

УДК 579.22+517.15

А. А. КОСТЕНЕВИЧ, Л. И. САПУНОВА, А. Г. ЛОБАНОК, И. О. ТАМКОВИЧ

СЕЛЕКЦИЯ АДАПТИРОВАННОГО К ЛАКТОЗЕ ШТАММА *ARTHROBACTER SULFONIVORANS* ЛФ-ГАЛ – ПРОДУЦЕНТА β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ И РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

(Поступила в редакцию 02.10.2014)

Введение. β -Галактозидаза (лактаза, β -галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.23) катализирует гидролиз лактозы (молочного сахара) с образованием глюкозы и галактозы. Нарушение синтеза фермента в организме человека и животных является причиной непереносимости молока и, как следствие, стойких расстройств пищеварения [1]. Это осложняется увеличивающимися объемами использования в производстве продуктов питания молочного сахара, а в кормопроизводстве – содержащей его молочной сыворотки. Поэтому применение β -галактозидазы для получения молочных продуктов, не содержащих лактозу или включающих ее минимальное количество, постоянно возрастает [2–6].

С использованием фермента перерабатывают также молочную (творожную и подсырную) сыворотку в глюкозо-галактозные сиропы, которыми заменяют белый сахар в хлебопечении и кондитерской промышленности. Из молочной сыворотки с использованием синтезирующих β -галактозидазы микроорганизмов получают корма и кормовые добавки для сельскохозяйственных животных, а также галактоолигосахариды [7–11]. Последние обладают пребиотическими свойствами, улучшают качественные и/или функциональные свойства пищи и кормов, влияют на здоровье человека и животных [12–15].

Препараты микробных β -галактозидаз высокой степени очистки входят в состав пищевых добавок и лекарственных препаратов, применяемых для компенсации врожденной или приобретенной лактозной интолерантности, а также в состав тест-наборов для определения лактозы и дифференциации патогенных микроорганизмов [16].

Все вышеназванное обуславливает актуальность создания и внедрения новых ресурсосберегающих биотехнологий получения препаратов β -галактозидаз. В Беларуси такие ферментные препараты не производятся, хотя объемы промышленной переработки молочного сырья и количество содержащих лактозу отходов постоянно возрастают наряду с увеличением доли населения с лактазной недостаточностью (гиполактазией), составляющей около 13 % [17].

Ранее нами были выявлены культуры бактерий, которые в среде с лактозой продуцируют внеклеточные β -галактозидазы [18, 19]. Штамм БИМ В-2242, характеризующийся максимальным синтезом β -галактозидазы и комплекса ферментов, которые катализируют гидролиз входящих в состав молока белков, жиров и углеводов, идентифицирован как *Arthrobacter sulfonivorans* [20].

Цель настоящей работы – получение нового штамма бактерий *Arthrobacter sulfonivorans* с повышенным уровнем синтеза β -галактозидазы и оптимизация питательной среды для его культивирования.

Объекты и методы исследования. Объектами изучения являлись продуцирующие β -галактозидазу бактерии – *Arthrobacter sulfonivorans* БИМ В-2242 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и его адаптированный к высоким концентрациям лактозы штамм *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ.

Культуры бактерий, выращенные при 27–29 °С в течение 3 сут в пробирках на пептонно-дрожжевом агаре (ПДА), включающем (в %): лактозу – 1,0; пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; агар-агар – 2,0 (рН 6,8), хранили при 4–6 °С методом пересевов с периодичностью 2 раза в год.

Адаптационную селекцию штамма *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 проводили поэтапно на агаризованной среде указанного выше состава с повышающимися концентрациями лактозы (1,0 % → 10,0 %). На каждом из этапов селекции после 10-кратных последовательных пересевов наиболее быстро растущих колоний оценивали их β-галактозидазную активность на ПДА с 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-β-D-галактопиранозидом (Х-гал) в качестве индикатора фермента. Варианты культуры, отобранные по интенсивному синему цвету колоний, затем культивировали глубинно в базовой среде для количественного определения эффективности синтеза β-галактозидазы. Полученные на каждом из этапов адаптации бактериальные культуры, обладающие повышенной по сравнению с исходным штаммом ферментативной активностью, отбирали для дальнейшей селекции.

Исследование культурально-морфологических и физиолого-биохимических особенностей бактерий проводили общепринятыми в микробиологии методами. Стабильность селектированного штамма оценивали по отсутствию спонтанно возникающих морфологических вариантов после 20 последовательных пересевов его на агаризованные среды различного состава и после хранения на этих средах в течение 12 мес.

По истечении сроков хранения (1, 3, 6 и 12 мес) бактериальные культуры реактивировали, для чего высевали истощающим штрихом на 4 сектора поверхности ПДА в чашки Петри и инкубировали при 27–29 °С в течение 3 сут. Жизнеспособность бактерий оценивали по числу колонизированных секторов и выражали в баллах (от 0 до 4), продукцию ими β-галактозидазы – после культивирования в жидкой питательной среде базового состава.

Инокуляцию питательной среды осуществляли водной суспензией клеток бактерий (4 об.%, $OP_{540}=0,2$), выращенных на ПДА при температуре 27–29 °С в течение 3 сут. Глубинное культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды на качалке (180–200 об/мин) при 27–29 °С в течение 3 сут. Базовая питательная среда для выращивания бактерий включала (в %): лактозу – 1,0; пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; исходный рН – 6,8.

При оптимизации состава питательной среды в качестве источников углерода использовали соединения различного химического строения в количестве 1,0 % по углероду, полисахариды – 1,0 % по весу. Содержание лактозы в среде варьировалось в пределах 0–3 % по весу (0–1,2 % по углероду). Минеральные азотсодержащие соединения ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, NH_4Cl , $NH_4H_2PO_4$, NH_4NO_3 , $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, KNO_3) вводили в среду в концентрации 0,03 % по азоту, органические – 1,0 % по весу. Содержание пептона и дрожжевого экстракта варьировалось в диапазоне концентраций 0–4 % и 0–1 % соответственно; $NH_4H_2PO_4$ – 0–0,3 % по азоту.

При уточнении потребностей бактерий в неорганическом фосфоре концентрация K_2HPO_4 составляла 0–2 %; $NH_4H_2PO_4$ – 0–0,75 % по фосфору. При изучении влияния катионов Mg^{2+} на рост бактерий и синтез β-галактозидазы сернокислую соль этого металла (0–2 %) вносили в приготовленную на бидистиллированной воде среду до стерилизации. По окончании культивирования биомассу бактерий отделяли центрифугированием (8000 г, 10 мин) и отмывали дистиллированной водой. Бесклеточные фильтраты культуральных жидкостей использовали для аналитических целей.

Активность β-галактозидазы определяли спектрофотометрически с использованием синтетического субстрата *o*-нитрофенилгалактозида (ОНФГ) [21]. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое катализирует гидролиз ОНФГ с образованием 1 мкмоль *o*-нитрофенола за 1 мин при 40 °С и рН 7,0. Активность фермента выражали в ед/мл культуральной жидкости, в ед/мг белка (удельная активность) и в ед/мг высушенной до постоянного веса биомассы (продуцирующая способность биомассы).

Величину накопления бактериальной биомассы устанавливали из предварительно построенного графика, отражающего зависимость оптической плотности суспензии клеток бактерий (OP_{540}) от их сухого веса, и выражали в мг/мл культуральной жидкости. Белок определяли по методу Bradford [22], величину рН – потенциометрически.

Полученные результаты представлены как среднее значение данных 2–3 опытов, выполненных в трех повторностях. При статистической обработке результатов рассчитывали доверительный интервал среднего арифметического для уровня вероятности 0,05 [23]. Разность двух средних величин признавалась достоверной при отсутствии перекрывания их доверительных интервалов. Для обработки полученных данных использовали компьютерную программу из пакета Microsoft Office.

Результаты и их обсуждение. Бактерии рода *Arthrobacter*, за редким исключением [24–26], не утилизируют лактозу и не продуцируют участвующую в ее метаболизме β -галактозидазу. В то же время выявленный нами штамм *Arthrobacter sulfonivorans* БИМ В-2242 характеризуется высоким уровнем синтеза β -галактозидазы (15,2 ед/мл), нетипичной для прокариот внеклеточной локализации и высокой удельной активности (101,3 ед/мг белка), что исключает необходимость сложной очистки фермента и позволяет рассматривать штамм в качестве потенциального продуцента β -галактозидазы [20].

С целью увеличения продукции фермента отобранным штаммом *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 проводили его многоступенчатую адаптационную селекцию на агаризованных средах с повышающимися концентрациями лактозы (1,0 % \rightarrow 10 %). Сравнительная количественная характеристика роста и β -галактозидазной активности исходного штамма и его вариантов, отобранных на агаризованной среде с X-гал на каждом из этапов адаптации для их дальнейшей селекции, приведена в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Сравнительная оценка роста исходного (БИМ В-2242) и адаптированных к лактозе штаммов *A. sulfonivorans* и синтеза ими внеклеточной β -галактозидазы

Штамм	Биомасса, мг/мл	Белок, мг/мл	Внеклеточная β -галактозидаза		
			ед/мл	ед/мгбиомассы	ед/мг белка
БИМ В-2242-1	7,80 \pm 0,35	0,15 \pm 0,005	15,0 \pm 0,55	1,92 \pm 0,09	100,0 \pm 4,29
БИМ В-2242-2	7,88 \pm 0,37	0,14 \pm 0,006	14,5 \pm 0,64	1,84 \pm 0,08	103,6 \pm 5,05
БИМ В-2242-3	8,00 \pm 0,36	0,15 \pm 0,005	15,8 \pm 0,68	1,98 \pm 0,09	105,3 \pm 4,58
БИМ В-2242-4	8,12 \pm 0,35	0,15 \pm 0,004	16,2 \pm 0,58	2,00 \pm 0,09	108,0 \pm 5,40
БИМ В-2242-5	8,40 \pm 0,32	0,15 \pm 0,005	16,8 \pm 0,62	2,00 \pm 0,08	112,0 \pm 5,22
БИМ В-2242-6	8,78 \pm 0,34	0,15 \pm 0,006	17,9 \pm 0,64	2,04 \pm 0,07	119,3 \pm 4,86
БИМ В-2242-7	9,12 \pm 0,36	0,16 \pm 0,007	18,7 \pm 0,69	2,05 \pm 0,09	116,9 \pm 4,98
БИМ В-2242-8	9,75 \pm 0,39	0,17 \pm 0,006	19,9 \pm 0,81	2,12 \pm 0,10	117,1 \pm 4,79
БИМ В-2242-9 (ЛФ-ГАЛ)	10,02 \pm 0,46	0,19 \pm 0,009	22,8 \pm 1,50	2,23 \pm 0,10	120,0 \pm 5,40
БИМ В-2242	7,82 \pm 0,38	0,15 \pm 0,006	15,2 \pm 0,80	1,94 \pm 0,09	101,3 \pm 4,66

Как видно, по сравнению с исходным штаммом *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 полученный на заключительном этапе селекции штамм БИМ В-2242-9, обозначенный акронимом ЛФ-ГАЛ, характеризовался в 1,3 раза повышенным накоплением биомассы (10,02 мг/мл) и внеклеточного белка (0,19 мг/мл) при росте в жидкой среде базового состава с лактозой. При этом адаптированный штамм превосходил исходный в 1,5 раза по эффективности синтеза внеклеточной β -галактозидазы (22,8 ед/мл против 15,2 ед/мл) и в 1,2 раза по ее удельной активности (120,0 ед/мг белка против 101,3 ед/мг белка).

Адаптированный к лактозе штамм *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ непатогенен и нетоксичен. На ПДА и мясопептонном агаре (МПА) образует колонии круглой формы с гладким краем и конусовидным профилем, гладкие, блестящие, непрозрачные, белые, с возрастом приобретающие светло-бежевый оттенок, однородной структуры, маслянистой вязкой консистенции, с равномерной способностью к эмульгированию. Диаметр колоний на 3-е сутки роста на МПА и ПДА с глюкозой (1,0 %) достигает 2,5–3,0 мм, на ПДА с глицерином – 1,0–1,5 мм, с лактозой – 2,0–2,5 мм (1,5 %) и 1,8–2,3 мм (10,0 %).

Ассимилирует лактозу, глюкозу, рамнозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, трегалозу, целлобиозу, лактулозу, мелибиозу, сахарозу, арабинозу, дульцит, маннит, сорбит, глицерин, крахмал, пектин. Из органических источников азота утилизирует бактопептон, пептон, триптон, казеинат натрия, альбумин, мочевины. Усваивает неорганический азот в аммонийной и нитратной формах. Желатину разжижает, молоко не пептонизирует. Оптимальные условия для роста – pH 6,0–8,0 и температура 27–29 °С.

Селектированный штамм *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ морфологически стабилен, о чем свидетельствует отсутствие спонтанно возникающих морфологических вариантов после 20 последовательных пересевов его на агаризованные среды различного состава и при хранении методом периодических пересевов. В то же время сохранение β-галактозидазной активности штамма определяется наличием в среде поддержания лактозы или содержащих ее веществ, например, молочной сыворотки (табл. 2). Так, через 1 год хранения в указанных условиях жизнеспособность бактерий и эффективность продукции ими β-галактозидазы соответствовали исходному уровню. Не выявлено также снижение исследуемых показателей при поддержании *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ на среде, содержащей одновременно лактозу и глюкозу. В то же время в процессе всего периода хранения на ПДА с глюкозой и ПДА без источника углерода достоверно уменьшался синтез фермента (соответственно до 12,8 и 5,0 ед/мл, или на 44 и 78 %) штаммом, а в последнем случае и его жизнеспособность.

Т а б л и ц а 2. Рост *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ и синтез β-галактозидазы в зависимости от длительности хранения методом периодических пересевов на ПДА различного углеводного состава

Углеводный состав ПДА	Длительность хранения, мес	Биомасса, мг/мл	Белок, мг/мл	β-Галактозидаза		
				ед/мл	ед/мг биомассы	ед/мг белка
Контроль	0	10,02±0,46	0,19±0,009	22,8±1,50	2,28±0,10	120,0±5,40
Молочная сыворотка, 10 %	1	10,16±0,52	0,19±0,010	22,6±1,40	2,22±0,09	118,9±5,23
	3	10,05±0,48	0,20±0,008	23,0±0,95	2,29±0,07	115,0±4,41
	6	10,38±0,51	0,20±0,010	23,9±1,03	2,30±0,08	119,5±4,35
	12	10,25±0,49	0,19±0,008	22,9±1,15	2,23±0,09	120,5±4,40
Лактоза, 10 %	1	9,88±0,46	0,19±0,009	22,9±1,21	2,05±0,10	106,8±4,27
	3	9,63±0,44	0,20±0,008	23,1±0,98	2,02±0,08	97,5±3,99
	6	9,95±0,45	0,19±0,007	23,0±0,80	1,81±0,07	94,7±4,08
	12	9,88±0,40	0,18±0,006	21,5±0,75	1,74±0,08	86,0±3,85
Лактоза, 10 % + глюкоза, 0,5 %	1	9,98±0,43	0,19±0,007	22,5±0,65	2,25±0,11	118,4±4,25
	3	9,91±0,45	0,20±0,008	24,0±0,61	2,35±0,10	120,0±4,30
	6	9,87±0,42	0,19±0,007	22,2±0,57	2,25±0,10	116,8±5,08
	12	10,08±0,44	0,19±0,008	23,2±0,38	2,30±0,11	122,1±3,01
Глюкоза, 2,0 %	1	10,12±0,43	0,19±0,007	21,5±1,05	2,12±0,09	113,2±5,09
	3	10,05±0,45	0,18±0,009	19,6±0,98	1,95±0,09	108,9±5,22
	6	10,35±0,42	0,18±0,008	17,5±0,80	1,69±0,08	97,2±4,83
	12	10,18±0,44	0,17±0,007	12,8±0,62	1,26±0,06	75,3±3,74
Без источника углерода	1	9,96±0,41	0,18±0,005	18,5±0,89	1,86±0,08	56,0±2,54
	3	8,96±0,45	0,16±0,004	12,4±0,61	1,38±0,06	53,6±2,35
	6	8,04±0,39	0,15±0,005	8,2±0,39	1,02±0,05	44,3±2,08
	12	7,42±0,47	0,14±0,006	5,0±0,19	0,67±0,03	38,5±1,85

С целью повышения эффективности биосинтеза фермента бактериями исследовали зависимость процесса от компонентного состава питательной среды. Ранее было установлено, что лактоза является необходимым ингредиентом питательной среды для продукции β-галактозидазы *A. sulfonivorans* БИМ Б-2242 [19]. Установлено, что оптимальная концентрация дисахарида, обеспечивающая максимум (26,2 ед/мл) синтеза фермента, составляла 1,5 % (рис. 1). Повышение содержания лактозы в среде до 3 % приводило к усилению роста бактерий в 1,6 раза и угнетению образования фермента в 120 раз.

Из источников органического азота (1,0 % по весу) наиболее подходящими для синтеза β-галактозидазы исследуемыми бактериями оказался пептон, как в отдельности, так и в сочетании

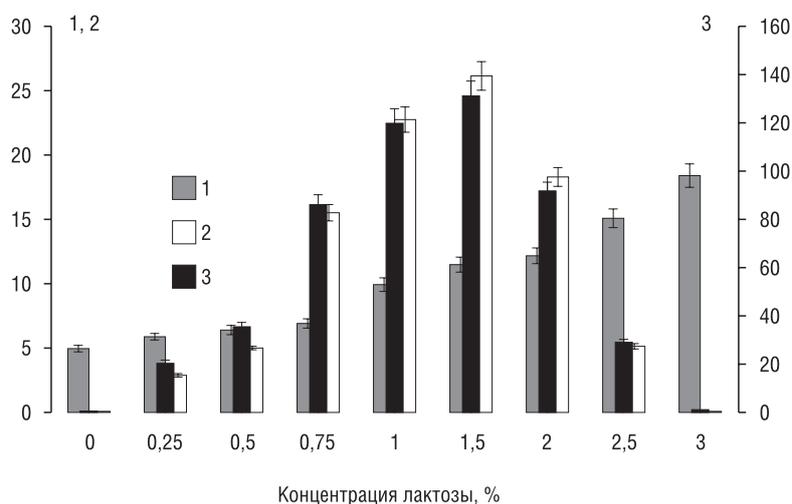


Рис. 1. Влияние лактозы на рост *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ и синтез β-галактозидазы: 1 – биомасса, мг/мл, 2 – β-галактозидаза, ед/мл, 3 – β-галактозидаза, ед/мг белка

с дрожжевым экстрактом (рис. 2). В обоих случаях максимум продукции фермента достигал 26,2 и 14,1 ед/мл, а величина его удельной активности – 131,0 и 93,9 ед/мг белка соответственно. Минимальный синтез β-галактозидазы у *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ отмечался в средах с соевым жомом (0,1 ед/мл), пшеничными отрубями (0,4 ед/мл), солодовым экстрактом (0,7 ед/мл) и меласой (0,9 ед/мл). В культуральной жидкости бактерий, растущих в средах с овсяной мукой и соевым жомом, активность фермента не обнаружена.



Рис. 2. Рост *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ и синтез β-галактозидазы в зависимости от источников органического азота: 1 – β-галактозидаза, ед/мл, 2 – β-галактозидаза, ед/мг белка

Установлено, что концентрация пептона, обеспечивающая в условиях опыта наибольший (25,5–26,7 ед/мл) выход внеклеточного фермента *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ, составляла 0,75–1,5 % (рис. 3, а). Добавление в среду с пептоном (1,0 %) дрожжевого экстракта в концентрации 0,1 % и менее стимулировало образование β-галактозидазы бактериями, а в большем количестве – ингибировало (рис. 3, б). При оптимальной концентрации дрожжевого экстракта (0,1 %) накопление фермента в среде достигало 30,1 ед/мл, а его удельная активность – 150,5 ед/мг белка.

Дополнение среды нитратными формами азота, за исключением нитратов магния и аммония, а также аммонийными солями многоосновных неорганических кислот в количестве 0,03 % по азоту приводило к снижению образования фермента *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ в 1,2–3,3 раза (рис. 4). Сравнимые с контрольным (30,1 ед/мл) уровни продукции β-галактозидазы обнаружены

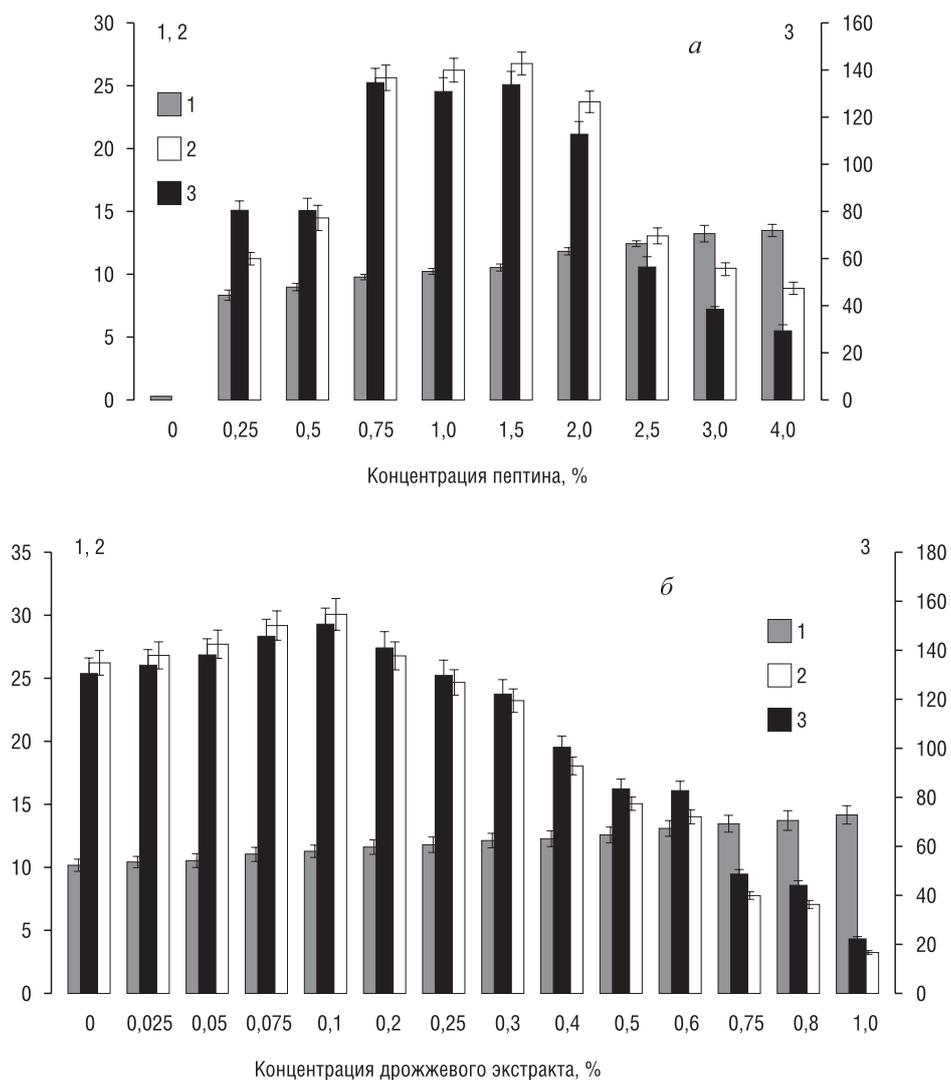


Рис. 3. Зависимость роста *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ и синтеза β-галактозидазы от концентрации пептона (а) и дрожжевого экстракта (б): 1 – биомасса, мг/мл, 2 – β-галактозидаза, ед/мл, 3 – β-галактозидаза, ед/мг белка

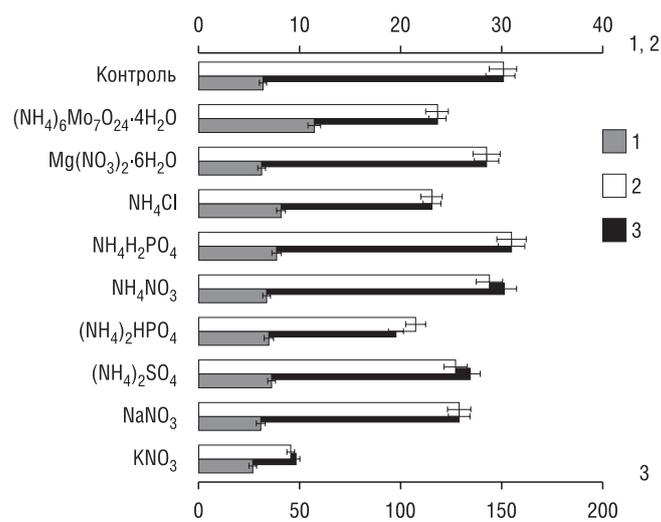


Рис. 4. Влияние источников неорганического азота на рост *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ и синтез β-галактозидазы: 1 – биомасса, мг/мл, 2 – β-галактозидаза, ед/мл, 3 – β-галактозидаза, ед/мг белка

у культуры, растущей в средах с одноосновными солями аммония (28,8 и 31,0 ед/мл), исключая хлорид аммония (23,1 ед/мл), а также с магнием азотнокислым (28,6 ед/мл). Полученные данные позволяют предположить существенную роль магния и фосфора в процессе синтеза ферментного белка у исследуемых бактерий.

Действительно, оптимальная для синтеза фермента концентрация $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ составляла 0,25 % по весу (0,025 % по магнию), что в 2,5 раза превышает содержание соли в составе базовой среды для культивирования *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ (рис. 5).

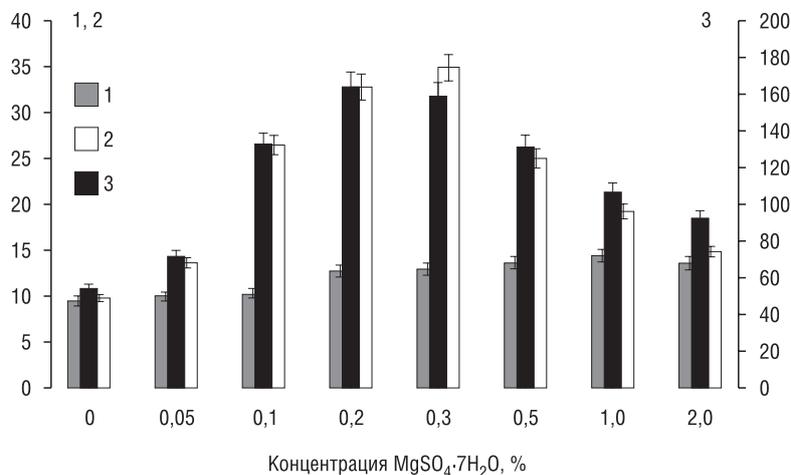


Рис. 5. Рост *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ и синтез β -галактозидазы в зависимости от концентрации $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1 – биомасса, мг/мл, 2 – β -галактозидаза, ед/мл, 3 – β -галактозидаза, ед/мг белка

При уточнении потребностей в неорганическом фосфоре установлено, что максимум образования β -галактозидазы (33,3–34,8 ед/мл) культурой достигался при содержании K_2HPO_4 в среде 0,3–0,5 % по весу, или 0,05–0,08 % по фосфору (рис. 6, а). Аналогичный эффект на синтез фермента оказывал также $NH_4H_2PO_4$ – комплексный источник неорганического азота и фосфора в количестве, эквивалентном 0,002–0,003 % по азоту, или 0,005–0,007 % по фосфору (рис. 6, б). Использование $NH_4H_2PO_4$ как источника фосфорного питания в установленной для K_2HPO_4 оптимальной концентрации 0,05 % по Р (0,02 % по N) угнетало продукцию β -галактозидазы *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ по сравнению с контролем на 17,4 %.

Сочетанное воздействие указанных минеральных соединений в испытанных дозах не превышало установленный для каждого из них максимальный эффект на синтез фермента и его удельную активность (табл. 3). Однако обращает на себя внимание тот факт, что более высокие уровни продуцирующей способности бактериальной биомассы (5,83 ед/мг биомассы) обеспечивал дигидрофосфат аммония, причем в существенно меньшей, чем гидрофосфат калия, концентрации – 0,005 % по Р (0,019 % по весу). Поэтому при получении препаратов β -галактозидазы, особенно высокоочищенных, экономически более целесообразным представляется использование $NH_4H_2PO_4$ в качестве источника фосфорного питания в составе сред для выращивания штамма *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ.

Т а б л и ц а 3. Влияние $NH_4H_2PO_4$ и K_2HPO_4 на рост *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ и синтез β -галактозидазы

Источник минерального питания, % Р	Биомасса, мг/мл	Белок, мг/мл	β -Галактозидаза		
			ед/мл	ед/мг белка	ед/мг биомассы
K_2HPO_4 0,05	13,2±0,63	0,22±0,009	34,8±1,32	158,2±5,56	2,63±0,13
$NH_4H_2PO_4$ 0,003	6,0±0,19	0,22±0,008	35,0±1,45	159,1±6,15	5,83±0,25
$NH_4H_2PO_4$ (0,003 % по Р) + K_2HPO_4	0,03	12,1±0,55	35,6±1,57	154,8±5,75	2,94±0,13
	0,05	13,4±0,61	32,4±1,30	147,3±6,07	2,42±0,11
	0,07	12,5±0,57	31,8±1,19	144,5±5,93	2,54±0,12

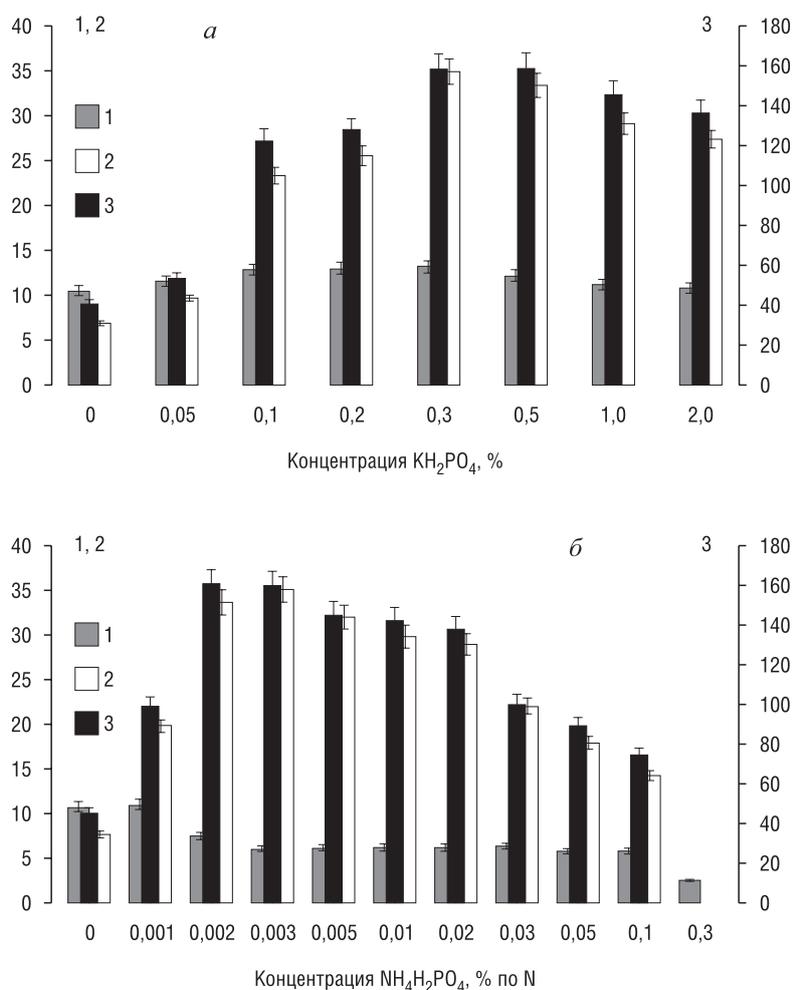


Рис. 6. Зависимость роста *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ и образования β-галактозидазы от концентрации K₂HPO₄ (а) и NH₄H₂PO₄ (б): 1 – биомасса, мг/мл, 2 – β-галактозидаза, ед/мл, 3 – β-галактозидаза, ед/мг белка

Заключение. Методом многоступенчатой адаптации бактерий *Arthrobacter sulfonivorans* БИМ В-2242 к лактозе получен морфологически и биохимически стабильный штамм *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ, который по эффективности синтеза внеклеточной β-галактозидазы (22,8 ед/мл) в 1,5 раза превосходит исходный штамм (15,2 ед/мл).

Разработан состав питательной среды для глубинного культивирования адаптированного к лактозе штамма, включающий (в %): лактозу – 1,5; пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,1; MgSO₄ · 7H₂O – 0,25; NH₄H₂PO₄ – 0,019 (или K₂HPO₄ – 0,3). При выращивании в среде указанного состава эффективность продукции β-галактозидазы селективированным штаммом *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ достигала 35 ед/мл, что в 1,5 раза превышало его исходный показатель и в 2,5 раза – показатель родительского штамма.

Полученные экспериментальные данные будут использованы для разработки на основе адаптированного к лактозе штамма *A. sulfonivorans* ЛФ-ГАЛ технологии производства внеклеточной β-галактозидазы для пищевой промышленности и кормопроизводства.

Литература

1. Itan Y., Jones B.L., Ingram C.J. et al. // BMC Evol Biol. 2010. 10:36 doi: 10.1186 /1471-2148-10-36.
2. Novalin S. // J. Biotechnol. 2005. Vol. 119. P. 212–218.
3. Mlichova Z., Rosenberg M. // J. Food Nutr. Res. 2006. Vol. 45. P. 47–54.
4. Panesar P.S. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2006. Vol. 81, N4. P. 530–543.
5. Добрян Е.И. Основные направления применения β-галактозидазы в производстве молочных консервов / Под ред. В. А. Полякова, Л. В. Римаревой. М., 2010. С. 35–43.

6. Klein M.P., Fallavena L.P., Schöffler J.N. et al. // Carbohydrate Polymers. 2013. Vol. 95. P. 465–470.
7. González Siso M.I. // Bioresource Technol. 1996. Vol. 57, N 1. P. 1–11.
8. Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Тамкович И.О., Костеневич А.А. Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: Материалы VI Междунар. науч. конф. Минск, 2–6 июня 2008 г. Мн., 2008. Т. 1. С. 174–177.
9. Kosseva M.R., Panesar P.S., Kaur G., Kennedy J.F. // Int. J. Biol. Macromol. 2009. Vol. 45. P. 437–447.
10. Díez-Municio M., Herrero M., Olano A., Moreno F.J. // Microbial Biotechnol. 2014. Vol. 7, N 4. P. 315–331.
11. Rodríguez-Colinas B., Fernández-Arrojo L., Ballesteros A. O., Plou F.J. // Food Chemistry. 2014. Vol. 145. P. 388–394.
12. Macfarlane G.T., Steed H., Macfarlane S. // J. Appl. Microbiol. 2008. Vol. 104. P. 305–344.
13. Panesar P.S., Kumari S., Panesar R. // Enzyme Res. 2010: 473137. doi: 10.4061/2010/473137.
14. Panesar P.S., Kumari S. // Biotechnol. Adv. 2011. Vol. 29, N 6. P. 940–948.
15. Lamsal B.P. // J. Sci. Food Agric. 2012. Vol. 92, N 10. P. 2020–2028.
16. Husain Q. // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. Vol. 30, N 1. P. 41–62.
17. Дымар О.В., Емельянова Л.Н., Зубик М.В. Инновационные технологии в пищевой промышленности: Материалы IX Междунар. науч.-практ. конф. Минск, 7–8 октября 2010 г. Мн., 2010. С. 11–17.
18. Сапунова Л.И., Костеневич А.А., Тамкович И.О., Лобанок А.Г. Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: Материалы VI Междунар. науч. конф. Минск, 2–6 июня 2008 г. Мн., 2008. Т. 1. С. 171–173.
19. Сапунова Л.И., Костеневич А.А., Лобанок А.Г., Тамкович И.О. // Докл. НАН Беларуси. 2013. Т. 57, №6. С. 70–74.
20. Сапунова Л.И., Костеневич А.А., Лобанок А.Г. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2014. Т. 58, №4. С. 71–77.
21. Kuby S.A. // J. Amer. Chem. Soc. 1953. Vol. 75, N 4. P. 890–896.
22. Bradford M.M. // Annal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
23. Тюпин Ю.Н. Статистический анализ данных на компьютере. М., 1998. С. 544.
24. Loveland J., Gutshall K., Kasmir J. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. Vol. 60, N 1. P. 12–18.
25. Nakagawa T., Fujimoto Y., Uchino M. et al. // Lett. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 37. P. 154–157.
26. Karasová-Lipovová P., Strnad H., Spiwok V. et al. // Enzyme Microbial Technol. 2003. Vol. 33. P. 836–844.

A. A. KASTSIANEVICH, L. I. SAPUNOVA, A. G. LOBANOK, I. A. TAMKOVICH

SELECTION OF LACTOSE-ADAPTED STRAIN *ARTHROBACTER SULFONIVORANS* LF-GAL – PRODUCER OF β -GALACTOSIDASE AND DEVELOPMENT OF MEDIUM COMPOSITION FOR ITS CULTIVATION

Summary

Multistage adaptation of bacteria *Arthrobacter sulfonivorans* BIM B-2242 to lactose resulted in selection of morphologically and biochemically stable strain *Arthrobacter sulfonivorans* LF-GAL exceeding 1.5 times the parent strain in efficiency of extracellular β -galactosidase synthesis (22.8 U/ml vs 15.2 U/ml).

Optimal composition of nutrient medium was formulated for submerged fermentation of strain *A. sulfonivorans* LF-GAL to secure rise in enzyme productivity up to 35 U/ml, which is 1.5 times higher than its initial level and 2.3 times superior to that of the parent strain. Obtained results will be used for developing bacterial β -galactosidase biotechnology.