

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗ ДРОЖЖЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПОСЛЕ РАЗДЕЛЬНОГО И СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2024 г. М. А. Шпак¹ *, С. А. Рябцева¹, Г. С. Анисимов¹,
С. Н. Сазанова¹, А. А. Семченко¹, А. Б. Чеденова¹

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Северо-Кавказский федеральный университет”, Ставрополь, 355017 Россия

*e-mail: maria.bratsikhina@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.03.2024 г.

После доработки 22.04.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

Исследовано влияние механических и физических методов дезинтеграции клеток на активность бета-галактозидаз лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий после отдельного и совместного культивирования в пермеате молочной сыворотки. Установлено, что с точки зрения активности фермента наиболее эффективными являются обработка ультразвуком и тепловое воздействие, применение которых позволило получить бета-галактозидазу с существенно большей активностью (в 2–10 раз), чем при использовании перемешивания с кварцевым песком и стеклянными шариками. Совместное культивирование некоторых штаммов дрожжей и вязких штаммов молочнокислых бактерий позволило получить комбинированные ферментные препараты бета-галактозидаз с более высокой активностью, чем бета-галактозидазы отдельных продуцентов. Наибольшая лактазная активность (0.8–0.9 МЕ/см³) была получена при использовании тепловой обработки и вязкого штамма *Lactobacillus acidophilus* в комбинации с дрожжами *Kluyveromyces marxianus* Y-1338 и *Kluyveromyces lactis* Y-1333.

Ключевые слова: бета-галактозидаза, разрушение клеток, активность фермента, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, комбинированные ферментные препараты

DOI: 10.56304/S0234275824030037

Бета-галактозидазы (ЕС 3.2.1.23, CAS 9031-11-2) – группа ферментов, имеющих важное промышленное значение. Традиционное применение бета-галактозидаз основано на их способности гидролизовать лактозу, что позволяет получать молочные продукты для людей с лактазной недостаточностью, сладкие глюкозо-галактозные сиропы, питательные среды для микроорганизмов, предотвращать кристаллизацию лактозы в стуженных консервах [1, 2]. В последние годы все шире используют трансгликозилирующую активность бета-галактозидаз, благодаря которой можно создавать гликановые блоки важнейших гликоконъюгатов для выяснения их биологических функций, улучшать растворимость, стабильность и биологическую активность веществ, применяемых в пищевой, медицинской и косметической промыш-

ленности [3, 4]. В частности, бета-галактозидазы могут катализировать реакции превращения лактозы в лактулозу, галактоолигосахариды и другие пребиотики [4, 5].

Свойства бета-галактозидаз влияют на скорость и соотношение реакций гидролиза и трансгликозилирования, а также на состав, структуру и физиологические свойства получаемых олигосахаридов [6, 7]. Для промышленного производства ферментных препаратов бета-галактозидаз обычно используют признанные безопасными продуценты – дрожжи рода *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. marxianus*), плесени *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. niger*), бактерии *Bacillus circulans* [7, 8]. К наиболее изученным и широко применяемым в биотехнологии продуцентам относится *K. lactis* [9]. Способностью гидролизовать лактозу обладают также молочнокислые микроорганизмы. В последние годы проводятся исследования, направленные на получение и повышение активности их бета-галактозидаз [10–12].

Список сокращений: КП – кварцевый песок, МЕ – международные единицы, СШ – стеклянные шарики, ТО – тепловая обработка, УЗ – ультразвуковая обработка, УФ – ультрафильтрация.

Так как дрожжевые и бактериальные бета-галактозидазы являются ферментами внутриклеточной локализации, процесс их получения должен включать стадию частичного или полного разрушения клеток продуцентов. Для этого могут быть использованы различные механические, физические, химические и биологические методы. Анализ литературы показал, что имеющиеся данные об эффективности применения разных методов разрушения клеток дрожжей и молочнокислых бактерий для получения бета-галактозидаз, противоречивы и трудно сопоставимы [13–21].

В настоящее время в России применяют импортные препараты бета-галактозидаз, основные проблемы использования которых связаны с высокой стоимостью и угрозой санкционного давления. С точки зрения обеспечения технологического суверенитета актуальными являются работы по получению активных ферментов этого класса с использованием отечественных коллекционных штаммов продуцентов и доступных сырьевых источников. Следует отметить, что лактозосбраживающие дрожжи рода *Kluyveromyces* хорошо изучены российскими учеными и продолжают оставаться в центре их внимания [22, 23]. В недавно опубликованной работе показано, что некоторые штаммы *K. marxianus* превосходили *K. lactis* по скорости ферментации растворов лактозы, а межштаммовая гибридизация дрожжей является перспективным методом повышения активности ферментов [24].

Учитывая симбиотический характер взаимодействия в молочных средах дрожжей и молочнокислых бактерий и особенности их метаболизма [25], можно предположить, что совместное культивирование и последующее разрушение клеток этих микроорганизмов позволит получить комбинированные препараты бета-галактозидаз, обладающие повышенной активностью. Однако публикаций, посвященных этому направлению не обнаружено. Целью данной работы было исследование влияния механических и физических методов разрушения клеток на активность бета-галактозидаз лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий после раздельного и совместного культивирования в пермеате молочной сыворотки.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве продуцентов бета-галактозидаз использовали штаммы лактозосбраживающих дрожжей *Kluyveromyces lactis* ВКМ Y-1333 и Y-1339, *Kluyveromyces marxianus* ВКМ Y-459 и Y-1338 (Всемирная коллекция микроорганизмов, г. Пущино), а также молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus* (концентрат вязких и невязких рас ацидофильной палочки БК-Углич-АВ, оптимальная температура 37–38°C) и *Streptococcus thermophilus* (концентрат вязких и невязких рас термофиль-

ного стрептококка БК-Углич-ТВ, оптимальная температура 40–45°C) производства ФГУП “Экспериментальная биофабрика” Россельхозакадемии, г. Углич. Для получения среды культивирования продуцентов использовали сыровоточный продукт сухой (пермеат) (ПАО Молочный комбинат “Воронежский” филиал “Калачеевский сырзавод”) с массовой долей влаги 1.38%, белка 3.44%, золы 4.1%, рН восстановленного продукта 6.5.

В качестве объектов исследования использовали неочищенные ферментные препараты бета-галактозидаз, полученные с применением дрожжей или дрожжей и молочнокислых бактерий.

Исследования проводили по типовым и общепринятым методикам. Количество жизнеспособных молочнокислых микроорганизмов определяли методом наиболее вероятного числа микроорганизмов согласно ГОСТ 33951-2016 “Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов”. Количество дрожжей определяли методом счета колоний по ГОСТ 33566-2015 “Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов” и МУК 4.2.2884-11 “Методы микробиологического контроля объектов окружающей среды и пищевых продуктов с использованием петрифильмов”.

Активность бета-галактозидаз определяли общепринятым методом, основанном на измерении интенсивности окраски о-нитрофенола, образующегося при гидролизе ферментом синтетического субстрата о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (о-НФГ) [26]. К 50 мкл раствора бета-галактозидазы (суспензия с дезинтегрированными клетками) добавляли 2 см³ 1.25 мМ раствора о-НФГ в буфере (50 мМ КН₂РO₄, рН 6.6–6.8), смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 0.5 см³ 1М раствора Na₂СО₃. Оптическую плотность полученной пробы, содержащей образовавшийся о-нитрофенол, измеряли при длине волны 420 нм. Активность β-галактозидазы А рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{DV}{\epsilon t V_{\text{пр}}},$$

где D – оптическая плотность раствора при 420 нм; ϵ – коэффициент молекулярной экстинкции о-нитрофенола, л/ммоль·см ($\epsilon = 4.5$); t – время инкубации, мин; V – объем реакционной смеси, см³; $V_{\text{пр}}$ – объем ферментного препарата, см³.

При получении ферментных препаратов культивирование клеток для накопления биомассы продуцентов бета-галактозидаз на первом этапе проводили раздельно. Молочнокислые микроорганизмы активизировали в обезжиренном молоке в течение 24 ч при оптимальной температуре, после чего 5% полученной закваски вносили в стерилизованный восстановленный пермеат подсырной сыворотки, тщательно перемешивали и инкубиро-

вали при оптимальной температуре в течение 24 ч. Коллекционные штаммы дрожжей активизировали путем пересева на плотную питательную среду Сабуро (скошенный агар) и инкубации в течение 24 ч при оптимальной температуре, после чего готовили суспензию клеток в фосфатном буфере с оптической плотностью $OD_{460} = (0.15 \pm 0.02)$. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра UNICO 2800UV/VIS (United Products & Instruments, США). Для перемешивания суспензии использовали встряхиватель медицинский вибрационный Vortex (Elmi, Латвия). Далее 1 см^3 полученной суспензии вносили в коническую колбу со 150 см^3 стерилизованного восстановленного УФ-пермеата с массовой долей сухих веществ 6.5%, тщательно перемешивали и инкубировали в условиях аэрации в шейкер-инкубаторе ES 20/60 (SIA Biosan, Латвия) при температуре $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ и перемешивании 100 об./мин в течение 24 ч для накопления биомассы.

На втором этапе проводили совместное культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий. Для этого ферментированный дрожжами пермеат смешивали в соотношении 1 : 1 с пермеатом, ферментированным молочнокислыми микроорганизмами, полученную смесь выдерживали в анаэробных условиях в инкубаторе с углекислой средой SANYO MCO-20AIC (AWTech, Япония) при температуре $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$, концентрации CO_2 6% в течение 24 ч для дополнительного накопления биомассы культур и продуктов их метаболизма, в т. ч. этилового спирта, который способствует пермеабилитации клеток и выделению ферментов. Далее полученные образцы подвергали различным способам обработки для инактивации клеток и получения неочищенных ферментных препаратов.

Разрушение клеток с использованием абразивов осуществляли следующим образом. Клеточную суспензию смешивали с кварцевым песком (диаметр частиц 0.1–0.3 мм) из расчета 1 г песка на 1 см^3 ферментационного пермеата. Один цикл обработки включал: перешивание на встряхивателе Vortex (Elmi) при максимальной скорости вращения в течение 1 мин, охлаждение на ледяной бане в течение 1 мин. Цикл повторяли трижды, после чего образцы обрабатывали на центрифуге Allegra 64R (Beckman Coulter, США) при скорости 1750 g и температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. Далее отбирали надосадочную жидкость и проводили определение активности бета-галактозидазы. Разрушение клеток с помощью стеклянных шариков (диаметр 0.2 мм) осуществляли аналогичным образом.

Разрушение клеток с помощью ультразвука проводили с использованием процессора Hielscher UP400S (Hielscher Ultrasonics, Германия) и сонотрода Н7 (диаметр 7 мм, максимальная амплитуда 175 мкм, интенсивность 300 Вт/см^2). В случае

дрожжевых клеток были выбраны следующие режимы: амплитуда 40%, продолжительность обработки 20 с “пульс” + 40 с “отдых”. Общее время воздействия составляло 7 мин. Для молочнокислых микроорганизмов были выбраны следующие параметры: амплитуда 30%, продолжительность обработки 30 с “пульс” + 45 с “отдых”. Данный цикл повторяли 8 раз. Сразу после воздействия ультразвуком проводили измерение активности выделенных бета-галактозидаз.

Для термической инактивации клеток образцы, ферментированные дрожжами и молочнокислыми микроорганизмами, после окончания процесса культивирования подвергали нагреванию при температуре $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч, охлаждали до $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ и проводили определение активности бета-галактозидаз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение количества клеток продуцентов бета-галактозидаз на разных этапах раздельного и совместного культивирования

1.1. Раздельное культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий

Результаты определения количества клеток продуцентов бета-галактозидаз на первом этапе раздельного культивирования представлены в табл. 1.

Согласно данным табл. 1, в исходном пермеате находилось примерно одинаковое количество клеток дрожжей ($\lg N$ (3.8 ± 0.2) КОЕ/ см^3). Исключением являлся штамм *K. lactis* Y-1339, рост которого во всех экспериментах был более слабым на среде Сабуро и тест-пластина при той же исходной оптической плотности суспензии клеток (0.15 ± 0.02) , приготовленной из колоний, выросших на плотной питательной среде в тех же условиях, что и другие дрожжи. В дальнейшем число клеток *K. lactis* Y-1339 было на 1–3 порядка меньше, чем у остальных дрожжей, как при раздельном, так и при совместном культивировании в пермеате, однако скорость роста всех штаммов дрожжей была сопоставима.

На первом этапе раздельного культивирования разные штаммы дрожжей показывали разную скорость роста в пермеате. Наиболее активным развитием отличался штамм *K. marxianus* Y-1338, количество клеток которого увеличилось за 24 ч культивирования примерно на 3 порядка. Другие штаммы за этот период накапливали меньше биомассы, по этому показателю их можно расположить в следующий ряд по мере снижения количества клеток: *K. lactis* Y-1333 > *K. marxianus* Y-459 > *K. lactis* Y-1339.

Количество молочнокислых бактерий в исходном пермеате находилось примерно на одном уровне (разброс значений $\lg N$ для четырех штаммов не превышал 0.3), в течение первых 24 ч раздель-

Таблица 1. Количество клеток дрожжей и молочнокислых бактерий на этапе раздельного культивирования
Table 1. Cell counts of yeast and lactic acid bacteria at the separate cultivation

Культура	Количество клеток (lg N, КОЕ/см ³) после культивирования в течение	
	0 ч	24 ч
<i>K. marxianus</i> Y-459	3.8 ± 0.4	5.5 ± 0.6
<i>K. marxianus</i> Y-1338	3.7 ± 0.3	7.1 ± 0.3
<i>K. lactis</i> Y-1333	3.6 ± 0.4	5.8 ± 0.3
<i>K. lactis</i> Y-1339	1.9 ± 0.5	4.2 ± 0.7
<i>St. thermophilus</i> B	6.3 ± 0.3	7.6 ± 0.5
<i>St. thermophilus</i> HB	6.2 ± 0.4	7.7 ± 0.5
<i>Lb. acidophilus</i> B	6.0 ± 0.3	7.0 ± 0.4
<i>Lb. acidophilus</i> HB	6.1 ± 0.2	7.4 ± 0.6

Таблица 2. Количество клеток дрожжей на этапе совместного культивирования с *St. thermophilus*
Table 2. Count of yeast cells at the stage of co-culture with *St. thermophilus*

Культура дрожжей	Количество клеток (lg N, КОЕ/см ³) после совместного культивирования	
	<i>S. t B</i>	<i>S. t HB</i>
<i>K. marxianus</i> Y-459	7.4 ± 0.1	7.1 ± 0.2
<i>K. marxianus</i> Y-1338	7.3 ± 0.2	7.0 ± 0.1
<i>K. lactis</i> Y-1333	6.9 ± 0.3	6.5 ± 0.3
<i>K. lactis</i> Y-1339	4.9 ± 0.5	4.6 ± 0.2

Примечание: *S. t B* – вязкий штамм *St. thermophilus*, *S. t HB* – невязкий штамм *St. thermophilus*.
 Note: *S. t B* – viscous strain *St. thermophilus*, *S. t HB* – non-viscous strain *St. thermophilus*.

ного культивирования их число увеличилось на (1.0–1.5) lg N.

1.2. Совместное культивирование дрожжей с вязкими и невязкими штаммами *St. thermophilus*

Результаты определения количества клеток дрожжей и *St. thermophilus*, полученные на этапе их совместного культивирования представлены в табл. 2 и 3.

На этапе совместного культивирования штамм *K. marxianus* Y-459 хорошо развивался с термофильным стрептококком, лучше всего – с вязким *St. thermophilus* (B), давая через 24 ч прибавление по показателю lg N на 35%. Вязкие и невязкие штаммы термофильного стрептококка не оказали существенного влияния на количество *K. marxianus*

Y-1338. *K. lactis* продолжили развиваться в пермате в присутствии молочнокислых кокков, использованных в опыте, причем оба штамма дрожжей лучше росли в присутствии вязких штаммов *St. thermophilus*. Количество клеток *K. lactis* Y-1333 увеличилось на 19%, *K. lactis* Y-1339 на 17%.

В случае совместного с дрожжами культивирования на развитие вязкого *St. thermophilus* положительно повлияли два штамма *K. marxianus* (Y-459 и Y-1338). Оба с увеличением lg N через 24 ч на 5.3% и *K. lactis* Y-1339 (на 7.9%), остальные штаммы существенного воздействия не оказали. Количество клеток невязкого *St. thermophilus* (HB) снизилось через 24 ч культивирования со всеми исследован-

Таблица 3. Количество клеток *St. thermophilus* на этапе совместного культивирования с дрожжами
Table 3. Count of *St. thermophilus* cells at the stage of co-cultivation with yeast

Культура молочнокислых бактерий	Количество клеток (lg N, КОЕ/см ³) после совместного культивирования			
	<i>K. marxianus</i>		<i>K. lactis</i>	
	Y-459	Y-1338	Y-1333	Y-1339
<i>St. thermophilus</i> B	8.0 ± 0.4	8.0 ± 0.2	7.6 ± 0.5	8.2 ± 0.2
<i>St. thermophilus</i> HB	6.7 ± 0.3	7.0 ± 0.3	6.5 ± 0.5	7.2 ± 0.2

Таблица 4. Количество клеток дрожжей на этапе совместного культивирования с *Lb. acidophilus*
Table 4. Count of yeast cells at the stage of co-culture with *Lb. acidophilus*

Культура дрожжей	Количество клеток (lgN. КОЕ/см ³) после совместного культивирования	
	<i>L. a B</i>	<i>L. a HB</i>
<i>K. marxianus</i> Y-459	6.0 ± 0.5	6.7 ± 0.2
<i>K. marxianus</i> Y-1338	7.1 ± 0.2	7.1 ± 0.1
<i>K. lactis</i> Y-1333	7.0 ± 0.2	5.9 ± 0.4
<i>K. lactis</i> Y-1339	4.4 ± 0.3	4.8 ± 0.3

Примечание: *L. a B* – вязкий штамм *Lb. acidophilus*, *L. a HB* – невязкий штамм *Lb. acidophilus*.
 Note: *L. a B* – viscous strain *Lb. acidophilus*, *L. a HB* – non-viscous strain *Lb. acidophilus*.

Таблица 5. Количество клеток *Lb. acidophilus* на этапе совместного культивирования с дрожжами
Table 5. Count of *Lb. acidophilus* cells at the stage of co-cultivation with yeast

Культура молочнокислых бактерий	Количество клеток (lgN. КОЕ/см ³) после совместного культивирования			
	<i>K. marxianus</i>		<i>K. lactis</i>	
	Y-459	Y-1338	Y-1333	Y-1339
<i>Lb. acidophilus B</i>	6.8 ± 0.2	6.8 ± 0.1	6.1 ± 0.3	7.0 ± 0.3
<i>Lb. acidophilus HB</i>	7.9 ± 0.1	7.2 ± 0.3	7.6 ± 0.2	7.4 ± 0.4

ными дрожжами, наиболее существенно – с *K. lactis* Y-1333 (на 15.6% по lgN).

1.3. Совместное культивирование дрожжей с вязкими и невязкими штаммами *Lb. acidophilus*

Результаты определения количества клеток дрожжей и *Lb. acidophilus*, полученные на этапе их совместного культивирования представлены в табл. 4 и 5.

K. marxianus Y-459 продолжил развиваться в пермеате в присутствии ацидофильной палочки, наиболее существенное прибавление по значению lgN было отмечено в опытах с невязким штаммом и составило 22%. Также как в экспериментах с *St. thermophilus* вязкие и невязкие штаммы *Lb. acidophilus* не повлияли на количество клеток *K. marxianus* Y-1338. Культивирование *K. lactis* Y-1333 совместно с вязким *Lb. acidophilus* оказало положительное влияние на показатель lgN, обеспечив его увеличение за 24 ч на 21%, в случае невязкого штамма существенного влияния на дрожжи не выявлено. В опытах с *K. lactis* Y-1339 добавление невязкого штамма ацидофильной палочки привело к росту lgN на 14%, культивирование дрожжей совместно с невязким *Lb. acidophilus* значимого влияния на их развитие на оказало.

Вязкие штаммы *Lb. acidophilus* показали существенное уменьшение lgN при совместном культивировании с *K. lactis* Y-1333 (на 12.9%), а невязкие – увеличение этого показателя со штаммом *K. marxianus* Y-459 (на 6.8%).

2. Определение активности бета-галактозидаз, полученных после отдельного и совместного культивирования дрожжей и молочнокислых бактерий

Результаты определения активности неочищенных комбинированных препаратов бета-галактозидаз, полученных после отдельного культивирования дрожжей и молочнокислых бактерий представлены на рис. 1.

Анализ диаграмм на рис. 1а позволяет сделать вывод о том, что активность бета-галактозидазы дрожжей после ультразвуковой (УЗ) и тепловой обработки (ТО) была в 2–3 раза выше, чем при использовании перемешивания с абразивами. Исключением являлась бета-галактозидаза штамма *K. lactis* Y-1339, активность которой была примерно одинаковой независимо от выбранного способа разрушения клеток (разница в значениях не превышала 5%).

Применение УЗ обеспечивает более высокую активность бета-галактозидазы, чем при ТО. Для дрожжей *K. marxianus* Y-459 этот параметр больше на 19%, *K. lactis* Y-1333 на 15.3%, а для *K. marxianus* Y-1338 практически в 2 раза больше, чем в опытах с ТО.

В опытах с ТО ферментативная активность практически всех видов дрожжей была в 2 раза выше, чем при обработке кварцевым песком (КП) и стеклянными шариками (СШ). Максимальные значения активности фермента (0.626 ± 0.02) МЕ/см³ и (0.556 ± 0.01) МЕ/см³ были получены для дрожжей *K. marxianus* Y-1338 и Y-459 (УЗ) соответственно.

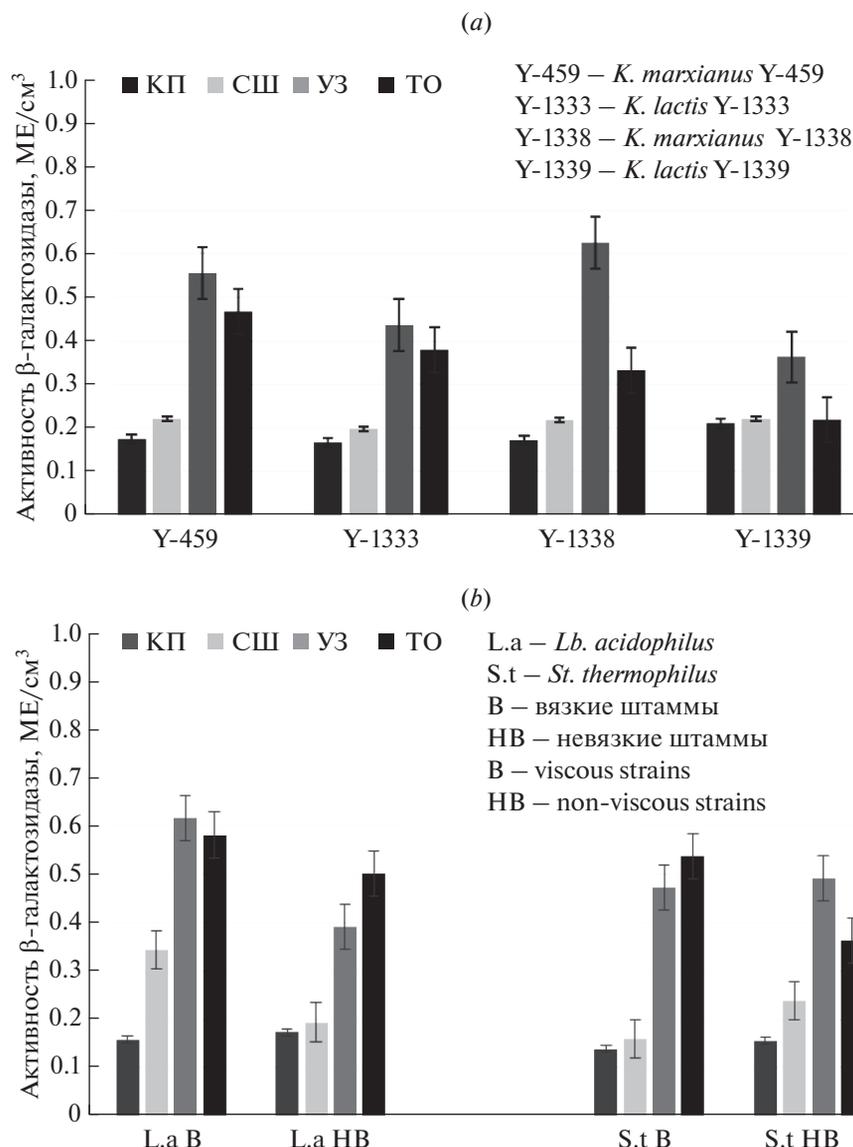


Рис. 1. Зависимость активности бета-галактозидаз от способа дезинтеграции клеток: *a* – дрожжей, *b* – молочнокислых микроорганизмов при раздельной культивировании (КП – с кварцевым песком, СШ – со стеклянными шариками, УЗ – ультразвуком, ТО – тепловой обработкой).

Fig. 1. Dependence of beta-galactosidase activity on the cell disruption method: *a* – yeast, *b* – lactic acid microorganisms during separate cultivation (КП – with quartz sand, СШ – with glass beads, US – ultrasound, HT – heat treatment).

Анализ результатов активности бета-галактозидазы молочнокислых микроорганизмов, представленных в диаграмме на рис. 1*b* свидетельствует о том, что после УЗ и ТО этот показатель был существенно (в 2–3 раза) выше, чем в случае применения методов перемешивания с абразивами. При использовании УЗ максимальная активность фермента была получена для вязкого штамма *Lb. acidophilus* (на 6.2% больше, чем в опытах с ТО), из невязкого штамма была в 1.6 раз ниже этого значения и на 27.8% меньше, чем в опытах с ТО.

Активность фермента из вязкого и невязкого штаммов *St. thermophilus* после УЗ обработки была

примерно одинаковой (разница в значениях не превышала 4%). При ТО вязкого штамма этот параметр был выше на 12%, а для невязкого ниже на 35.3%. В случае обработки клеток молочнокислых микроорганизмов стеклянными шариками бета-галактозидаза демонстрировала активность на (13–54)% выше, чем после кварцевого песка, наибольшая разница была отмечена для вязкого штамма ацидофильной палочки.

Полученные результаты подтверждают имеющуюся в литературных источниках информацию о возможности и эффективности применения УЗ для разрушения клеток микроорганизмов с целью

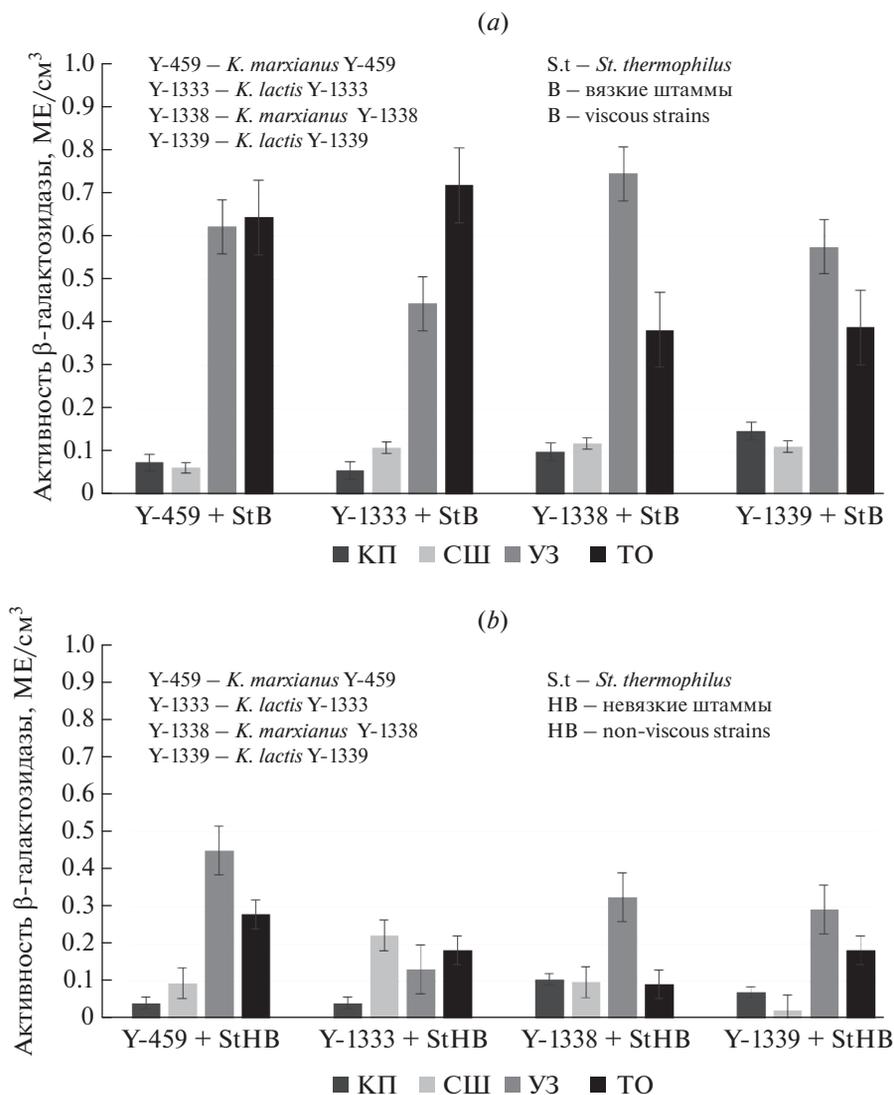


Рис. 2. Зависимость активности бета-галактозидаз от способа дезинтеграции клеток: *a* – дрожжей и *St. thermophilus* B (StB), *b* – дрожжей и *St. thermophilus* HB (StHB) при совместном культивировании.

Fig. 2. Dependence of beta-galactosidase activity on the cell disruption method: *a* – yeast and *St. thermophilus* viscous strains (StB), *b* – yeast and *St. thermophilus* non-viscous strains (StHB) during co-cultivation.

получения внутриклеточных бета-галактозидаз [28]. Данные настоящих исследований с молочнокислыми микроорганизмами близки к результатам работы [30], проведенной с клетками *St. thermophilus*. Однако этими авторами использованы несколько иные режимы ультразвукового воздействия (мощность 60 Вт, температура 4°C). Активность полученной при этом бета-галактозидазы составила 0.660 МЕ/мл. В другой работе [16] сочетание обработки клеток *Lb. acidophilus* ATCC 4356 в ультразвуковой ванне с попеременным замораживанием-оттаиванием позволило получить бета-галактозидазу активностью 0.322 МЕ/мл, в то время как использование только УЗ-воздействия привело к снижению этого показателя до 0.157 МЕ/мл. Сопоставление полученных результатов (рис. 1 и 2) с

данными других исследований, затруднено ввиду использования авторами иных культур молочнокислых микроорганизмов и дрожжей, отсутствия информации о параметрах воздействия и применения других режимов пермеабилзации клеток, а также представления показателя активности бета-галактозидазы в других единицах измерения [13–20, 29, 31].

В целом представленные результаты соответствуют литературным данным о том, что активность бета-галактозидазы зависит не только от вида, но и от штамма продуцента, а также от выбранного способа и режимов дезинтеграции клеток. Клетки грамположительных микроорганизмов (дрожжи, молочнокислые микроорганизмы и др.) с трудом поддаются пермеабилзации, что объясняет

ся строением их клеточной стенки, а именно наличием в ней выраженного слоя пептидогликана, который придает жесткость и образует основной структурный каркас бактериальной клетки [32]. Сравнительно высокая активность фермента, полученного в результате теплового воздействия может быть обусловлена тем, что термическая обработка индуцирует транслокацию бета-галактозидазы из цитоплазматического пространства в периплазматическое, тем самым облегчая последующее разрушение клеточной стенки и выделение фермента в среду культивирования [27]. Низкая активность бета-галактозидаз при применении методов перемешивания с абразивами, вероятно, обусловлена ассоциацией фермента с цитоплазматической мембраной [16]. Это позволяет предполагать, что ферменты способны сохранять связи с компонентами клеток продуцентов после их инактивации и разрушения, в этом случае клеточные структуры могут играть роль сайтов иммобилизации ферментов, и их удаление при центрифугировании приводит к снижению активности ферментных препаратов.

Результаты определения активности неочищенных комбинированных препаратов бета-галактозидаз, полученных после совместного культивирования дрожжей с вязкими и невязкими штаммами *St. thermophilus* показаны на рис. 2.

Согласно диаграммам на рис. 2а активность комбинированных бета-галактозидаз разных дрожжей и вязкого термофильного стрептококка после УЗ и ТО была существенно (в 2–10 раз) выше, чем после истирания с песком и стеклянными шариками. При использовании ТО самая высокая активность ферментов была достигнута в суспензии клеток, полученной после совместного культивирования *St. thermophilus* В с *K. marxianus* Y-459 и *K. lactis* Y-1333. В первом случае способ обработки существенно не повлиял на этот параметр, а во втором активность фермента была в 1.6 раза выше, чем в опытах с УЗ. В опытах с УЗ обработкой наиболее активными были бета-галактозидазы в суспензии, полученной после совместного культивирования *St. thermophilus* В с *K. marxianus* Y-1338 (в 1.9 раза выше, чем в опытах с ТО) и *K. lactis* Y-1339 (в 1.5 раза выше, чем в опытах с ТО). Максимальные значения активности комбинированных бета-галактозидаз на уровне (0.75 ± 0.02) МЕ/см³ были получены после совместного культивирования *St. thermophilus* В с *K. lactis* Y-1333 (ТО) и *K. marxianus* Y-1338 (УЗ).

Активность ферментов, полученных в аналогичных экспериментах с невязким термофильным стрептококком (рис. 2б), была существенно ниже, чем в опытах с вязкими штаммами. Относительно высокая активность на уровне (0.45 ± 0.02) МЕ/см³ отмечена для бета-галактозидазы после УЗ обработки суспензии, полученной в результате совместного культивирования *St. thermophilus* НВ с

K. marxianus Y-459 (в 1.6 раза больше, чем после ТО, но в 1.4 раза меньше, чем в опытах с вязким штаммом). Активность ферментов после УЗ обработки всех остальных штаммов была ниже, хотя в целом этот метод был более эффективен, чем другие способы разрушения клеток (за исключением опытов с *K. lactis* Y-1333 и *St. thermophilus* НВ).

При сравнении данных по активности бета-галактозидаз дрожжей и молочнокислых бактерий при раздельном и совместном культивировании дрожжей с вязким *St. thermophilus* установлено, что совместное культивирование позволило получить комбинированные ферментные препараты, активность которых была существенно выше, чем активность бета-галактозидаз дрожжей во всех опытах с тепловой обработкой (для *K. marxianus* Y-459 – выше на 37.9%, *K. lactis* Y-1333 – на 89.7%, *K. marxianus* Y-1338 – на 14.7%, *K. lactis* Y-1339 – на 78.4%). Такой же эффект был получен в большинстве экспериментов с УЗ обработкой: для *K. marxianus* Y-459 – выше на 12.1%, *K. marxianus* Y-1338 – на 19.2%, *K. lactis* Y-1339 – на 58.7%, за исключением опытов с *K. lactis* Y-1333 (без изменений).

Активность комбинированных ферментных препаратов в большинстве опытов была выше, чем активность бета-галактозидазы *St. thermophilus* В: с *K. marxianus* Y-459 – на 31.7% после УЗ и на 20% после ТО, *K. lactis* Y-1333 – на 34% после ТО, *K. marxianus* Y-1338 – на 57.7% после УЗ, *K. lactis* Y-1339 – на 21.8% после УЗ. Однако в некоторых случаях наблюдали снижение активности ферментов после совместного культивирования по сравнению с активностью бета-галактозидазы *St. thermophilus* В: с *K. lactis* Y-1333 – на 6.1% после УЗ, *K. marxianus* Y-1338 и *K. lactis* Y-1339 – на 28.7% после ТО. Возможно это связано с более высокой термоустойчивостью термофильного стрептококка и его ферментов по сравнению с некоторыми штаммами дрожжей.

Результаты определения активности неочищенных комбинированных препаратов бета-галактозидаз, полученных после совместного культивирования дрожжей с вязкими и невязкими штаммами *Lb. acidophilus* представлены на рис. 3.

Анализ данных на рис. 3а показал, что активность комбинированных бета-галактозидаз разных дрожжей и вязкой ацидофильной палочки после УЗ и ТО была существенно (в 2–8 раз) выше, чем после механического разрушения с песком и стеклянными шариками, что соответствует результатам экспериментов с вязким термофильным стрептококком. Самая высокая активность ферментов в этой серии опытов была достигнута после ТО суспензии клеток, полученной в результате совместного культивирования *Lb. acidophilus* В с дрожжами *K. marxianus* Y-459, *K. lactis* Y-1333, *K. marxianus* Y-1338 (на уровне (0.82 ± 0.04) МЕ/см³,

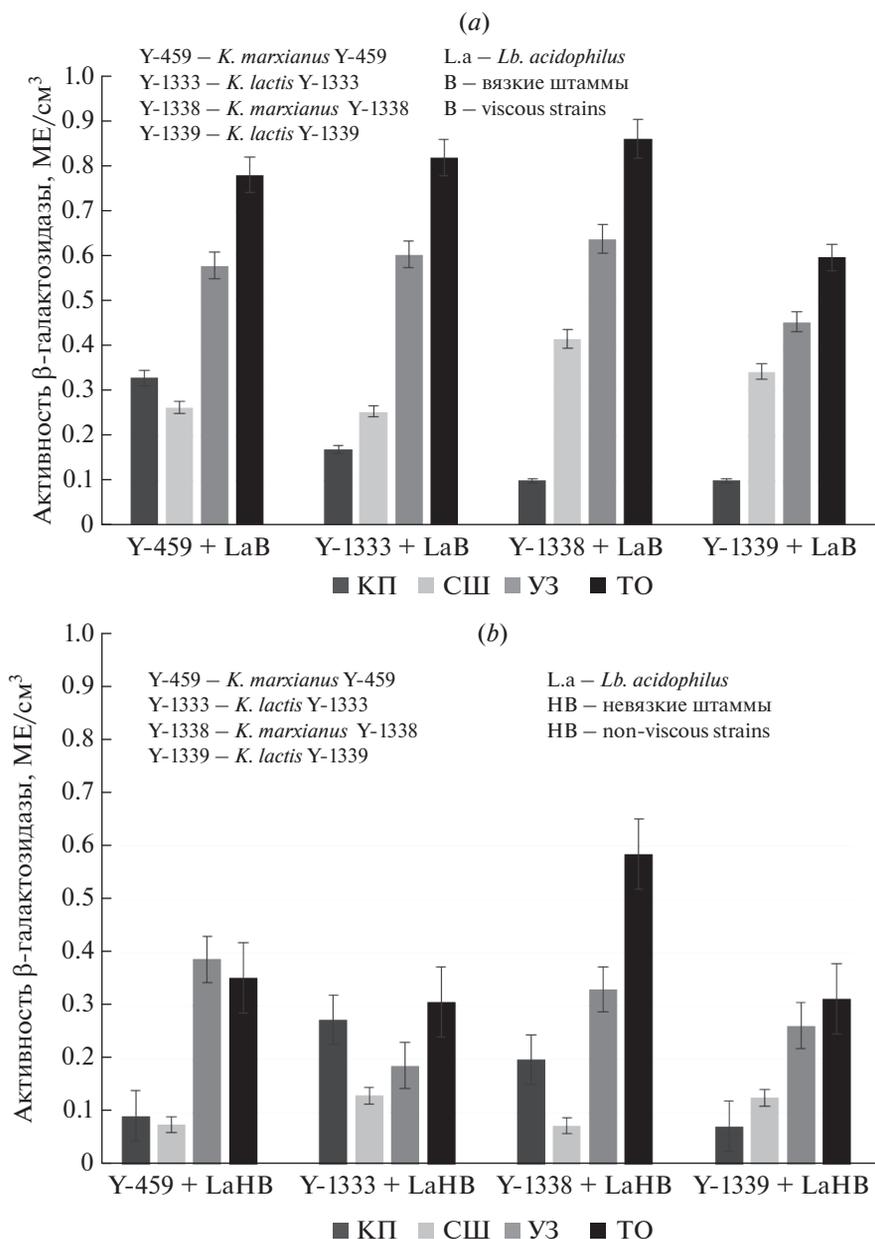


Рис. 3. Зависимость активности β-галактозидаз от способа дезинтеграции клеток: *a* – дрожжей и *Lb. acidophilus* B, *b* – дрожжей и *Lb. acidophilus* NB.

Fig. 3. Dependence of beta-galactosidase activity on the cell disruption method: *a* – yeast and *Lb. acidophilus* viscous strains. *b* – yeast and *Lb. acidophilus* non-viscous strains.

что в 1.3 раза выше, чем в опытах с УЗ). Активность фермента *K. lactis* Y-1339 (ТО) составила (0.6 ± 0.03) МЕ/см³, что было примерно в 1.3 раза выше, чем в опытах с УЗ.

Наиболее активными были бета-галактозидазы в суспензии, полученной после совместного культивирования *Lb. acidophilus* B с *K. marxianus* Y-1338, однако в опытах с УЗ обработкой их активность в 1.3 раза ниже, чем в опытах с ТО. В остальных опытах с УЗ активность ферментов находилась примерно на одном уровне (0.53 ± 0.07) МЕ/см³. В

целом можно сказать, что в опытах с *Lb. acidophilus* B эффективность извлечения ферментов УЗ обработкой была ниже, чем при использовании ТО. При разрушении клеток с песком и стеклянными шариками активность комбинированных ферментных препаратов находилась на уровне активности бета-галактозидаз отдельных культур.

Активность ферментов, полученных в аналогичных экспериментах с невязким штаммом ацидофильной палочки (рис. 3b), была существенно ниже, чем в опытах с вязким штаммом. Относительно

высокую активность на уровне (0.59 ± 0.02) МЕ/см³ показали бета-галактозидазы при ТО суспензии, полученной после совместного культивирования *Lb. acidophilus* НВ с *K. marxianus* Y-1338 (в 1.7 раза больше, чем после УЗ, но в 1.5 раза меньше, чем в аналогичных опытах с вязким штаммом).

Проведено сравнение полученных данных с результатами определения активности бета-галактозидаз дрожжей и молочнокислых бактерий при их раздельном культивировании. Совместное культивирование дрожжей с вязким *Lb. acidophilus* позволило получить комбинированные ферментные препараты, активность которых была существенно выше, чем активность бета-галактозидаз дрожжей при раздельном культивировании во всех опытах с ТО (для *K. marxianus* Y-459 – выше на 67%, *K. lactis* Y-1333 – в 2.2 раза, *K. marxianus* Y-1338 – в 2.6 раза и *K. lactis* Y-1339 – в 2.7 раза). Такой же эффект был получен в экспериментах с УЗ обработкой для *K. lactis* Y-1333 – выше на 38%, *K. lactis* Y-1339 – на 24.8%, в то время как в опытах с *K. lactis* Y-459 и *K. marxianus* Y-1338 активность комбинированных ферментов существенно не изменилась. Аналогичные закономерности были установлены в экспериментах с вязким термофильным стрептококком.

Активность комбинированных ферментных препаратов в большинстве опытов с ТО была выше, чем активность бета-галактозидазы *Lb. acidophilus* В (рис. 1б): при совместном культивировании с *K. marxianus* Y-459 – на 34.3%, *K. lactis* Y-1333 – на 40.8%, *K. marxianus* Y-1338 – на 47.8%. При этом в опыте с ТО *K. lactis* Y-1339 и трех экспериментах с УЗ (*K. marxianus* Y-459, *K. lactis* Y-1333, *K. marxianus* Y-1338) наблюдали такую же активность фермента, как при раздельном культивировании, а в одном случае было зафиксировано снижение активности бета-галактозидаз *Lb. acidophilus* В после совместного культивирования и УЗ обработки с *K. lactis* Y-1339 – на 26%. Можно предположить, что в некоторых сочетаниях дрожжи могут вызывать защитный эффект в отношении молочнокислых бактерий в неблагоприятных условиях, поэтому они лучше выживают при УЗ обработке.

При сравнении активности комбинированных ферментов, полученных после совместного культивирования дрожжей и разных видов молочнокислых бактерий, было отмечено, что в опытах с *Lb. acidophilus* именно способ разрушения клеток с помощью ТО привел к наиболее высокой активности бета-галактозидаз. В экспериментах с *St. thermophilus* соотношение между эффективностью ТО и УЗ было разным для разных штаммов. Это может быть обусловлено высокой кислотообразующей способностью *Lb. acidophilus* и повышенной скоростью разрушения дрожжей путем термоавтолиза в кислой среде. Возможно, с этим связана и более высокая эффективность извлечения комбинированных ферментов и при использовании механиче-

ских методов в опытах с *Lb. acidophilus*, чем с *St. thermophilus*, однако этот эффект был более выражен при использовании вязких штаммов.

Таким образом, среди исследованных механических и физических методов разрушения клеток наиболее эффективными являются обработка ультразвуком и тепловое воздействие. Применение этих способов позволило получить бета-галактозидазу дрожжей и молочнокислых микроорганизмов с существенно большей активностью (в 2–10 раз), чем при использовании перемешивания с кварцевым песком и стеклянными шариками. В случае раздельного культивирования наибольшая активность бета-галактозидазы была получена после УЗ для дрожжей *K. marxianus* Y-459, *K. marxianus* Y-1338 и вязкого штамма *Lb. acidophilus* (на уровне (0.6 ± 0.03) МЕ/см³). При применении ТО ферментативная активность была ниже, среди дрожжей наиболее активными оказались бета-галактозидазы *K. marxianus* Y-459 (0.5 МЕ/см³) и *K. lactis* Y-1333 (0.4 МЕ/см³), из молочнокислых микроорганизмов – вязкие и невязкие штаммы *Lb. acidophilus*, а также невязкий штамм *St. thermophilus* (0.5 МЕ/см³).

Установлено что совместное культивирование некоторых штаммов дрожжей и вязких штаммов молочнокислых бактерий позволило получить комбинированные ферментные препараты бета-галактозидаз с более высокой активностью, чем бета-галактозидазы отдельных продуцентов. Наибольшая лактазная активность ($0.8–0.9$ МЕ/см³) при использовании ТО была получена для вязкого штамма *Lb. acidophilus* в комбинации с дрожжами *K. marxianus* Y-1338 и *K. lactis* Y-1333. В первом случае активность фермента была в 2.6 раз выше, чем отдельно *K. marxianus* Y-1338 и на 47.8% больше, чем отдельно *Lb. acidophilus* В, а во втором в 2.2 раз выше, чем отдельно *K. lactis* Y-1333 и на 40.8% больше, чем отдельно *Lb. acidophilus* В. Бета-галактозидаза вязкого штамма *St. thermophilus* продемонстрировала наибольшую активность в сочетании с *K. lactis* Y-1333 (в 1.9 раз выше, чем отдельно *K. lactis* Y-1333 и на 34% больше, чем отдельно *St. thermophilus* В) в результате ТО и с *K. marxianus* Y-1338 (на 19% выше, чем отдельно *K. marxianus* Y-1338 и в 1.6 раз больше, чем отдельно *St. thermophilus* В) после УЗ воздействия.

Изменение свойств комбинированных ферментов, в частности трансгликозилирующей активности, может быть связано с их структурой. Известно, что бета-галактозидаза *K. lactis* относится к группе GH2 и представляет собой гомотетрамер с активным участком в третьем домене, причем в растворах он может частично диссоциировать до димерной и даже мономерной формы [9]. Бета-галактозидазы молочнокислых бактерий также относятся к GH2, у *St. thermophilus* они имеют гомотетрамерную структуру (тип LacZ), а у *Lb. acidophilus* – гетеродимерную (тип LacLM)

(Коллекция функциональных свойств ферментов Института биохимии и биоинформатики Технического университета Брауншвейга Германии <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.23&Suchword=BGAL2-LAC1>). Учетываемая возможность диссоциации ферментов в растворах, вероятно взаимодействие их мономеров и взаимное влияние на активные центры, участвующие в реакциях трансгликозилирования. Данное предположение требует проведения дальнейших исследований, а выявленный эффект может быть использован для повышения выхода лактулозы в процессе ее биосинтеза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологического производства по теме: “Создание первого в России высокотехнологического производства пребиотика лактулозы и функциональных молочных ингредиентов для импортозамещения в медицине, ветеринарии, детском питании, производстве лечебно-профилактических продуктов для людей и животных” (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации государственного научного учреждения и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологического производства № 075-11-2022-021 от 07.04.2022 г.) в рамках Постановления Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 на базе ФГАОУ ВО “Северо-Кавказский федеральный университет”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li A., Zheng J., Han X., Yang S., Cheng S., Zhao J., Zhou W., Lu Y. Advances in Low-Lactose/Lactose-Free Dairy Products and Their Production. *Foods*, 2023, 12(13), 2553. <https://doi.org/10.3390/foods12132553>
2. Синельников Б.М., Храмов А.Г., Евдокимов И.А., Рябцева С.А., Серов А.В. Лактоза и ее производные. СПб.: Изд-во Профессия. 2007. 786.
3. Vera C., Guerrero C., Aburto C., Cordova A., Illanes A. Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. *BBA-Proteins Proteom.*, 2020, 1868(1), 140271. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>
4. Lu L., Guo L., Wang K., Liu Y., Xiao M. β -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. *Biotechnol. Adv.*, 2020, 39, 107465. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107465>
5. Рябцева С.А., Храмов А.Г., Шпак М.А. Лодыгин А.Д., Анисимов Г.С., Сазанова С.Н. Табакова Ю.А. Биотехнология лактулозы: современные достижения, проблемы и перспективы. *Техника и технология пищевых производств*, 2023, 53(1), 97–122. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2419>
6. Kalathinathan P., Sain A., Pulicherla K., Kodiveri. Muthukaliannan G.A. Review on the Various Sources of β -Galactosidase and Its Lactose Hydrolysis Property. *Curr. Microbiol.*, 2023, 80(4), 122. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03220-4>
7. Guerrero C., Vera C., Conejeros R., Illanes A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2015, 70, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
8. Žolnere K., Ciproviča I. The comparison of commercially available β -galactosidases for dairy industry: review. Research for Rural Development. *International Scientific Conference Proceedings*, 2017, 1, 215–222. <https://doi.org/10.22616/rtd.23.2017.032>
9. de Albuquerque T.L., de Sousa M., Gomes E. Silva N.C., Girão Neto C.A.C., Gonçalves L.R.B., Fernandez-Lafuente R. Rocha M.V.P. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. *Int. J. Biol., Macromol.*, 2021, 191, 881–898. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>
10. Ramirez S.R., Flores R.J. Properties of β -Galactosidases derived from *Lactobacillaceae* species and its capacity for galacto-oligosaccharides production. *J. Dairy Sci.*, 2023, 106(12), 8193–8206. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23392>
11. Dorau R., Jensen P.R., Solem C. Purified lactases versus whole-cell lactases—the winner takes it all. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2021, 105(12), 4943–4955. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11388-7>
12. Wang Q., Lillevang S.K., Rydtoft S.M., Xiao H., Fan M.T., Solem C., Liu J.M., Jensen P.R. No more cleaning up - Efficient lactic acid bacteria cell catalysts as a cost-efficient alternative to purified lactase enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, 104(14), 6315–6323. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10655-3>
13. Puri M., Gupta S., Pahuja P., Kaur A., Kanwar J.R., Kennedy J.F. Cell Disruption Optimization and Covalent Immobilization of β -D-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for Lactose Hydrolysis in Milk. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 160(1), 98–108. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8542-y>
14. Numanoglu Ya., Sungur S. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. *Process Biochem.*, 2004, 39(6), 705–711. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00183-3)
15. Matos de Freitas M.F., Hortêncio L.C., Albuquerque T.L. Ponte Rocha M.V., Barros Gonçalves L.R. Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by β -galactosidase from NRRL Y1564 *Kluyveromyces lactis*. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2020, 43(4), 711–722. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02270-y>
16. Carevic M., Vukasinovic S.M., Grbavčić S.Ž., Stojanovic M., Mihailovic M., Dimitrijević A., Bezbradica D. Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hem. Ind.*, 2015, 69(3), 305–312. <https://doi.org/10.2298/hemind140303044c>
17. Huzaiifa S.C. Smita S.L. Release of β -galactosidase from indigenous *Lactobacillus acidophilus* by ultrasonication: process optimization. *Chem. Eng. Commun.*, 2011, 198(5), 668–677. <https://doi.org/10.1080/00986445.2011.532738>
18. Bury D., Jelen P., Kaláb M. Disruption of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pres-

- sure homogenization and bead milling. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2001, 2(1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/s1466-8564\(00\)00039-4](https://doi.org/10.1016/s1466-8564(00)00039-4)
19. Murad H.A., Refaea R.I., Aly E.M. Utilization of UF-Permeate for Production of β -galactosidase by Lactic Acid Bacteria. *Pol. J. Microbiol.*, 2011, 60(2), 139–144. <https://doi.org/10.33073/pjm-2011-019>
 20. Bolívar-Jacobo N.A., Reyes-Villagrana R.A., Espino-Solís G.P., Rentería-Monterrubio A.L., Arévalos-Sánchez M.M., Sánchez-Vega R., Santellano-Estrada E., Chávez-Flores D., Chávez-Martínez A. The Effects of a High-Intensity Ultrasound on the Fermentative Activity and Kinetic Growth of *Lactobacillus Acidophilus* and *Lactobacillus Helveticus*. *Fermentation*, 2023, 9(4), 356. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040356>
 21. Петров А.Н., Матвеевко А.С., Стрижко М.Н. Исследование штаммов микроорганизмов, обладающих β -галактозидазной активностью. и их анализ. *Техника и технология пищевых производств*, 2013, 1, 1–5. <https://doi.org/10.21603/2074-9414>
 22. Лютова Л.В., Наумов Г.И., Шнырева А.В., Наумова Е.С. Молекулярный полиморфизм β -галактозидазных генов LAC4 у молочных и природных штаммов дрожжей *Kluyveromyces*. *Молекулярная биология*, 2021, 55(1), 75–85. <https://doi.org/10.31857/S0026898421010109>
 23. Лютова Л.В., Наумова Е.С. Межштаммовая гибридизация дрожжей *Kluyveromyces lactis* для создания штаммов, активно сбраживающих лактозу. *Биотехнология*, 2021, 37(4), 41–48. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-4-43-50>
 24. Лютова Л.В., Наумова Е.С. Сравнительный анализ сбраживания лактозы и ее компонентов. глюкозы и галактозы. межштаммовыми гибридами молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis*. *Биотехнология*, 2023, 39(1), 3–11. <https://doi.org/10.56304/S0234275823010064>
 25. Рябцева С.А., Котова А.А., Скрипнюк А.А. Дрожжи в переработке молочного сырья: монография. Санкт-Петербург: Изд-во Лань. 2019. 120.
 26. Inchaurredo V.A., Yantorno O.M., Voget C.E. Yeast growth and beta-galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process Biochem.*, 1994, 29(1), 47–54. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80058-8](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80058-8)
 27. Farkade V.D., Harrison S., Pandit A.B. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: An effective way to optimize the microbial cell disruption process. *Biochem. Eng. J.*, 2005, 23(3), 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.001>
 28. Córdova A., Henríquez P., Nuñez H., Rico-Rodríguez F., Guerrero C., Astudillo-Castro C., Illanes A. Recent Advances in the Application of Enzyme Processing Assisted by Ultrasound in Agri-Foods: A Review. *Catalysts*, 2022, 12(1), 107. <https://doi.org/10.3390/catal12010107>
 29. Medeiros F.O., Alves F.G., Lisboa C.R., Martins D.S., Burkert C.V., Kalil S.J. Ondas ultrassônicas epérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. *Quim Nova*, 2008, 31(2), 336–339. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200028>
 30. Rao M.V., Dutta S.M. Production of Beta-Galactosidase from *Streptococcus thermophilus* Grown in Whey. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, 34(2), 185–188. <https://doi.org/10.1128/aem.34.2.185-188.1977>
 31. Hsu C.A., Yu R.C., Chou C.C. Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, 104(2), 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.010>
 32. Geciova J., Bury D., Jelen P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry – review. *Int. Dairy J.*, 2002, 12(6), 541–553. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(02\)00038-9](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(02)00038-9)

Comparison of Beta-Galactosidase Activity of Yeast and Lactic Acid Bacteria after Separate and Co-Culture

M. A. Shpack^{a, #}, S. A. Ryabtseva^a, G. S. Anisimov^a,
S. N. Sazanova^a, A. A. Semchenko^a, and A. B. Chedenova^a

^aFederal State Autonomous Educational Institution for Higher Education
“North-Caucasus Federal University”, Stavropol, 355017 Russia

[#]e-mail: maria.bratsikhina@yandex.ru

Abstract—The influence of mechanical and physical methods of cell disruption on the activity of beta-galactosidases produced by lactose-fermenting yeast and lactic acid bacteria after separate and co-cultivation in whey permeate was studied. It was found that ultrasound and heat treatment are the most effective methods which allow obtaining the enzyme with activity significantly higher than after quartz sand and glass beads mealing. The beta-galactosidases received as result of co-cultivation of some yeast strains and viscous strains of lactic acid bacteria had activity higher than beta-galactosidases from individual producers. The highest lactase activity (0.8–0.9 IU/cm³) was obtained using heat treatment and the viscous strain of *Lactobacillus acidophilus* in combination with the yeasts *Kluyveromyces marxianus* Y-1338 and *Kluyveromyces lactis* Y-1333.

Keywords: beta-galactosidase. cell disruption. enzyme activity. *Kluyveromyces marxianus*. *Kluyveromyces lactis* *Lactobacillus acidophilus*. *Streptococcus thermophilus*. hybrid enzymes