

УДК 577.15.086.83

Н.В.Гриц, доцент;

А.С.Горелышев, ст.н.сотр.

**ДРОЖЖЕВАЯ β -ГАЛАКТОЗИДАЗА: ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА,
ИММОБИЛИЗАЦИЯ**

The enzyme β -galactosidase was obtained from yeast cells *Torulopsis sphaerica* and was investigated in vitro. Enzyme was immobilised in polyacrilamyd gel. The parametres of hydrolysis the lactose of milk serum by immobilised enzyme were found out and the influence of lactose prehydrolysis on ethanol production by *T.sphaerica* cell was investigated.

Ранее было показано [1], что выделенные нами из кисломолочных продуктов штаммы, отнесенные к роду *Torulopsis*, хорошо развиваются на средах, где лактоза служит единственным источником углеродного питания и энергии. В предварительных экспериментах была исследована способность трех из этих штаммов (SL-2, SL-3, SL-4) синтезировать фермент β -галактозидазу (β -D-галактозид-галактогидролаза, КФ 3.21.23) при росте в депротеинизированной молочной сыворотке с содержанием лактозы 3,2% и при pH 5,1. Максимальное количество β -галактозидазы накапливалось дрожжевыми клетками на 24 ч роста и было приблизительно одинаково для всех исследованных штаммов. В культуральной жидкости фермент отсутствовал.

Для получения препарата β -галактозидазы, накапливаемой внутри клеток дрожжей, последние выращивали на депротеинизированной молочной сыворотке с содержанием лактозы 3,2% в ферментере при оптимальном режиме аэрации (1,5 объема воздуха на 1 объем среды и при 350 оборотах мешалки в 1 мин), температуре 30°C, pH среды, равным 5,0, в течение 72 часов. С целью максимальной экстракции фермента из дрожжей были использованы различные подходы к разрушению клеток: механическое воздействие, ультразвуковое, чередующееся замораживание-оттаивание, а также различные экстракционные вещества (табл.1).

Наибольший выход фермента из дрожжевых клеток (общая активность более 25000 ед/мл) достигался при добавлении к размороженным клеткам смеси хлороформ-SDS и последующим растиранием с окисью алюминия. Такой показатель выхода фермента позволял приступить к его очистке от примесей.

Табл.1. Ферментативная активность препаратов β -галактозидазы, выделенных из дрожжевых штаммов с использованием различных методов разрушения клеток

Способ разрушения	Общая активность β -галактозидазы клеток (ед/мл) в экстрактах клеток штаммов		
	SL-2	SL-3	SL-4
Замораживание-оттаивание и последующее растирание с Al_2O_3	10270	10200	9470
Замораживание-оттаивание и последующая обработка ультразвуком	5340	6210	5200
Экстракция толуолом	3060	1950	2850
Экстракция смесью хлороформ-додецилсульфат натрия (SDS)	2870	2840	2800

В качестве исходного материала для очистки использовали экстракт дрожжей, полученный описанным выше способом, с общей активностью β -галактозидазы 28420 ед/мл (табл.2). Фракция, полученная между 40 и 60% от полного насыщения $(NH_4)_2SO_4$, характеризовалась практически полным сохранением исходной β -галактозидазной активности. Удельная же активность этой фракции была в 2 раза выше, чем в исходном экстракте. Данная фракция, содержащая β -галактозидазу, была освобождена от сульфата аммония 30 ч диализом против 0,2 М буфера НТМ. В результате произведенной предварительной очистки препарата удельная активность β -галактозидазы возросла в 3,7 раза и составила 48,5 ед/мл белка. Выход по активности составил 85,4%.

Полученный после диализа ферментный препарат был расфасован по 0,1 мл в эпендорфовские пробирки и оставлен на хранение при температуре 5°C. Сохранившие исходную активность фракции были использованы для изучения свойств выделенной β -галактозидазы. В частности, была изучена степень гидролиза лактозы под воздействием дрожжевой β -галактозидазы в зависимости от активной кислотности среды, температуры и концентрации фермента в инкубационной смеси.

Табл.2. Ферментативная активность препаратов β -галактозидазы в процессе очистки от примесей

Этапы очистки	Белок		Активность β -галактозидазы		Степень очистки	Выход β -галактозидазы	
	общий (мг)	мг/мл	общая, ед/мл	удельная, ед/мг		по активности, %	по белку, %
Исходный экстракт	2160	18,0	28420	13,2	-	100	100
Фракция 40-60% от полного насыщения сульфатом аммония	1050	72,5	27090	25,8	1,9	95,4	48,6
Диализ против 0,2 М буфера НТМ	500	25,0	24270	48,5	3,7	85,4	23,1

На рис.1 показана зависимость действия β -галактозидазы от изменения величины рН натрий-фосфатного буфера при использовании в качестве субстрата 3%-го раствора лактозы (температура 30°C, концентрация фермента - 10 ед/мл). Оптимум рН соответствует величине 7,0. Уменьшение или увеличение рН приводило к существенному снижению активности фермента (степень гидролиза при рН 6,0 и рН 7,5 составляла 69% от оптимальной).

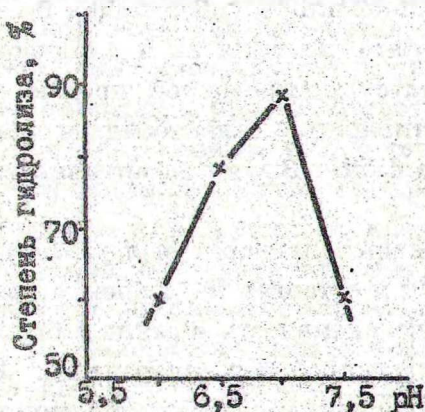


Рис.1. Влияние рН на степень гидролиза лактозы

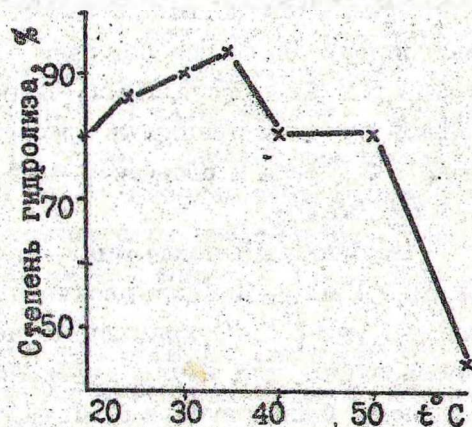


Рис.2. Влияние температуры на степень гидролиза лактозы

Термоллабильность фермента изучали при выдерживании раствора препарата в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН=7,0), содержащем

3% лактозы, в течение 45 мин при различных температурах. Как видно из рис.2, температурный оптимум фермента равен 30-35°C. Снижение температуры до 20°C и увеличение до 5°C приводило к уменьшению степени ферментативного гидролиза лактозы на 15%. При выдерживании фермента при 60°C в течение 45 мин происходила 50%-ная инактивация β -галактозидазы.

Гидролиз лактозы изучали и при добавлении различных количеств препарата дрожжевой β -галактозидазы к субстрату. Концентрация фермента изменялась от 1 до 10 ед/мл. Ферментсубстратная смесь инкубировалась 30 мин при разных температурах: 30°, 35°, 40° С. Как следует из рис.3, с увеличением количества β -галактозидазы до 5 ед/мл сохраняется прямая зависимость между степенью гидролиза и концентрацией фермента.

Следующую серию опытов проводили с целью изучения способности препарата β -галактозидазы к гидролизу лактозы в естественных субстратах и определения оптимальных условий действия фермента. В качестве субстрата использовали лактозу, содержащуюся в молочной сыворотке концентрацией 3,2%.

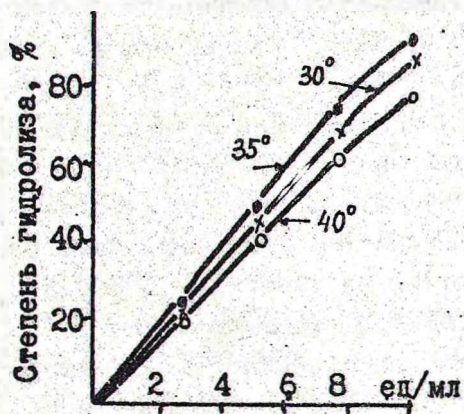


Рис.3. Влияние концентрации β -галактозы на степень гидролиза лактозы

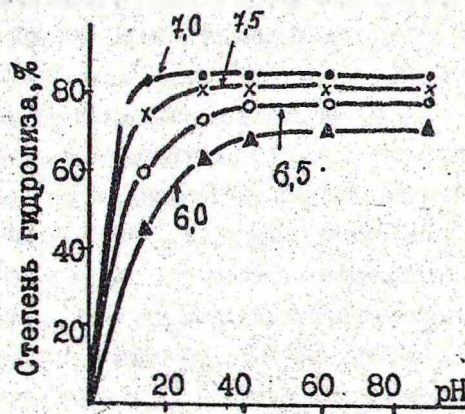


Рис.4. Влияние pH сыворотки на степень гидролиза сыворотки β -галактозидазой

Опыты по влиянию pH сыворотки на гидролиз лактозы в молочной сыворотке были проведены при 30°C и концентрации β -галактозидазы 10 ед/мл. В сыворотке путем предварительного добавления 0,1 н раствора NaOH создавалась различная кислотность. Выше было показано, что оптимальная для действия фермента величина pH в водных растворах лактозы составляла 7,0. Как видно из рис.4, препарат β -галактозидазы наиболее эффективно гидролизует лактозу в

сыворотке также при рН 7,0. Однако при других рН также имел место достаточно интенсивный гидролиз лактозы (например, степень гидролиза при рН 6,0 составляла 87% от оптимальной). Наиболее интенсивно гидролиз лактозы происходил в первые 15 мин с момента внесения фермента в сыворотку, а за 2 ч гидролизу подвергалось 94-96% лактозы.

Приведенные данные о влиянии на кинетику гидролиза различных факторов показывают, что к числу таковых, от которых зависит процесс гидролиза лактозы в молочной сыворотке дрожжевой β -галактозидазой, относятся активная кислотность среды, температурный режим, концентрация фермента и время выдерживания фермента в инкубационной смеси. При выборе оптимальных параметров гидролиза лактозы в молочной сыворотке следует учитывать, кроме того, необходимость предупреждения развития микрофлоры. В связи с этим целесообразно вносить фермент в пастеризованную сыворотку.

Таким образом, наиболее рационально можно использовать полученную нами из дрожжей рода *Torulopsis* β -галактозидазу для гидролиза лактозы в пастеризованной сыворотке при 30°C и рН 7,0. Изменяя концентрацию фермента или продолжительность гидролиза, можно достичь максимальной степени расщепления лактозы до глюкозы и галактозы в молочной сыворотке.

Вместе с тем применение растворимых ферментов в определенной степени ограничивается их обычными недостатками: однократной применимостью, относительно низкой стабильностью, трудностью регулирования глубины ферментативной реакции. Связанный же с полимерным носителем фермент можно легко отделять от образующегося конечного продукта, и он может быть применен многократно. Кроме того, иммобилизация повышает стабильность фермента. По имеющимся литературным данным, грибную β -галактозидазу удается иммобилизовать различными методами химического связывания или адсорбцией с использованием различных носителей. В частности, показано, что иммобилизованные в полиакриламидном геле ферменты вполне пригодны для проведения гидролиза олигосахаридов [2,3].

В связи с этим, была предпринята попытка получения иммобилизованной в полиакриламидном геле дрожжевой β -галактозидазы и выяснения возможностей использования гель-ферментного препарата для гидролиза лактозы в молочной сыворотке.

Коэффициент иммобилизации в наших экспериментах составил 0,35. Количество белка, включенного в полиакриламидный гель, составляло 3,6 мг на 1 г носителя. Удельная активность иммобилизованной β -галактозидазы составляла 60% от исходной удельной активности растворенного фермента.

Изучение кинетических параметров гидролиза лактозы и стабильности иммобилизованной β -галактозидазы, проведенное в термостатированной в режиме 30°C колонке, заполненной биокатализатором, показало, что активность биокатализатора сильно зависит от скорости подачи субстрата, а также от концентрации лактозы в сыворотке. Активность препарата практически не изменялась в течение недели. При хранении биокатализатора при 4°C в 0,01 М трис-HCl буфере pH 7,0, содержащем 0,01 М $MgCl_2$, он сохранял свою активность более месяца.

Таким образом, можно заключить, что выделенная из дрожжевого штамма *T.sphaerica* SL-2 и иммобилизованная в полиакриламидный гель β -галактозидаза пригодна для обработки молочной сыворотки в соответствующих режимах ферментации.

На заключительном этапе были проведены эксперименты по сбраживанию лактозы молочной сыворотки, подвергнутой ферментативному гидролизу, в этанол с использованием иммобилизованных клеток штамма *T.sphaerica* SL-2 в проточном реакторе непрерывного действия. Оказалось, что использование предварительно гидролизованной β -галактозидазой молочной сыворотки для непрерывного брожения иммобилизованными на синтетическом волокне клетками *T.sphaerica* SL-2 приводило к увеличению концентрации этанола в бражке. Эффективность накопления спирта дрожжевыми клетками при использовании в качестве субстрата концентрированной сыворотки, подвергнутой ферментативному гидролизу, составляет 5,2-6,3%, при этом максимальная степень конверсии углеводов достигла 97,5%. Максимальная объемная продуктивность колонного реактора по этанолу при оптимальной скорости разбавления 0,06 ч⁻¹ достигала 31 г/л·ч с начальным содержанием редуцирующих веществ в гидролизованной сыворотке 8%, при этом удельная продуктивность клеток по этанолу равнялась 0,821 г/г·ч.

Таким образом, изучение спиртообразующей способности иммобилизованных клеток в непрерывных условиях сбраживания углеводов показало, что увеличение концентрации моносахаров в молочной

сыворотке, подвергнутой ферментативному гидролизу, не приводит в конечном результате к существенному повышению продукции этанола. Подобное заключение подтверждается литературными данными [4-6], свидетельствующими о том, что большинство дрожжей, усваивающих лактозу, отличается низкой бродильной активностью по сравнению со спиртовыми расами, которые не способны усваивать лактозу без ее предварительного гидролиза. По-видимому, в данном случае более перспективным является использование в качестве продуцента этанола дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, способных выдерживать высокие концентрации спирта в среде и конвертирующих большее количество моносахаров в этанол в предварительно гидролизованной β -галактозидазой сыворотке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горелышев А.С., Гриц Н.В. Особенности процесса биоконверсии лактозы в этанол дрожжевыми штаммами, выделенными из молочных продуктов//Труды БТИ.-1993.-Сер.IV, Вып.I.- С. 30-34.
2. Кестнер А.И. и др. Получение и свойства иммобилизованной β -галактозидазы//Прикл. биохим. и микробиол.-1974.Т.10.-N 6.- С.851-855.
3. Паппель К.Э. и др. Гидролиз лактозы иммобилизованной β -галактозидазой//Прикл. биохим. и микробиол. -1976. -Т.12. N2.- С.217-220.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология.-М.:Изд-во МГУ, -1989. -294 с.
5. Устинов Б.А. и др. Технология получения этилового спирта из молочной сыворотки//Биотехнология.-1989.-Т.5.-N 2.-С.212-213.
6. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки.- М.:Агропромиздат, 1990. -192 с.

УДК 541.18.041.2;577.1

Н.А.Белясова, ст.преп.;
Е.Н.Кавцевич, студ.

МЕТОД НЕПРЕРЫВНОГО КОНТРОЛЯ ПРОЦЕССА АУТОФЛОКУЛЯЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ СУСПЕНЗИЙ

The method of continuous observation the autoflocculation process in cell suspension was developed. This method allow to