

ISSN 1561-8323 (print)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 577.15+579.22

Поступило в редакцию 05.06.2017

Received 05.06.2017

Л. И. Сапунова, академик А. Г. Лобанок, И. О. Тамкович, А. А. Костеневич*Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь***СРАВНИТЕЛЬНАЯ КИНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОСТА ШТАММОВ
ARTHROBACTER SULFONIVORANS И СИНТЕЗА
ВНЕКЛЕТОЧНОЙ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ**

Аннотация. Представлены данные, характеризующие рост исходного БИМ В-2242 и адаптированного к лактозе БИМ В-499-Д штаммов бактерий *Arthrobacter sulfonivorans* и синтеза ими внеклеточной бета-галактозидазы. Установлено, что адаптированный штамм характеризуется более короткой, чем исходный штамм, лаг-фазой, раньше достигает максимальной удельной скорости роста ($\mu_{\max} = 0,316\text{--}0,319 \text{ ч}^{-1}$) и стационарной фазы развития. Синтез внеклеточного фермента у обоих штаммов протекает в экспоненциальной фазе роста и достигает одинаковой максимальной удельной скорости ($\epsilon_{\max} = 0,247\text{--}0,250 \text{ ед} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) со сдвигом, составляющим 6 ч. При этом штамм БИМ В-499-Д по уровню синтеза фермента в 1,6 раза превосходит штамм БИМ В-2242 при меньшей в 1,3 раза длительности процесса. Кинетические параметры роста ($t\mu_{\max} = 6\text{--}9 \text{ ч}$) исследуемых штаммов и образования ими бета-галактозидазы ($t\epsilon_{\max} = 18\text{--}24 \text{ ч}$) указывают на разобщенность процессов во времени не менее чем на 12–15 ч.

Ключевые слова: бактерии, *Arthrobacter sulfonivorans*, удельная скорость роста, внеклеточная бета-галактозидаза, удельная скорость синтеза фермента

Для цитирования: Сравнительная кинетическая характеристика роста штаммов *Arthrobacter sulfonivorans* и синтеза внеклеточной бета-галактозидазы / Л. И. Сапунова [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 4. – С. 83–88.

Leonida I. Sapunova, Academician Anatoli G. Lobanok, Iryna A. Tamkovich, Aliaksandr A. Kastsianevich*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***COMPARATIVE KINETIC CHARACTERISTIC OF THE *ARTHROBACTER SULFONIVORANS* STRAIN
GROWTH AND THE EXTRACELLULAR BETA-GALACTOSIDASE SYNTHESIS**

Abstract. The data are presented on kinetic correlations of the growth of parent and lactose-adapted strains of bacteria *Arthrobacter sulfonivorans* and the production of extracellular beta-galactosidase. It was found that the adapted strain BIM B-499-D was distinguished by a shorter lag phase than the parent strain BIM B-2242 by a reduced period of reaching a maximum specific growth rate ($\mu_{\max} = 0.316\text{--}0.319 \text{ h}^{-1}$) and a stationary phase of culture. Synthesis of extracellular enzyme in both strains occurred during the exponential growth phase and attained a peak specific rate ($\epsilon_{\max} = 0.247\text{--}0.250 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) with a 6 h time interval. BIM B-499-D exceeds BIM B-2242 1.6 times in the level of enzyme biosynthesis and in the duration of the process – 1.3 times. The kinetic parameters of growth ($t\mu_{\max} = 6\text{--}9 \text{ h}$) and beta-galactosidase production ($t\epsilon_{\max} = 18\text{--}24 \text{ h}$) established for the examined strains indicate the disconnection of processes in time at least by 12–15 h.

Keywords: bacteria, *Arthrobacter sulfonivorans*, specific growth rate, extracellular beta-galactosidase, specific rate of enzyme synthesis

For citation: Sapunova L. I., Lobanok A. G., Tamkovich I. A., Kastsianevich A. A. Comparative kinetic characteristics of *Arthrobacter sulfonivorans* strains growth and extracellular beta-galactosidase synthesis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 4, pp. 83–88 (in Russian).

Введение. Бета-галактозидаза (лактаза, β -галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.23) катализирует реакции трансгалактозилирования и гидролиза β -галактозидов, включая лактозу, в результате чего в первом случае образуются галактоолигосахариды, во втором – свободные моносахариды. Фермент востребован в пищевой, фармацевтической индустрии, медицинской диа-

гностике, в сенсорных и природоохранных технологиях, кормопроизводстве, что обуславливает непреходящий интерес исследователей к данному биокатализатору [1; 2].

Образование бета-галактозидазы широко распространено у микроорганизмов различной таксономической принадлежности [1], в том числе у представителей рода *Arthrobacter* [3]. Ранее в качестве высокоактивного продуцента фермента был отобран коллекционный штамм *Arthrobacter* sp. БИМ В-2242, который идентифицирован как *A. sulfonivorans* [4]. Методом его много-ступенчатой адаптивной селекции к лактозе получен новый штамм БИМ В-499-Д, на его основе разработан способ получения бета-галактозидазы.

Цель работы – исследование кинетических закономерностей роста исходного и адаптированного к лактозе штаммов бактерий *A. sulfonivorans* и синтеза ими бета-галактозидазы.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись штаммы БИМ В-2242 (исходный) и БИМ В-499-Д (адаптированный) бактерий *Arthrobacter sulfonivorans*, хранящиеся в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси.

В лабораторных условиях бактериальные культуры поддерживали при 4–6 °С методом периодических пересевов на пептонно-дрожжевой агар, содержащий (в %): лактозу – 10,0; пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; агар-агар – 2,0; pH 6,8.

Питательная среда для глубинного выращивания бактерий включала (в %): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; исходный pH – 6,8. Источником углеводного питания и индуктора синтеза бета-галактозидазы служила лактоза в количестве 1,5 % по весу.

В качестве инокулюма использовали суспензию клеток бактерий (3 об. %, $OP_{540} = 0,2 \pm 0,01$), выращенных в жидкой среде вышеприведенного состава при 28–30 °С в течение 24 ч.

Глубинное культивирование бактерий проводили в ферментере LiFlus 100L (Южная Корея) объемом 100 л (коэффициент заполнения – 0,5, аэрация – $1 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, скорость перемешивания – 200 об. мешалки $\cdot \text{мин}^{-1}$) при температуре 28–30 °С в течение 60 ч. Отбор проб проводили с периодичностью 1–3 ч.

Биомассу бактерий отделяли центрифугированием (10 °С, 15000g, 20 мин) с использованием центрифуги Sigma 3-18K (Sigma, Германия), трижды промывали 0,9 %-ным хлористым натрием, дистиллированной водой, 0,2 М Na-фосфатным буфером (pH 7,0) и дезинтегрировали. Для этого суспендированные в 0,2 М Na-фосфатном буфере (pH 7,0) клетки бактерий ($OP_{540} = 0,6 \pm 0,01$) подвергали ультразвуковой обработке на диспергаторе УЗДН-2Т (ООО «НПП «Укрросприбор», Украина) в течение 2 мин (8 экспозиций по 15 с) при частоте излучения 22 кГц в ледяной бане, после чего перемешивали в течение 1 ч и центрифугировали (10 °С, 15000g, 20 мин).

В бесклеточных супернатантах культуральных жидкостей и гомогенатах клеток определяли активность бета-галактозидазы согласно [5]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях проведения реакции (40 °С, pH 7,0) за 1 мин катализирует образование 1 мкмоль *o*-нитрофенола из *o*-нитрофенил- β -D-галактозида. Активность фермента выражали в условных единицах в расчете на 1 мл культуральной жидкости (ед $\cdot \text{мл}^{-1}$) или на 1 мг белка (удельная активность, ед $\cdot \text{мг}^{-1}$).

Величину накопления биомассы определяли из предварительно построенного графика, отражающего зависимость сухого веса бактерий от оптической плотности суспензии клеток (OP_{540}), и выражали в мг сухой массы в 1 мл культуральной жидкости (мг $\cdot \text{мл}^{-1}$).

Удельные скорости роста (μ , ч^{-1}) и синтеза бета-галактозидазы (ε , ед $\cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) вычисляли по формулам

$$\mu = dxdt^{-1}x^{-1}; \quad \varepsilon = dEdt^{-1}x^{-1},$$

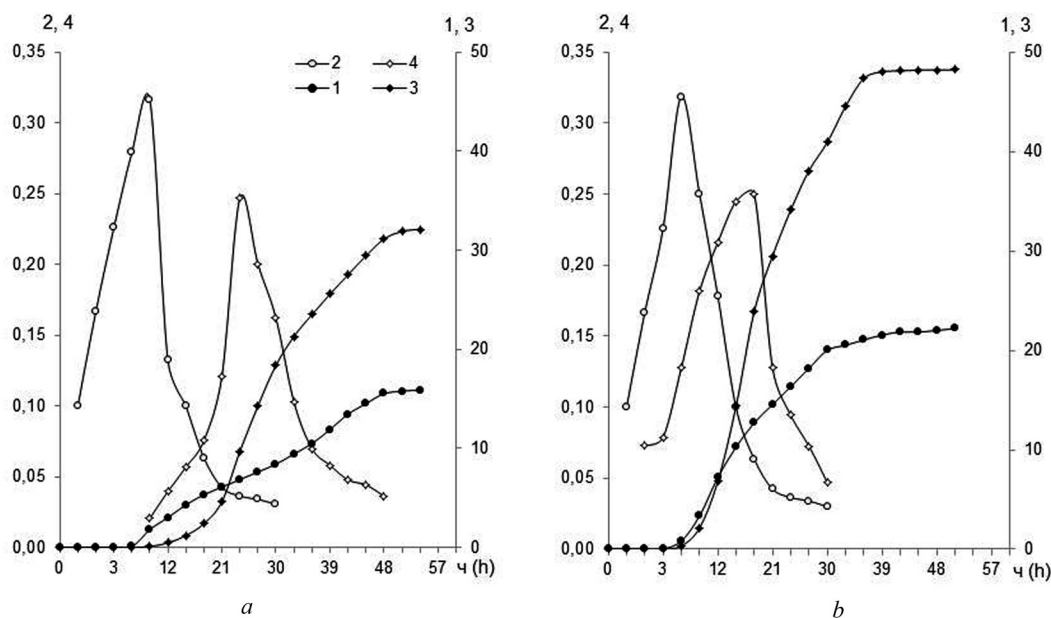
где x – биомасса (мг $\cdot \text{мл}^{-1}$); dx – прирост биомассы (мг $\cdot \text{мл}^{-1}$) за единицу времени dt (ч); E – активность фермента (ед $\cdot \text{мл}^{-1}$); dE – прирост активности (ед $\cdot \text{мл}^{-1}$) за единицу времени dt (ч^{-1}) [6].

Количество белка определяли согласно [8], величину pH – потенциметрически.

Приведенные результаты представляют собой среднее значение данных 2–3 опытов, выполненных в трех повторностях. При статистической обработке результатов с использованием компьютерной программы из пакета Microsoft Office рассчитывали доверительный интервал среднего арифметического для уровня вероятности 0,05. Разность двух средних величин признавалась достоверной при отсутствии перекрывания их доверительных интервалов.

Результаты и их обсуждение. Известно, что эукариоты продуцируют как вне-, так и внутриклеточные бета-галактозидазы, тогда как прокариоты – преимущественно внутриклеточные [1]. Имеются, однако, единичные сообщения о секретируемых формах бета-галактозидазы у некоторых бактерий. Например, следовая (0,0036–0,1173 ед/мл) активность фермента, экспортируемого за пределы цитоплазматической мембраны (в периплазматическое пространство), выявляется у *Flavobacterium* sp. в поздней экспоненциальной фазе роста [9], а также у *Bifidobacterium adolescentis* МВ 239 при переходе в стационарную фазу роста [10]. Относительно высокая бета-галактозидазная активность (5–19 ед/мл или 1,2 ед/мг белка) обнаруживается в бесклеточном фильтрате 12-суточной глубинной культуры *Bacillus* sp. МТСС 3088 [11]. Во всех упомянутых выше случаях фермент рассматривается как экстрацеллюлярный, хотя его появление в культуральной жидкости обнаруживается только после завершения роста бактерий, сопряженного с началом автолитического разрушения их клеток.

На внеклеточную локализацию бета-галактозидазы у исследуемых нами штаммов бактерий *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 (исходный) и БИМ В-499-Д (адаптированный) указывают данные, отражающие динамику роста культур и синтеза фермента в среде с лактозой в качестве единственного источника углеводного питания. Как видно из представленных графиков (рисунок), рост адаптированного к лактозе штамма характеризуется на 2–3 ч более короткой, чем у исходного штамма, лаг-фазой и более быстрым (на 12 ч, с 51 до 39 ч) наступлением стационарной фазы развития. Максимальный уровень накопления биомассы штаммами *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 (15,53–15,77 мг/мл) и БИМ В-499-Д (21,05–21,51 мг/мл) отмечается на 51 и 39 ч их роста, соответственно. В эти сроки наблюдается и максимум продукции бета-галактозидазы, активность которой в бесклеточном фильтрате культуральной жидкости обоих штаммов регистрируется, начиная с 3–6 ч от начала их культивирования. Таким образом, адаптированный к лактозе штамм



Рост *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 (a) и *A. sulfonivorans* БИМ В-499-Д (b) и синтез внеклеточной бета-галактозидазы: 1 – биомасса, мг · мл⁻¹; 2 – удельная скорость роста, ч⁻¹; 3 – активность бета-галактозидазы, ед · мл⁻¹; 4 – удельная скорость синтеза бета-галактозидазы, ед · мг⁻¹ · ч⁻¹

A. sulfonivorans БИМ В-2242 (a) и *A. sulfonivorans* БИМ В-499-Д (b) growth and extracellular beta-galactosidase synthesis: 1 – biomass, mg · ml⁻¹; 2 – specific growth rate, h⁻¹; 3 – beta-galactosidase activity, U · ml⁻¹; 4 – specific rate of beta-galactosidase synthesis, U · mg⁻¹ · h⁻¹

БИМ В-499-Д обладает в 1,6 раза более высоким, чем исходный штамм БИМ В-2242, уровнем продукции фермента (48,0–48,22 ед/мл против 29,5–31,1 ед/мл) при меньшей в 1,3 раз длительности процесса.

Свидетельством того, что *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 и БИМ В-499-Д продуцируют секретруемую бета-галактозидазу, являются также результаты оценки вне- и внутриклеточной активности фермента (таблица). Согласно полученным данным, активность бета-галактозидазы в клетках обеих культур постепенно повышается в течение первых 9–24 ч роста и далее остается на постоянном уровне, не превышающем 0,18–0,21 ед/мг белка. В то же время уровень накопления фермента, который обнаруживается в фильтрате культуральной жидкости у исходного штамма на 6 ч и у адаптированного к лактозе на 3 ч роста, увеличивается постоянно и достигает к концу ферментации величины соответственно 75,95–76,48 и 117,61–120,53 ед/мг белка. Таким образом, активность внеклеточной бета-галактозидазы у штаммов *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 и БИМ В-499-Д соответственно в 403 и 574 раза выше, чем активность внутриклеточной, что бесспорно указывает на внеклеточную локализацию ферментного белка.

Сравнительная характеристика активности внеклеточной и клеточносвязанной бета-галактозидазы в динамике роста *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 и *A. sulfonivorans* БИМ В-499-Д

Comparative characteristics of extracellular and cell-bound beta-galactosidase activity of *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 и *A. sulfonivorans* БИМ В-499-D in growth dynamics

Штамм Strain	Длительность культивирования, ч Time of cultivation, h	Бета-галактозидаза, ед · мг ⁻¹ белка Beta-galactosidase, U · mg ⁻¹ of protein	
		внеклеточная extracellular	клеточносвязанная cell-bound
БИМ В-2242	3	0	0
	6	0,01	0,01
	9	0,96	0,03
	12	3,16	0,05
	24	42,26	0,12
	48	75,95	0,19
	60	76,48	0,19
БИМ В-499-Д	3	0,05	0,01
	6	2,71	0,04
	9	15,36	0,06
	12	40,12	0,09
	24	97,49	0,14
	48	120,53	0,21
	60	117,61	0,22

Анализ кинетических параметров, связывающих изменение активности ферментсинтезирующей системы с ее стабильностью и с удельной скоростью роста микроорганизмов [6], представляется целесообразным при выборе оптимальных условий ведения ферментационных процессов. Исследование синтеза вторичных метаболитов, в том числе ферментов, в динамике роста микробных культур позволило установить, что для многих из них характерен двухфазный процесс обмена веществ. В [12] обобщены данные, касающиеся разобщенности во времени (от 20 до 30 ч, в зависимости от источника углерода) процессов роста грибов *Aspergillus alliaceus* и *Penicillium digitatum* и образования ими внеклеточных пектингидролаз. Замедление в последнем случае скорости роста, обусловленное снижением температуры культивирования микромицета, ведет к возрастанию в 2–5 раз удельной скорости синтеза ферментов за счет увеличения стабильности мРНК. Концентрация специфических мРНК является также фактором, лимитирующим скорость синтеза альфа-амилазы, карбоксиметилцеллюлазы и полигалактуроназы у *Aspergillus niger*, карбоксиметилцеллюлазы – у *Penicillium variabile*. Обратной зависимостью от скорости роста характеризуется синтез целлюлазы у *Trichoderma lignorum*, альфа-амилазы, протеазы и рибонуклеазы – у *Bacillus amyloliquefaciens*, и эти процессы также разобщены во времени.

Сходная картина наблюдается и в случае бактерий *A. sulfonivorans*. Установлено, что достижение максимальной удельной скорости роста – $\mu_{\max} = 0,316–0,319 \text{ ч}^{-1}$ у адаптированного к лактозе штамма БИМ В-499-Д имеет место на 3 ч раньше, чем у исходного штамма БИМ В-2242 (рисунок). Синтез бета-галактозидазы у обоих штаммов активно протекает в экспоненциальной фазе роста и достигает у них одинаковой максимальной удельной скорости ($\epsilon_{\max} = 0,247–0,250 \text{ ед} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) с разрывом, составляющим 6 ч.

Выявленные кинетические параметры роста *A. sulfonivorans* БИМ В-2242 и БИМ В-499-Д и образования ими фермента свидетельствуют о разобщенности процессов во времени не менее чем на 12–15 ч ($t_{\mu_{\max}} = 6–9 \text{ ч}$ и $t_{\epsilon_{\max}} = 18–24 \text{ ч}$), что характерно для экстрацеллюлярных продуктов вторичного метаболизма. Так, максимумы удельных скоростей роста родительского и адаптированного к пероксиду водорода гриба *Penicillium piceum* и синтеза внеклеточной каталазы расходились между собой во времени, как и в случае *A. sulfonivorans*, на 15 ч [13]. Разобщение процессов роста исходного и мутантного штаммов *Penicillium funiculosum* и синтеза внеклеточной глюкооксидазы достигало 26 ч [14], а роста дрожжей *Saccharomyces pastorianus* в среде с этанолом и продукции полигалактуроназы – 48 ч [15].

Заключение. Определены кинетические параметры роста исходного БИМ В-2242 и адаптированного к лактозе БИМ В-499-Д штаммов *A. sulfonivorans* и синтеза бета-галактозидазы, указывающие на двухфазность анализируемых процессов. Полученные результаты отражают общие закономерности, характерные для синтеза микроорганизмами вторичных метаболитов внеклеточной локализации. Дальнейшее исследование образования бета-галактозидазы в условиях, лимитирующих и/или стимулирующих рост, позволит регулировать процесс с целью повышения продуктивности адаптированного к лактозе штамма *A. sulfonivorans* БИМ В-499-Д.

Список использованных источников

1. Husain, Q. β -Galactosidases and their potential applications: a review / Q. Husain // Crit. Rev. Biotechnol. – 2010. – Vol. 30, N 1. – P. 41–62. doi.org/10.3109/07388550903330497
2. Anisha, G. S. β -Galactosidases / G. S. Anisha // Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Production, Isolation and Purification of Industrial Products / ed. A. Pandey, S. Negi, C. R. Soccol. – Elsevier Publ., 2017. – P. 395–421.
3. Kastsianevich, A. A. Beta-galactosidases of *Arthrobacter* bacteria: multiple forms or isoenzymes? / A. A. Kastsianevich, L. I. Sapunova // Научные стремления – 2011: материалы Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых, Минск, 14–18 ноября 2011 г. – Минск: Белорусская наука, 2011. – Т. 1. – С. 200–206.
4. Screening, identification and characterization of *Arthrobacter* species bacterium producing extracellular beta-galactosidase / A. A. Kastsianevich [et al.] // Труды БГУ, сер. физиол., биохим. и молекул. основы функц. биосистем. – 2014. – Т. 9, Ч. 1. – С. 76–83.
5. Kuby, S. A. Purification and kinetics of β -galactosidase from *E. coli*, strain K-12 / S. A. Kuby, H. A. Lardy // J. Amer. Chem. Soc. – 1953. – Vol. 75, N 4. – P. 890–896. doi.org/10.1021/ja01100a035
6. Terui, G. Kinetics of hydrolase production by microorganisms / G. Terui // Pure Appl. Chem. – 1973. – Vol. 56, N 3. – P. 377–395. doi.org/10.1351/pac197336030377
7. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – С. 66–70.
8. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
9. Secreted β -galactosidase from a *Flavobacterium* sp. isolated from a low-temperature environment / H. P. Sørensen [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 70, N 5. – P. 548–557. doi.org/10.1007/s00253-005-0153-0
10. Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides / A. Amaretti [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73, N 11. – P. 2637–2644. doi.org/10.1128/AEM.02914-06
11. Purification and characterization of a novel β -galactosidase from *Bacillus* sp. MTCC 3088 / S. Chakraborti [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 24, N 1. – P. 58–63. doi.org/10.1038/sj.jim.2900770
12. Михайлова, Р. В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии / Р. В. Михайлова. – Минск: Белорусская наука, 2007. – 407 с.
13. Мороз, И. В. Кинетические характеристики процессов роста *Penicillium piceum* F-648 и *P. piceum* F-648 A3 и синтеза каталазы / И. В. Мороз, Р. В. Михайлова // Молекулярная и прикладная генетика: материалы Междунар. науч. конф., 17–18 нояб. 2005 г. – Минск, 2005. – С. 239.
14. Semashko, T. V. Growth characteristics and glucose oxidase production in mutant *Penicillium funiculosum* strains / T. V. Semashko, R. V. Mikhailova, A. G. Lobanok // Microbiology (Mikrobiologiya). – 2004. – Vol. 73, N 3. – P. 286–291. doi.org/10.1023/B:MICI.0000032238.29220.f7
15. Астапович, Н. И. Некоторые особенности роста *Saccharomyces pastorianus* и образования полигалактуроназы / Н. И. Астапович, Н. Е. Рябая // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 1. – С. 37–41.

References

1. Husain Q. β Galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Review in Biotechnology*, 2010, vol. 30, no. 1, pp. 41–62. doi.org/10.3109/07388550903330497
2. Anisha G. S. β -Galactosidases. Pandey A., Negi S., Soccol C. R. (eds.). *Current developments in biotechnology and bio-engineering. Production, isolation and purification of industrial products*, Elsevier Publ., 2017, pp. 395–421.
3. Kastsianevich A. A., Sapunova L. I. Beta-galactosidases of *Arthrobacter* bacteria: multiple forms or isoenzymes? *Nauchnye stremeniia–2011: materialy mezhdunarodnoi nauchno-practicheskoi konferentsii molodykh uchenykh, Minsk, 14–18 noiabria 2011 goda* [Research aspirations–2011: Proceedings of International conference of young scientists, November 14–18, 2011], Minsk: Belorusskaia Nauka Publ., 2011, vol. 1, pp. 200–206 (in Russian).
4. Kastsianevich A. A., Sapunova L. I., Bazhanov D. P., Lisov A. V., Leontievsky A. A. Screening, identification and characterization of *Arthrobacter* species bacterium producing extracellular beta-galactosidase. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekuliarnye osnovy funktsionirovaniia biosistem* [Works of the Belarussian State University. Physiological, biochemical and molecular bases of functioning of biosystems], 2014, vol. 9, part 1, pp. 76–83 (in Russian).
5. Kuby S. A., Lardy H. A. Purification and kinetics of β -galactosidase from *E.coli*, strain K-12. *Journal of the American Chemical Society*, 1953, vol. 75, no. 4, pp. 890–896. doi.org/10.1021/ja01100a035
6. Terui G. Kinetics of hydrolase production by microorganisms. *Pure and Applied Chemistry*, 1973, vol. 56, no. 3, pp. 377–395. doi.org/10.1351/pac197336030377
7. Osterman L. A. *Methods of proteins and nucleic acids investigation: Electrophoresis and ultracentrifugation*, Moscow, Nauka Publ., 1981, pp. 66–70 (in Russian).
8. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
9. Sørensen H. P., Porsgaard T. K., Kahn R. A., Stougaard P., Mortensen K. K., Johnsen M. G. Secreted β -galactosidase from a *Flavobacterium* sp. isolated from a low-temperature environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 70, no. 5, pp. 548–557. doi.org/10.1007/s00253-005-0153-0
10. Amaretti A., Bernardi T., Tamburini E., Zanoni S., Lomma M., Matteuzzi D., Rossi M. Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, vol. 73, no. 11, pp. 2637–2644. doi.org/10.1128/AEM.02914-06
11. Chakraborti S., Sani R. K., Banerjee U. C., Sobti R. C. Purification and characterization of a novel β -galactosidase from *Bacillus* sp. MTCC 3088. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000, vol. 24, no. 1, pp. 58–63. doi.org/10.1038/sj.jim.2900770
12. Mikhailova R. V. *Macerating enzymes of mycelia fungi in biotechnology*. Minsk, Belorusskaia nauka Publ., 2007. 407 p. (in Russian).
13. Moroz I. V., Mikhailova R. V. Kinetic characteristics of *Penicillium piceum* F-648 и *P. piceum* F-648 A3 growth and catalase synthesis processes. *Moleculiarnaia i prikladnaia genetika: materialy mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, 17–18 noiabria 2005 goda* [Molecular and applied genetics: Theses of International scientific conference, November 17–18, 2005]. Minsk, 2005, p. 239. (in Russian).
14. Semashko T. V., Mikhailova R. V., Lobanok A. G. Growth characteristics and glucose oxidase production in mutant *Penicillium funiculosum* strains. *Microbiology*, 2004, vol. 73, no. 3, pp. 286–291. doi.org/10.1023/B:MIC1.0000032238.29220.f7
15. Astapovich N. I., Riabaia N. E. Specific features of growth and the biosynthesis of polygalacturonase in *Saccharomyces pastorianus*. *Mikrobiologiya = Microbiology*, 1996, vol. 65, no. 1, pp. 37–41 (in Russian).

Информация об авторах

Сапунова Леонида Ивановна – канд. биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: leonida@mbio.bas-net.by.

Лобанок Анатолий Георгиевич – академик, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aglobanok@gmail.com.

Тамкович Ирина Олеговна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina-kazakevich@tut.by.

Костеневич Александр Александрович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.kastsianevich@gmail.com.

Information about the authors

Sapunova Leonida Ivanovna – Ph. D. (Biology), Chief researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leonida@mbio.bas-net.by.

Lobanok Anatoli Georgievich – Academician, D. Sc. (Biology), Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aglobanok@gmail.com.

Tamkovich Iryna Alegauna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina-kazakevich@tut.by.

Kastsianevich Aliksandr Aliksandravich – Ph. D. (Biology), Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.kastsianevich@gmail.com.