИНТЕЗ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ДРОЖЖЕВЫМИ ГРИБАМИ *CRYPTOCOCCUS FLAVESCENS*

С.А. Кулиш, Л.И. Сапунова, Е.А. Шляхотко

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, [leonida@mbio.bas-net.by](mailto:leonida@mbio.bas-net.by)

$\beta$ -Галактозидаза (лактаза,  $\beta$ -галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.23) катализирует реакции гидролиза и трансгалактозилирования лактозы (молочного сахара). Фермент является основой современных технологий производства безлактозных молочных продуктов, а также глюкозо-галактозных сиропов, галактоолигосахаридов, кормов и кормовых добавок из молочной сыворотки [1–4].

Синтез бета-галактозидазы является широко распространенным свойством микроорганизмов различных таксономических групп, включая дрожжевые грибы родов *Brettanomyces*, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluveromyces*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharopolyspora*, *Sirobasidium*, *Sporobolomyces*, *Sterigmatomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon* и др. [1–3, 5–8]. Однако дрожжи, в отличие от грибов и бактерий, в качестве коммерческих продуцентов используются крайне редко: препараты бета-галактозидазы с использованием различных штаммов рода *Kluveromyces* выпускают Novozymes (Дания), DSM Food Specialties (Нидерланды), Chr. Hansen A/S (Германия), GODO Shusei Company Limited (Япония), Enzyme Development Corporation (США). В Японии с 90-х годов 20 века в технологиях производства продуктов питания, в том числе галактоолигосахаридов, до сих пор используют бета-галактозидазу *Cryptococcus laurentii* [9–11].

Ранее нами получен штамм дрожжевого гриба *Cryptococcus flavescens* 1, который продуцирует комплекс биологически активных веществ, представленных бета-галактозидазой, олиго- и полисахаридами [12]. Путем его многоступенчатой адаптации к лактозе селективирован новый штамм *C. flavescens* 1-ЛГ-3 с повышенным уровнем продукции внеклеточных полисахаридов [13].

Цель настоящей работы – сравнительная оценка бета-галактозидазной активности штаммов 1 и 1-ЛГ-3 дрожжевого гриба *Cryptococcus flavescens*, растущих в среде с лактозой.

Штаммы *C. flavescens* 1 и *C. flavescens* 1-ЛГ-3 депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси.

В лабораторных условиях дрожжевые культуры поддерживали методом периодических пересевов на агаризованную питательную среду Лурия-Бертани с лактозой (2,0 % – для *C. flavescens* 1; 10,0 % – для *C. flavescens* 1-ЛГ-3) при температуре +4...+6 °С.

При изучении синтеза бета-галактозидазы дрожжевые культуры выращивали глужбинным способом в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды (в %: лактоза – 2,0; пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5;  $K_2HPO_4$  – 0,3;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,05; исходный рН – 6,8) на качалке (150–180 об/мин) при температуре 24–26 °С. Пробы отбирали в течение 3 сут через каждые 12 ч.

В качестве посевного материала использовали суспензию дрожжей ( $ОП_{600} = 0,2 \pm 0,02$ ), полученной при 24–26 °С в течение 16 ч в жидкой питательной среде указанного выше состава, в количестве 4 об. %.

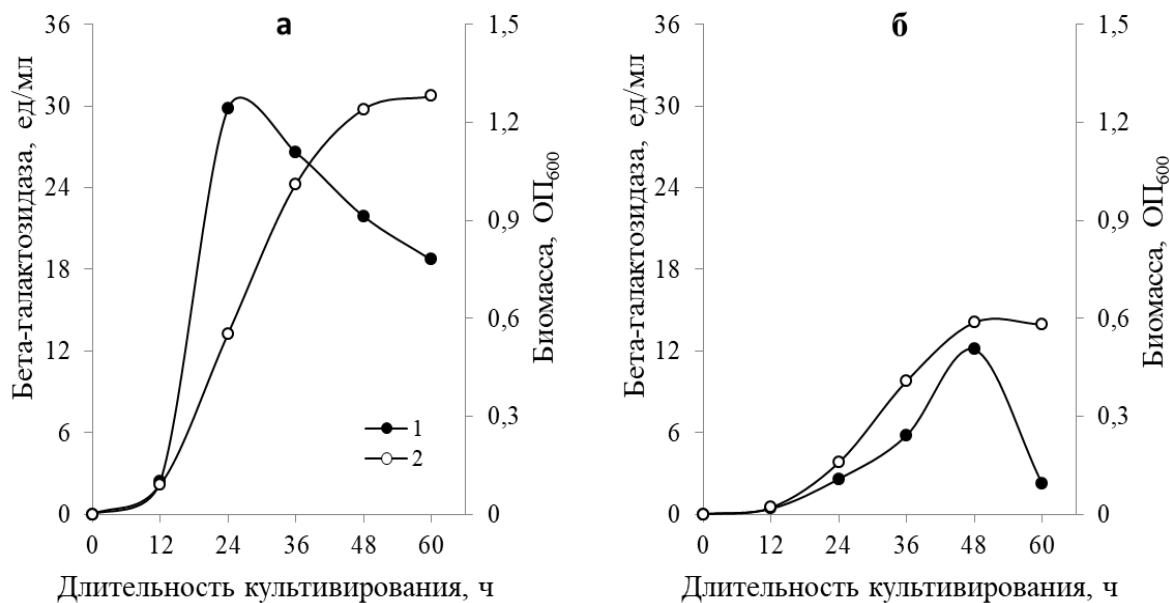
Накопление биомассы дрожжами оценивали спектрофотометрически по оптической плотности культуральной жидкости, измеряемой в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 мм при длине волны  $\lambda = 600$  ( $ОП_{600}$ ).

В клетках после их отделения от культуральной жидкости центрифугированием (8000 об/мин, 20 мин), а также в бесклеточном фильтрате определяли активность бета-галактозидазы согласно [14] и выражали в ед/мл.

За единицу активности бета-галактозидазы принимали количество фермента, катализирующего гидролиз о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид с образованием 1 мкмоля 4-нитрофенола за 1 мин при 28°C и pH 7,0.

Результаты представлены средним значением показателей не менее двух опытов, выполненных в трех повторностях.

Согласно полученным данным, адаптированный к лактозе штамм *C. flavescens* 1-ЛГ-3 отличается от исходной культуры *C. flavescens* 1 менее продолжительной (на 6 ч) лаг-фазой роста и повышенным в 2,1 раза уровнем накопления биомассы. В условиях эксперимента максимум роста обоих штаммов отмечается на 48 ч их культивирования (рисунок).



1 – бета-галактозидаза, ед/мл; 2 – биомасса, ОП<sub>600</sub>

**Рисунок – Динамика роста дрожжевых грибов *C. flavescens* 1-ЛГ-3 (а) и *C. flavescens* 1 (б) и синтеза клеточносвязанной бета-галактозидазы в среде с лактозой**

Активный синтез клеточносвязанной бета-галактозидазы в условиях индукции приходится на логарифмическую фазу развития исследуемых дрожжевых культур. Однако максимум продукции фермента у адаптированного штамма *C. flavescens* 1-ЛГ-3 наблюдается через 24 ч, у исходного штамма *C. flavescens* 1 – через 48 ч от начала культивирования. При этом в бесклеточной культуральной жидкости активность бета-галактозидазы не обнаруживается, что указывает на отсутствие у обеих микробных культур секретируемой формы ферментного белка. Синтезом клеточносвязанной бета-галактозидазы обусловлено также свойство утилизировать лактозу и у других представителей рода *Cryptococcus* [1, 5, 6, 9, 11, 15–18].

Таким образом, адаптированный к лактозе штамм *C. flavescens* 1-ЛГ-3 превосходит исходный штамм *C. flavescens* 1 повышенным синтезом не только полисахаридов (в 1,5 раза), но и бета-галактозидазы (в 2,5 раза) при существенном сокращении длительности процесса. Уточнение локализации бета-галактозидазы в клетке, оптимизация условий получения фермента, определение его субстратной специфичности и основных физико-химических свойств послужат основанием для разработки биотехнологий получения новых кормовых продуктов на основе штамма *C. flavescens* 1-ЛГ-3 и отходов переработки цельного молока – молочной сыворотки. Опыт создания кормовых добавок, содержащих

живые культуры дрожжей и биологически активные продукты их метаболизма, в Институте микробиологии НАН Беларуси имеется.

#### Список использованных источников

1. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey / M. R. Kosseva [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2009. – Vol. 45. – P. 437–447.
2. Panesar, P. S. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries / P. S. Panesar, S. Kumari, R. Panesar // *Enzyme Res.* – 2010. – Vol. 2010, doi:10.4061/2010/473137.
3. Torres, D. P. M. Galactooligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics / D. P. M. Torres [et al.] // *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* – 2010. – Vol. 9. – P. 438–452.
4. Lamsal, B. P. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides / B. P. Lamsal // *J. Sci. Food Agric.* – 2012. – Vol. 92, № 10. – P. 2020–2028.
5. Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4 / K. Ohtsuka [et al.] // *J. Ferment. Bioeng.* – 1990. – Vol. 70. – P. 301–307.
6. 4'-Galactosyllactose production in jar fermentor by *Cryptococcus laurentii* OKN-4 / O. Ozawa [et al.] // *J. Ferment. Bioeng.* – 1991. – Vol. 72. – P. 309–310.
7. Husain, Q. B-Galactosidase and their potential applications: a review / Q. Husain // *Critic. Rev. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 30, № 1. – P. 41–62.
8. Park, A. R. Galacto-oligosaccharide production using microbial beta-galactosidase: current state and perspectives / A. R. Park, D. K. Oh // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 85, No. 5. – P. 1279–1286.
9. Novel beta-galactosidase and production thereof / JPS62111685, publ. 22.05.1987.
10. Hartemink, R. *In vitro* cariogenicity of trans-galactosyl-oligosaccharides / R. Hartemink [et al.] // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1997. – Vol. 25, № 1. – P. 38–42.
11. Ke, Q. Toxicological evaluation of  $\beta$ -Galactosidase enzyme produced by *Papiliotrema terrestris* / Q. Ke, P. Fulmer, A. Mizutani // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 92. – P. 213–219.
12. Штамм дрожжей *Cryptococcus flavescens* БИМ У-228-Д – продуцент комплекса биологически активных веществ // Пат. ВУ 19638, опубл. 28.02.2014.
13. Кулиш, С. А. Селекция штамма дрожжей *Cryptococcus flavescens* – продуцента внеклеточных полисахаридов / С. А. Кулиш, Л. И. Сапунова // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. Докл. X Междунар. науч. конф., Минск, 5–9 июня 2017 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.].* – Минск: Беларуская навука, 2017. – С. 162–164.
14. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. – М.: Мир. 1976. – 440 с.
15. Enzymatic profile of *Cryptococcus neoformans* strains by using the API-ZYM system / R. Leone [et al.] // *Rev. Iberoam. Micol.* – 1998. – Vol. 15, No. 3. – P. 136–140.
16. Fischer, C. Combination of two  $\beta$ -galactosidases during the synthesis of galactooligosaccharides may enhance yield and structural diversity // C. Fischer, T. Kleinschmidt // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2018. – Vol. 506, No. 1. – P. 211–215.
17. Method for preparing GOS having reduced allergenicity / Pat. WO2019002304, publ. 03.01.2019.
18. Production of galactooligosaccharide / Pat. JHS62130695, publ. 12.06.1987.