

## ХАРАКТЕРИСТИКА $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ГР+ И ГР- БАКТЕРИЙ

Одной из устойчивых тенденций развития мирового молочного рынка является получение безлактозного молока и молочных продуктов в виду непереносимости лактозы у 50–90% населения стран Азии, Африки, Южной Америки. Для получения безлактозной продукции необходимы ферменты  $\beta$ -галактозидазы, которые в РБ не производятся [1]. Для получения  $\beta$ -галактозидаз могут использоваться различные лактозоутилизирующие микроорганизмы, прежде всего грибы, в виду выработки ими экзоферментов, что облегчает их выделение. Однако активность данных ферментов невысока и для ее увеличения требуется наращивание большой биомассы клеток [2].

Цель работы – выбор способов получения  $\beta$ -галактозидаз из Гр+ и Гр– бактерий и сравнение их активности.

Объектом исследования служила творожная молочная сыворотка. В качестве продуцентов фермента  $\beta$ -галактозидазы использовали Гр+ бактерии *B. subtilis* и Гр– бактерии *E. coli* из коллекции кафедры БТ БГТУ. Клетки культивировали на подготовленной молочной сыворотке. Для этого проводили осаждение белков 4%  $\text{CaCl}_2$ , центрифугирование при 6000 об/мин, 5 мин, пастеризацию сыворотки при 70°C 30 мин. В качестве критериев выбора продуцентов служили 3 показателя: 1) максимальная удельная скорость роста, 2) максимальная получаемая биомасса клеток, 3) максимальная активность  $\beta$ -галактозидаз. Биомассу клеток определяли по оптической плотности (D) светорассеивания клеток при 600 нм. Удельную скорость роста клеток находили по формуле:

$$\mu = d(\ln D)/dt$$

Для контроля активности  $\beta$ -галактозидаз использовали рефрактометрический метод. Удельную активность (A)  $\beta$ -галактозидазы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta n}{\Delta t m_{\text{белка}}},$$

где  $\Delta n$  – изменение показателя преломления;  $\Delta t$  – время, за которое произошло изменение показателя преломления;  $m_{\text{белка}}$  – масса белка.

На первом этапе работы проводили анализ кинетики роста клеток Гр+ и Гр- бактерий на подготовленной молочной сыворотке. В результате чего получили, что оптическая плотность  $D_{600}^{max}$  у *E. coli* больше, чем

у *B. subtilis*, что свидетельствует о лучшей утилизации лактозы и накоплении биомассы клетками *E. coli*. Однако, начальная удельная скорость роста биомассы клеток у них была в 2–3 раза ниже, чем у *B. subtilis*. Следующим этапом было получение внутриклеточных ферментов. Для их выделения использовали метод прото- и сферопластирования клеток. В случае Гр<sup>+</sup> бактерий получение протопластов с помощью лизоцима 1 мг/мл и выделение из них ферментов не вызывало сложности. Контроль этапа протопластирования проводился с помощью спектрофотометрии.

В случае сферопластирования Гр<sup>-</sup> бактерий *E. coli* наряду с лизоцимом требуется добавление ЭДТА для разрыхления клеточной стенки, в противном случае лизоцим слабо действует на клетки. Присутствие ЭДТА увеличивает скорость сферопластирования Гр<sup>-</sup> клеток в 2 раза. В таблице приведены значения показателей, характеризующих эффективность получения β-галактозидаз из Гр<sup>+</sup> и Гр<sup>-</sup> бактерий.

**Таблица – Характеристика показателей для Гр<sup>+</sup> и Гр<sup>-</sup> бактерий**

Показатели	Гр <sup>+</sup>	Гр <sup>-</sup>
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E.coli</i>
Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	0,30	0,12
(D <sub>600</sub> ) <sub>max</sub>	0,379	1,632
А, ед/мг	11, 0	5,6

Из таблицы видно, что несмотря на высокую биомассу клеток *E. coli*, активность ее фермента ниже, чем у микроорганизмов *B. subtilis*. Это связано с инактивацией ЭДТА β-галактозидазы, являющейся металло-ферментом.

В результате проведенной работы установлено, что удельная активность фермента β-галактозидазы, выделенного из клеток *B. subtilis* (Гр<sup>+</sup>) выше, чем удельная активность фермента β-галактозидазы, выделенного из клеток *E. coli* (Гр<sup>-</sup>). Также для клеток *B. subtilis* было обнаружено явление генетической адаптации и увеличение выхода биомассы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Храмцов А.Г. Феномен молочной сыворотки. – СПб.: Профессия. – 2011. – 804 с.
2. Остроумов Л.А., Гаврилов В.Г. Биотрансформация лактозы ферментными препаратами β-галактозидазы // Техника и технология пищевых производств. – 2013. – № 1. С 1–3.