

Ю.А. Табакова* [Y. Al. Tabakova],
С. А. Рябцева [S. A. Ryabtseva],
М. А. Шпак [M. Al. Shpak],
С. Н. Сазанова [S. N. Sazanova]¹

УДК 663.15
DOI: 10.37493/2307-910X.2022.4.7

МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ β-ГАЛАКТОЗИДАЗ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОСИНТЕЗЕ ЛАКТУЛОЗЫ

METHODS FOR β-GALACTOSIDASE IMMOBILIZATION AND THEIR USE IN LACTULOSE BIOSYNTHESIS

ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия
FSAEI HE "North-Caucasus Federal University", Stavropol, Russia
e-mail: tabakova.j@yandex.ru

Аннотация

β-галактозидаза является одним из наиболее важных ферментов, используемых в пищевой промышленности, который может применяться в пищевой, технологической и экологической областях. Использование β-галактозидазы для гидролиза лактозы в молоке и сыворотке является одним из перспективных ферментативных применений в пищевой и молочной перерабатывающей промышленности. Фермент можно использовать как в растворимой, так и в иммобилизованной формах. Было обнаружено, что иммобилизация является удобным методом для придания ферменту термостабильности и предотвращения потери ферментативной активности.

Целью данного обзора является обобщение и анализ информации о методах иммобилизации фермента β-галактозидазы и возможности его применения для биосинтеза лактулозы. Несмотря на то, что в большинстве отраслей промышленности по-прежнему гидролизуют лактозу свободным ферментом, иммобилизация β-галактозидазы представляет большой интерес из-за ее потенциальных преимуществ. Изучено, что иммобилизованные ферменты способны повысить их стабильность и устойчивость к условиям среды. Также иммобилизация фермента дает возможность использовать его повторно, и его можно легко отделить от продукта. Эти преимущества позволяют существенно снизить стоимость процесса.

Различают следующие методы иммобилизации: физическая адсорбция, ковалентное связывание и метод захвата. Адсорбция является простейшим методом иммобилизации, основанный на слабых силах между матрицей и ферментами, к которым относятся силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобные взаимодействия и водородные связи, а также более сильные ионные взаимодействия. Ковалентное связывание представляет собой удержание ферментов на поверхности носителя за счет образования ковалентной связи. Метод захвата заключается в физическом заключении ферментов в небольшом пространстве, например, в мембранах или матрицах. Необходимо правильно подобрать материал для иммобилизации, он должен обеспечивать возможность повторного использования и легкого извлечения фермента.

Нанобиокатализаторы выступают как инновационная область, сочетающая биотехнологии и нанотехнологии с целью повышения стабильности ферментов в биотехнологических приложениях. Нанобиокатализаторы представлены в виде наноллистов, каркасов из нановолокон, нанотрубок и нанокомпозитов для получения наноматриц с большой площадью поверхности. Кроме того, их поверхность можно легко регулировать для введения лиганда для сборки ферментов.

В настоящее время получение лактулозы в промышленных условиях основано на изомеризации лактозы в щелочных средах при высоких температурах. Недостатком таких технологий является дорогостоящее удаление катализаторов, оставшейся лактозы

Ключевые слова: иммобилизация, β -галактозидаза, методы иммобилизации, биосинтез, лактулоза.

Abstract

β -galactosidase is one of the most important enzymes used in the food industry, which can be applied in food, technology and environmental fields. The use of β -galactosidase for the hydrolysis of lactose in milk and whey is one of the promising enzymatic applications in the food and dairy processing industries. The enzyme can be used in both soluble and immobilized forms. Immobilization has been found to be a convenient method for rendering the enzyme thermally stable and preventing loss of enzymatic activity.

The purpose of this review is to summarize and analyze information on the methods of immobilization of the β -galactosidase enzyme and the possibility of its application for the biosynthesis of lactulose. Although most industries still hydrolyze lactose with the free enzyme, immobilization of β -galactosidase is of great interest due to its potential benefits. It has been studied that immobilized enzymes can increase their stability and resistance to environmental conditions. Also, the immobilization of the enzyme makes it possible to reuse it and it can be easily separated from the product. These advantages can significantly reduce the cost of the process.

There are the following methods of immobilization: physical adsorption, covalent bonding and capture method. Adsorption is the simplest immobilization method based on weak forces between the matrix and enzymes, which include van der Waals forces, hydrophobic interactions and hydrogen bonds, as well as stronger ionic interactions. Covalent bonding is the retention of enzymes on the surface of a support by forming a covalent bond. The entrapment method consists in the physical confinement of enzymes in a small space, such as in membranes or matrices. It is necessary to choose the right material for immobilization, it must be reusable and easy to extract the enzyme.

At present, the production of lactulose under industrial conditions is based on the isomerization of lactose in alkaline media at high temperatures. The disadvantage of such technologies is the costly removal of catalysts, remaining lactose and reaction by-products. The solution to this problem may be the use of enzymes to produce lactulose. Under certain conditions, in the presence of fructose, β -galactosidases can catalyze the reactions of lactulose synthesis.

Key words: immobilization, β -galactosidase, methods of immobilization, biosynthesis, lactulose.

Введение

Ферменты, как ключевые элементы биотрансформаций, могут использоваться в растворенной или иммобилизованной форме [36]. Технология иммобилизации обеспечивает значительные преимущества по сравнению со свободными ферментами. Иммобилизованные ферменты снижают стоимость процесса за счет повышения стабильности фермента, возможности повторного использования, а также того факта, что их можно легко отделить от продукта с лучшим контролем за работой [10, 42].

Разработка нового поколения иммобилизованных (гетерогенных) биокатализаторов является приоритетной задачей в связи с растущим интересом к промышленным продуктам, полученным здоровым и устойчивым способом [9].

Иммобилизация ферментов означает, что фермент заключен в фазу (матрица/носитель), отличную от фазы субстратов и продуктов. В одних случаях иммобилизованные ферменты, захваченные или локализованные на твердом носителе, сохраняют свою каталитическую активность, благодаря чему их можно использовать многократно и непрерывно, в других случаях иммобилизация улучшает их каталитические и эксплуатационные свойства. Для иммобилизации ферментов используются различные методы иммобилизации [9].

Фермент β -галактозидаза применяется в пищевой и молочной промышленности, но умеренная стабильность фермента является одним из ограничений, препятствующих общему внедрению биокатализаторов в промышленных масштабах. Стабильность мономерных или мультимерных ферментов также может быть повышена за счет многоточечной и многосубъединичной ковалентной иммобилизации и инженерии ферментов посредством иммобилизации [26]. Иммобилизация β -галактозидазы сильно изменяет свойства фермента в кинетически контролируемом синтезе. Операционная стабильность также зависит от реакционной среды и биокатализатора.

Целью работы выступает обобщение и анализ информации о методах иммобилизации фермента β -галактозидазы и возможности его применения для биосинтеза лактулозы. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства по теме: «Создание первого в России высокотехнологичного 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 высокотехнологичного 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».

Методы иммобилизации β -галактозидаз

В зависимости от молекулярных сил, возникающих между ферментами и твердыми носителями, методы иммобилизации можно в целом разделить на следующие: физическая адсорбция, ковалентное связывание и улавливание. Что касается подложки, она должна быть рентабельной, обеспечивать возможность повторного использования и легкое извлечение фермента, повышая его стабильность и долговечность. [9].

Как правило, наиболее часто применяемым методом является ковалентная иммобилизация (поверхностная силанизация с последующим связыванием глутарового альдегида – трехступенчатая иммобилизация) на твердом носителе, таком как шарики, мембраны, поверхность микрореактора и т. д. [39]. Основное преимущество заключается в образовании прочной связи фермент-поверхность, которая имеет несколько преимуществ, таких как прочность и долговечность иммобилизованных ферментов. Это важно, поскольку предотвращает отделение фермента и его выщелачивание из микрореактора. Второе преимущество связано со структурой фермента. Иммобилизация вводит дополнительное многоточечное присоединение, что делает третичную структуру фермента более стабильной и устойчивой к рефолдингу [26]. С другой стороны, образование дополнительных прикреплений может повлиять на деформацию активного центра, что приведет к снижению активности. Поэтому перед иммобилизацией важно получить информацию о конформации белка, чтобы обеспечить правильный метод иммобилизации [27].

Одним из подходящих и наиболее часто используемых природных полимеров для иммобилизации ферментов является хитозан. Он характеризуется как биосовместимый, нетоксичный, физиологически инертный и гидрофильный материал, обладает уникальной характеристикой замечательного сродства к белкам и широко применяется в медицине и биологических исследованиях. Кроме того, хитозан положительно заряжен в кислых водных растворах, имеет высокую плотность заряда [54].

Многослойный иммобилизованный фермент можно использовать в реакторе биокатализатора для производства галактоолигосахаридов из лактозы и гидролиза лактозы до глюкозы и галактозы. Метод модификации поверхности послойными полиэлектролитными мультислоями позволяет очень точно контролировать и изменять широкий диапазон физико-химических свойств носителя – толщину, заряд, гидрофильно-гидрофобный баланс. Метод основан на последовательном осаждении противоположно

заряженных полиэлектролитов из их растворов за счет электростатических взаимодействий. Сборка основана на спонтанной адсорбции, для поддержания функциональности поверхности не требуется стехиометрического контроля, а собранные пленки обладают хорошей термической и механической стабильностью [54].

Было исследовано влияние размера подложки на свойства иммобилизации ферментов с использованием макрочастиц и наночастиц хитозана [24]. В работе [47] альгинатно-хитозановые микрокапсулы ядро-оболочка были приготовлены как новая биосовместимая матричная система для иммобилизации фермента β -галактозидазы, в которой катализатор заключен либо в жидком, либо в твердом ядре, а транспортные свойства субстрата и продукта определяются проницаемостью оболочки. Таким образом, биологический агент защищен внутренним биосовместимым альгинатным ядром, а внешняя оболочка из хитозана определяет транспортные свойства. Исследования [47] показали, что скорость превращения 2-нитрофенил- β -галактопиранозида в 2-нитрофенол была выше в случае использования микрокапсул с альгинат-хитозаном кальция по сравнению с микрокапсулами с альгинат-хитозаном бария. Однако микрокапсулы альгинат бария-хитозан улучшали стабильность фермента при 37 °С по сравнению с микрокапсулами альгинат кальция-хитозан или свободным ферментом.

Были предприняты попытки иммобилизовать β -галактозидазы *Lactobacillus reuteri*, LacLM-типа, и *Lactobacillus bulgaricus*, LacZ-типа, на хитине с использованием хитин-связывающего домена *Bacillus circulans* WL-12 хитиназа A1 [35]. Дисплей клеточной поверхности был представлен как новая стратегия иммобилизации ферментов, которая включает использование пищевого организма *Lactobacillus plantarum* как в качестве клеточной фабрики для производства ферментов, пригодных для пищевых применений, так и в качестве носителя для иммобилизации сверхэкспрессированного фермента путем закрепления фермента на поверхности клетки [28, 30]. Это позволяет использовать микробные клетки сразу после стадии ферментации в качестве иммобилизованных биокатализаторов, предлагая известные преимущества иммобилизации (повторное использование фермента, стабилизация и т. д.) вместе со значительным упрощением производственного процесса, поскольку последующая дорогостоящая обработка клеток, продуцирующих фермент (разрушение клеток, очистка белков и т. д.), а также использование материала-носителя не потребуется [34].

Иммобилизация β -галактозидазоактивных дрожжей *Kluyveromyces fragilis* и *Kluyveromyces lactis* на хитозан показала ферментативную активность 0,9 – 2,2 ед / мг сухой клеточной массы. Ферментативная активность иммобилизованного фермента из *Kluyveromyces fragilis* была выше, но операционная стабильность фермента *Aspergillus oryzae* была выше в 5 – 14 раз в зависимости от способа иммобилизации [25]. Влияние температуры и pH на каталитическую активность иммобилизованной β -галактозидазы из *Kluyveromyces lactis* показало, что зависимости активности от температуры сходны как для свободного, так и для иммобилизованного фермента. Однако максимальная активность иммобилизованного фермента была сдвинута от 40 °С до 50 °С по сравнению со свободным ферментом [31].

Известно об успешной иммобилизации β -галактозидазы *Aspergillus oryzae* в виде гибридных бионеорганических нанокристаллов. Было определено, что кальций является наиболее подходящим ионом металла для биоминерализации β -галактозидазы, превосходя медь в пять раз с точки зрения выхода иммобилизации, тогда как другие протестированные ионы показали почти незначительные результаты [48]. Иммобилизация β -галактозидазы в виде бионеорганических нанокристаллов является удивительно простой и экономичной методологией, которая позволяет сохранять высокую активность фермента, производить биокатализатор с высокой удельной активностью, высокой стабильностью и оптимальными характеристиками синтеза галактоолигосахаридов из лактозы. Кроме того, поскольку кальций безопасен и совместим в качестве пищевой и фармацевтической добавки, для этого биокатализатора открываются многочисленные возможности применения в производстве пребиотиков [48].

Также известно, что грибковая β -галактозидаза, иммобилизованная в геле поливинилового спирта, была более термостабильна, чем свободный фермент, и сохраняла 70 % активности через 24 ч при 50 °С и 5 % активности при 60 °С. Обработанные глутаровым альдегидом клетки *Kluyveromyces bulgaricus*, содержащие β -галактозидазу, заключали в альгинат с помощью раствора $BaCl_2$. Альгинатные гранулы, полученные после обработки полиэтиленгликолем, а затем раствором глутарового альдегида, были стабильными [31].

Было замечено, что захваченный сшитый препарат комплекса конканавалин А- β -галактозидазы был более эффективным в непрерывном гидролизе лактозы в периодическом процессе по сравнению с другими захваченными препаратами, поскольку он сохранял 95 % активности после седьмого повторного использования и 93 % исходной активности после двухмесячного хранения при 4 °С [15]. β -галактозидазу *Aspergillus oryzae* иммобилизовали на поверхности новой биоаффинной подложки: гранул конканавалина А, покрытых слоями альгината кальция и крахмала. Было замечено, что иммобилизованная β -галактозидаза проявляла значительно более высокую устойчивость к нагреванию, мочеvine, $MgCl_2$ и $CaCl_2$, чем свободный фермент [17]. Препараты β -галактозидазы, содержащие альгинат кальция, использовались для гидролиза лактозы из синтетического раствора, молока и сыворотки в периодических процессах, а также в колоннах непрерывного действия с насадкой [16].

Также β -галактозидазу *Aspergillus oryzae* иммобилизовали на недорогом биоаффинном носителе конканавалин-А-целлюлозе. Препарат конканавалин-А-целлюлозы, адсорбированный и сшитый β -галактозидазой, сохранял 78 % исходной активности. Оптимальную температуру для иммобилизованной β -галактозидазы повышали с 50 до 60 °С. Сшитый адсорбированный фермент сохранял активность 93 % после месячного хранения, в то время как нативный фермент проявлял активность только 63 % в аналогичных условиях инкубации [5].

Сравнение различных методов иммобилизации β -галактозидазы из *Thermus aquaticus* показало, что иммобилизация путем поперечного связывания с последующим захватом в агарозные шарики может быть полезной для высокой загрузки фермента с хорошим выходом активности. Захват β -галактозидазы *Aspergillus oryzae* в криогеле губчатого поливинилового спирта повышал стабильность к температуре, рН и ионной силе в большей степени, чем свободный фермент [31]. Волокна, состоящие из альгината и желатина, отвержденные глутаровым альдегидом, сохраняли 56 % относительной активности β -галактозидазы в течение 35 дней без какого-либо снижения. Более того, иммобилизация также не влияла на оптимальные условия. Другим подходом к иммобилизации β -галактозидазы является использование липосом, и в этом направлении была применена методология поверхности отклика для оптимизации захвата фермента в липосомах методом дегидратации-регидратации везикул, что привело к эффективности захвата 28 % [31].

Рекомбинантную термостабильную β -галактозидазу *Bacillus stearothermophilus* иммобилизовали на хитозане с использованием трис(гидроксиметил)фосфина и глутарового альдегида, а для гидролиза лактозы в молоке использовали реактор с набивным слоем. Термостабильность и ферментативная активность β -галактозидазы, иммобилизованной с использованием трис(гидроксиметил)фосфина, при хранении были выше, чем при использовании иммобилизованных глутаральдегидом и свободных форм ферментов. Иммобилизованная β -галактозидаза с использованием трис(гидроксиметил)фосфина показала большую относительную активность в присутствии ионов кальция, чем свободный фермент, и была стабильна при хранении при 4 °С в течение 6 недель, тогда как свободный фермент потерял 31 % исходной активности в тех же условиях хранения [12].

β -галактозидаза *Escherichia coli*, иммобилизованная на желатине с использованием ацетата хрома (III) и глутарового альдегида, сохраняла относительную активность 22 % и 25 % соответственно. Фермент, иммобилизованный на алюмосиликате, был более стабилен, чем свободная форма, при кислых значениях рН. Соотношение белка и полимера также

играет важную роль при иммобилизации фермента, и полное связывание белка с полимером может быть достигнуто при использовании оптимальных условий [31].

Также известно об использовании порошка мембраны яичной скорлупы для иммобилизации β -галактозидазы *Escherichia coli* с глутаровым альдегидом в качестве сшивающего агента [8, 28]. Порошок мембран яичной скорлупы является очень перспективным материалом для иммобилизации β -галактозидазы, так как не только сохраняет свойства фермента, но и позволяет повторно использовать одну аликвоту несколько раз в течение длительного периода времени, что позволяет делать способ выгодным как с экологической, так и с экономической точки зрения. Также иммобилизованный фермент способен гидролизовать лактозу в присутствии сыворотки обезжиренного молока. [21].

В настоящее время исследователи сосредоточены не только на методах иммобилизации ферментов, но и на разработке различных носителей ферментов, которые можно было бы использовать в непрерывных процессах с целью снижения общих производственных затрат [39]. Некоторые общие требования к иммобилизации включают стабильность в потоке жидкости и обратимость по требованию, подразумевая, что неактивный фермент может быть относительно легко заменен активным [7].

Иммобилизация также должна обеспечивать высокую связывающую способность, приводящую к достаточному количеству фермента, прикрепленного к площади поверхности, которая доступна внутри. Для идеальной технологической системы иммобилизация должна быть высокоселективной, что позволит захватить целевой фермент из сложной белковой смеси без какой-либо очистки и разделения белка перед иммобилизацией [7].

Уже доказано, что иммобилизация фермента улучшает стабильность и селективность фермента [37], а внедрение систем с непрерывным потоком упрощает очистку продукта за счет удерживания фермента. Кроме того, непрерывное удаление продукта и субстрата в потоке снижает ингибирование фермента, улучшая общее число оборотов фермента и, следовательно, скорость реакции [49]. Помимо одноступенчатых преобразований, системы с непрерывным потоком могут облегчить выполнение ферментативных каскадных реакций за счет последовательного объединения большего количества реакторов [38].

Благодаря отличному каталитическому потенциалу β -галактозидаза использовалась в качестве важного промышленного фермента для получения галактоолигосахаридов и безлактозных продуктов в молочной промышленности. Кроме того, в недавнем прошлом были реализованы новые технологии для получения и модификации наночастиц для иммобилизации терапевтически и промышленно важных ферментов. Иммобилизация ферментов на основе наночастиц обеспечила большую стабильность и надежность ферментов благодаря их фиксированной конформации и, следовательно, расширила область их применения [4].

Наблюдали эффективность применения наночастиц оксида цинка в качестве нанобиокатализатора для β -галактозидазы *Lactobacillus plantarum* HF571129 по технологии адсорбции и сшивки. Кроме того, иммобилизованная β -галактозидаза сохраняла активность фермента на уровне 90 % даже после одного месяца хранения в условиях охлаждения по сравнению с активностью нативного фермента на уровне 74 % в идентичных условиях хранения [4].

Другое исследование засвидетельствовало синтез и модификацию нановолокон, приготовленных из полистирола и наночастиц кремнезема, путем химического окисления и изготовления по однореакторной золь-гель технологии. На этих наноносителях была иммобилизована β -галактозидаза для биоконверсии лактозы в галактоолигосахариды для получения превосходной биокаталитической активности, стабильности и функциональности. β -галактозидаза, иммобилизованная на этих нанобиокатализаторах, показала превосходную стабильность, функциональность и активность биокатализатора. Полистирольные нановолокна способны адсорбировать β -галактозидазу в 8 раз выше, чем на наночастицах

аминированного диоксида кремния, и демонстрируют исключительную каталитическую способность, отдавая предпочтение трансгалактозилированию, а не гидролизу.

Другое исследование показало эффективность иммобилизации 94 % для β -галактозидазы *Aspergillus oryzae*, иммобилизованной на нанокompозитах графен-оксид железа. Эксперименты по повторному использованию подтвердили 83 % активности иммобилизованного фермента даже после его восьмого повторного использования [22].

Известно о разработке нанобиокатализатора на основе хитозана для иммобилизации β -галактозидазы с целью улучшения стабильности и нагрузки фермента. Было замечено, что наночастицы хитозана были способны гидролизовать 76 % лактозы даже после 50 циклов повторного использования при 37 °C [24].

Также исследователи разработали новый метод иммобилизации β -галактозидазы *Aspergillus oryzae* путем инкапсуляции в наночастицах кремнезема ядро-оболочка. Разработанный нанобиокатализатор продемонстрировал превосходную устойчивость к более высоким значениям pH и температуры, а также значительную стабильность при хранении в течение более длительного времени. Исследование возможности повторного использования показало активность 94 % даже после 9 циклов гидролиза, что указывает на его превосходную возможность повторного использования после инкапсуляции [53].

Модификация поверхности наночастиц для иммобилизации β -галактозидазы улучшает их монодисперсность, стабильность и биосовместимость. Далее рассмотрим стратегии модификации поверхности для иммобилизации β -галактозидаз на нескольких наночастицах для улучшения их эффективности в различных биотехнологических приложениях [4].

Магнитные наночастицы были модифицированы по аминокислотной группе для иммобилизации лактазы для достижения более высокой эффективности иммобилизации 58 мкг/мг на модифицированной наноматрице. Иммобилизованная β -галактозидаза продемонстрировала превосходную возможность повторного использования после нескольких повторных применений и способствовала непрерывному преобразованию лактозы в молочной промышленности гораздо более дешевым и удобным способом [6]. Благодаря превосходным свойствам глутарового альдегида, который был использован для стабилизации иммобилизованных ферментных систем [40], был разработан высокоэффективный нанобиокатализатор *Kluyveromyces lactis* β -галактозидазы из многостенных углеродных нанотрубок, предварительно обработанных глутаровым альдегидом. Стабильность иммобилизованного фермента повышалась в различных диапазонах pH и температуры. Тем не менее, он проявлял большую биокаталитическую активность в отношении конкурентного ингибирования, опосредованного галактозой. Он открыл превосходную возможность повторного использования для преобразования лактозы при получении молочных продуктов на коммерческом уровне. Полученный нанобиокатализатор был более стабилен даже через два месяца и при большей концентрации галактозы. Исследования возможности повторного использования показали его большой потенциал, наблюдаемый при его многократном использовании для использования в периодических процессах гидролиза лактозы в течение 10 часов [4].

Другой метод был реализован для модификации наночастиц серебра путем карбоксилирования для прочного связывания β -галактозидазы *Aspergillus oryzae*. Лактаза, связанная с наночастицами серебра, функционализированными глутаровым альдегидом, показала высокую устойчивость к щелочным и кислым pH и улучшенную устойчивость к колебаниям температуры. Биокаталитическая активность иммобилизованного фермента сохранялась даже после нескольких повторных циклов [4].

Позже исследователи использовали этанол для модификации поверхности графена для иммобилизации β -галактозидазы. Галактозу использовали для придания стабильности β -галактозидазе путем модификации поверхности наночастиц агарозы. Исследователи получили 91 % активности фермента при иммобилизации и большую стабильность иммобилизованного нанобиокатализатора в различных диапазонах pH и температуры, а

также при более высокой концентрации галактозы. При этом активность 81 % была получена после его 7-го повторного использования для нанобиокатализатора [4].

Верма и его коллеги разработали нанобиокатализатор для лактазы из *K. lactis* путем модификации поверхности наночастиц диоксида кремния с помощью глутарового альдегида, и взаимодействие, связанное со связыванием фермента. Имобилизованный биокатализатор показал превосходную активность как в более высоких, так и в более низких диапазонах pH. Он продемонстрировал улучшенные характеристики в условиях высокой термической денатурации и сохранил 50 % активности фермента даже после повторного использования одиннадцатого цикла [51].

Полезность этого нанобиокатализатора была исследована для иммобилизации β -галактозидазы из другого источника для преобразования лактозы из сыворотки и молока [20]. Разработанная наноматрица показала эффективность иммобилизации 94 %. Имобилизованный нанобиокатализатор проявлял выраженную активность в отношении буферов с различным pH, в более широком диапазоне температур и при более высокой концентрации галактозы. Он показал большую активность даже после 14-го повторного использования. Достигнутый гидролиз лактозы был в 1,5 и 2,5 раза выше для растворимого и иммобилизованного нанобиокатализатора соответственно [4].

Несколько исследователей использовали хитозан для покрытия наночастиц Fe_3O_4 для иммобилизации β -галактозидазы для получения галактоолигосахаридов из лактозы. Разработанный нанобиокатализатор показал улучшение активности фермента в более широком диапазоне pH и температуры, помимо большей термостабильности [11].

Исследователи использовали полианилин для модификации многослойных углеродных нанотрубок с кобальтом для иммобилизации β -галактозидазы *Aspergillus oryzae* путем предварительной обработки глутаральдегидом. Имобилизованный нанобиокатализатор показал замечательную стабильность в диапазоне более высоких и низких значений pH и температуры. Более того, иммобилизованный нанобиокатализатор сохранял активность 92 % даже после 10-го запуска подряд [14, 18, 23].

β -галактозидаза, иммобилизованная на новых поверхностно-модифицированных наночастицах, может быть использована для получения безлактозных молочных продуктов и галактоолигосахаридов без опасности микробной контаминации, которая может возникнуть в результате длительного времени работы при температуре окружающей среды. Такие системы с иммобилизованной β -галактозидазой на основе наночастиц при работе в условиях высоких температур могут предотвратить засорение ультрафильтрационных мембран молочными белками за счет использования пермеата молочной сыворотки в качестве депротонированных субстратов. Ввиду новой технологии, реализованной для синтеза и функционализации наночастиц, другие промышленно важные ферменты могут быть стабилизированы против химических и физических денатурантов в результате иммобилизации, что затем может быть использовано для создания аналитических устройств на основе ферментов в различных биомедицинских приложениях [4].

Использование иммобилизации β -галактозидаз в биосинтезе лактулозы

Благодаря пребиотическим свойствам и хорошим технологическим характеристикам лактулоза широко используется в производстве функциональных кисломолочных продуктов, кондитерских изделий, напитков, хлебобулочных и других пищевых продуктов [1]. Лактулоза давно применяется в фармацевтике для профилактики и лечения запоров, осложнений при заболеваниях печени, остеопорозов, пищевых отравлений и инфекций [3].

Промышленные технологии лактулозы основаны на изомеризации лактозы в щелочных средах при высоких температурах; их недостатком является необходимость дорогостоящих операций удаления катализаторов, оставшейся лактозы и побочных продуктов реакции [2]. Альтернативой может стать получение лактулозы с использованием ферментов (биотехнология лактулозы) [43, 44].

В настоящее время применение β -галактозидаз для биотрансформации лактозы в лактулозу является наиболее изученным. Они давно и достаточно широко используются для

гидролиза лактозы как основы получения низколактозных продуктов и глюкозо-галактозных сиропов. В определенных условиях β -галактозидазы могут также катализировать реакции трансгалактозилирования лактозы с образованием галактоолигосахаридов, а в присутствии фруктозы – реакции синтеза лактулозы. Фруктоза может быть внесена в реакционную смесь или получена путем изомеризации глюкозы с использованием ферментов (глюкоизомераз) [43].

Известно об исследованиях ферментативного получения лактулозы с применением β -галактозидазы из *Kluyveromyces lactis* с использованием подсырной сыворотки в качестве исходного сырья. Первоначально получение лактулозы оценивали с использованием свободной β -галактозидазы и синтетической среды (содержащей лактозу и фруктозу). Затем β -галактозидазу иммобилизовали на активированном глутаровым альдегидом хитозане для получения высокоактивных и стабильных катализаторов синтеза лактулозы с использованием подсырной сыворотки и фруктозы в качестве субстрата. Наибольшее производство лактулозы (17,3 г/л) было достигнуто при использовании обработанной подсырной сыворотки. Следовательно, для синтеза лактулозы можно использовать лактозу из подсырной сыворотки и β -галактозидазу, иммобилизованную на хитозане, активированном глутаровым альдегидом [13].

Было изучено применение трех различных биокатализаторов β -галактозидазы из *Kluyveromyces lactis* путем иммобилизации в хитозане, активированном глутаральдегидом, глиоксилагарозе и агарозе, покрытой полиэтиленгликолем. Эти биокатализаторы использовались для катализа синтеза лактулозы из лактозы и фруктозы. Иммобилизация β -галактозидазы из *Kluyveromyces lactis* сильно изменяет свойства фермента в кинетически контролируемом синтезе. Используя всего три протокола иммобилизации, которые следуют очень разным механизмам, полученные биокатализаторы продемонстрировали очень разные характеристики: фермент, иммобилизованный на глиоксигеле, полностью неактивен в производстве лактулозы при всех температурах анализа, фермент, иммобилизованный в полиэтиленгликоле, способен продуцировать лактулозу только при 50 °С и только фермент, иммобилизованный глутаровым альдегидом, активен при 25, 37 и 50 °С [29]. Изменения выхода лактулозы наблюдались при использовании сыворотки в качестве субстрата в реакциях с иммобилизованными ферментами. Выход снижался в биокатализаторах, в которых присутствовал глутаровый альдегид. Однако наблюдалось увеличение выхода лактулозы в биокатализаторах, содержащих полиэтиленгликоль.

В другом исследовании [52] среди трех различных моделей (без предварительной обработки, методом молекулярного импринтинга и защиты), выполненных для инкапсуляции β -галактозидазы, самая высокая ферментативная активность фермента была получена при использовании метода молекулярного импринтинга. Свободная лактаза была сшита в Fe_3O_4 -хитозановые магнитные микросферы для синтеза лактулозы двухферментным методом в водно-органических двухфазных средах с использованием в качестве сырья лактозы и фруктозы [19]. Водно-органические среды могут значительно повысить трансгликозилирующую активность лактазы и, следовательно, улучшить выход лактулозы [31].

β -галактозидаза *Aspergillus oryzae* была иммобилизована в собственной агарозе четвертичного аммония и впервые использована в синтезе лактулозы. При повторной периодической операции с иммобилизованным ферментом совокупная масса лактулозы на единицу массы контактировавшего белка и совокупная удельная продуктивность были выше, чем полученные с растворимым ферментом с момента первой загрузки. После исчерпания ферментативной активности фермент десорбировали, и носитель повторно использовали без изменения его максимальной ферментативной емкости и без ущерба для выхода, производительности и селективности периодического синтеза лактулозы с полученным биокатализатором. Это значительно снижает экономическое воздействие подложки, что является отличительным преимуществом иммобилизации за счет ионного взаимодействия [41].

Сравнение новой и коммерчески доступной аминоксидной подложки (аминоксид-Sepabeads) с обычными оксидными подложками для иммобилизации β -галактозидазы из *Aspergillus oryzae* показало, что стабильность фермента может быть значительно улучшена за счет иммобилизации на этой подложке, что содействует многоточечному ковалентному связыванию между ферментом и подложкой [50]. Иммобилизация термофильной β -галактозидазы на шариках Sepabeads для гидролиза лактозы показала снижение ингибирования продукта, что может быть полезно для улучшения промышленных характеристик фермента [33].

Технология иммобилизации показала многообещающую роль в снижении ингибирования продукта β -галактозидазы. Фермент *Aspergillus oryzae*, иммобилизованный на хитозановых шариках, оказался более эффективным по сравнению с нейлоновыми мембранами для снижения ингибирования галактозы. Иммобилизация фермента на гетерофункциональных оксидных гранулах Sepabeads (боронатно-аминоксид-Sepabeads и хелатно-аминоксид-Sepabeads) показала значительные результаты в снижении ингибирования продукта [33].

Существует способ получения лактулозы с использованием иммобилизованной β -галактозидазы с гидрофобными свойствами [32]. Способ включает в себя получение иммобилизованного фермента с гидрофобностью и проведение биокатализа для синтеза лактулозы, при условии наличия фруктозы. Конечный выход лактулозы при использовании этой технологии может достигать 33,6 %, что почти вдвое превышает выход лактулозы, полученной с использованием свободной β -галактозидазы. Фермент обладает высокой гидролитической активностью и не способствует образованию лактулозы в реакции катализа лактозы. Изобретение [32] по-новому фиксирует фермент на гидрофобном носителе, дополнительно осуществляет агрегацию β -галактозидазы на поверхности носителя, придает полученной иммобилизованному ферменту определенные гидрофобные свойства, дополнительно обеспечивает гидрофобное микроокружение в реакционной системе, дополнительно ингибирует до определенной степени гидролитическую активность β -галактозидазы и способствует образованию лактулозы.

Процесс гидрофобной иммобилизации предусматривает следующие стадии: (1) взаимодействие карбоксила на поверхности β -галактозидазы и аминоксидной группы на поверхности носителя с гидрофобным носителем для объединения фермента на поверхности носителя с гидрофобным носителем; (2) иницирование агрегации ферментативного белка порошком сульфата аммония, так что сульфат аммония всей системы достигает 60-90% насыщения; (3) дополнительная сшивка агрегированного ферментного белка и аминоксидной группы на поверхности ферментного белка и носителя добавлением раствора глутарового альдегида; (4) сбор иммобилизованной β -галактозидазы и лиофилизация в вакууме для последующего использования [32].

Углеродные нанотрубки вызывают интерес у многих исследователей из-за их высокой прочности на разрыв, высокой упругости, гибкости и других уникальных структурных, механических, электрических и физико-химических свойств. Известны исследования, в которых для иммобилизации ферментов использовались одностенные и многостенные углеродные нанотрубки. В результате был разработан метод иммобилизации ферментов на поверхности микроканалов и синтеза лактулозы из лактозы молочной сыворотки в ферментативном микрореакторе. Функционализированные углеродные нанотрубки с ДНК-оболочкой и глутаральдегидом в качестве линкера использовались для иммобилизации β -галактозидазы на поверхности микроканала. Кроме того, β -галактозидаза была предварительно обработана лактозой перед иммобилизацией на поверхности микроканала посредством ковалентной связи. Предварительная обработка фермента природным субстратом в сочетании с функционализированными многостенными углеродными трубками в качестве линкера для иммобилизации фермента значительно улучшала активность иммобилизованного фермента в микрожидкостных каналах. Кроме того, в этом исследовании лактулоза непрерывно синтезировалась в ферментативном микрореакторе. Эти

методы будут полезны для разработки эффективных микроструктурированных устройств с использованием биомолекул [46].

Был исследован способ получения лактулозы из сывороточной лактозы в системах периодического и непрерывного действия с использованием иммобилизованной β -галактозидазы. Перед иммобилизацией на силикагеле фермент предварительно был обработан лактозой. В периодической системе оптимальная концентрация фруктозы для синтеза лактулозы составляла 20 %. Ингибирующее действие галактозы и глюкозы было значительно больше для реакции трансгалактозилирования, чем для гидролиза лактозы. Кроме того, иммобилизация снижала ингибирующее действие ингибиторов на фермент по сравнению с действием на растворимый фермент. Реакторная система непрерывного действия применялась для уменьшения ингибирования сахарами, и было обнаружено, что выход лактулозы в непрерывной системе выше, чем в периодической. Кроме того, при повторном использовании иммобилизованной β -галактозидазы для синтеза лактулозы ее каталитическая активность сохранялась на уровне 52,9 % после 10 повторных использований. Синтез 19,1 г / л лактулозы при таком способе осуществляется в реакторе с набивным слоем в ходе проточной реакции при скорости потока 0,5 мл/мин [45].

Заключение

Иммобилизованные ферменты обеспечивают значительные преимущества по сравнению со свободными. Использование иммобилизованных ферментов повышает их стабильность, возможность повторного использования, а также их можно легко отделить от продукта с лучшим контролем за процессом. Методы иммобилизации в целом разделены на физическую адсорбцию, ковалентное связывание, метод захвата, также в изученной литературе упоминается об инкапсуляции на наночастицах. Самым простым методом считается физическая адсорбция. Но наиболее часто применяемым методом является ковалентная иммобилизация на твердом носителе, таких как шарики, мембраны, поверхность микрореактора и т. д. Преимущество этого метода заключается в образовании прочной связи фермент-поверхность, что предотвращает отделение фермента и его выщелачивание из микрореактора.

Различные иммобилизованные системы имеют свои плюсы и минусы, что видно по их выходу, пригодности для повторного использования, продуктивности, стабильности ферментов по отношению к различным физическим и химическим денатурантам и адсорбционной способности. Системы с иммобилизованной β -галактозидазой обещали большой потенциал для получения желаемых продуктов с очень значительными выходами и предлагали устойчивое управление зелеными отходами, но со своими ограничениями. Следовательно, перевод этих лабораторных технологий может быть достигнут в основных коммерческих практиках благодаря их биоинженерным характеристикам и потенциалу для масштабирования и повторного использования.

Основным преимуществом метода захвата является простота получения сферических частиц путем капания суспензии полимерных клеток в среду, содержащую положительно заряженные ионы, или путем термической полимеризации. Кроме того, шарики, сформированные, в частности, из альгината, являются прозрачными и обычно механически устойчивыми. В качестве носителя для иммобилизации ферментов можно использовать различные носители, такие как растворимые декстраны, эпоксидные смолы, хитозан, диоксид кремния и альгинат.

Краткий обзор показал большую активность ферментов, иммобилизованных на наночастицах, по сравнению с ферментами, иммобилизованными на двумерных матрицах. Иммобилизация фермента β -галактозидазы на основе наночастиц обеспечивает глубокую стабильность при транспортировке субстрата и продукта для ферментативных реакций, помимо преимуществ с экономической точки зрения многократного применения иммобилизованного фермента.

Иммобилизованная β -галактозидаза по сравнению со свободной, очевидно, улучшает активность трансгликозилирования, не только повышает выход лактулозы, но также

способствует превращению галактозы, образующейся при гидролизе лактозы, в галактоолигосахарид, полезный для организма человека.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Рябцева С.А. Технология лактулозы. М: ДеЛи принт, 2003. – 232 с.
2. Рябцева С.А. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы / С.А. Рябцева, А.Г. Храмцов, Р.О. Будкевич, Г.С. Анисимов, А.О. Чукло, М.А. Шпак // Вопросы питания. 2020. № 2. С. 6–21. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10012.
3. Ait-Aissa A. Lactulose: production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications. Practical and critical review / A. Ait-Aissa, M. Aider // International journal of food science and technology. 2014. vol. 49. P. 1245-1253. DOI:10.1111/IJFS.12465
4. Alshanberi A. M. Overviewing the Application of β -Galactosidase “Immobilized on Nanoparticles” in Dairy Industries / A. M. Alshanberi, M. A. Al-Shaeri, S. A. Ansari // Brazilian archives of biology and technology. 2021. vol. 64. 13 p. DOI: 10.1590/1678-4324-2021180747
5. Ansari S. A. Lactose hydrolysis by β -galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode / S. A. Ansari, Q. Husain // Journal of molecular catalysis B - enzymatic. 2010. vol. 63, no. 1-2, P. 68-74. DOI:10.1016/J.MOLCATB.2009.12.010
6. Belhacene K. Simple eco-friendly β -galactosidase immobilization on functionalized magnetic particles for lactose hydrolysis / K. Belhacene, E. F. Grosu, A.C. Blaga, P. Dhulster, M. Pinteala, R. Froidevaux // Environmental engineering and management journal. 2015. vol. 14, no. 3, P. 631–638. DOI:10.30638/EEMJ.2015.070
7. Bolivar M. Biotransformations in microstructured reactors: More than flowing with the stream? / M. Bolivar, J. Wiesbauer, B. Nidetzky // Trends Biotechnol. 2011. vol. 29. P. 333-342. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.03.005
8. Budžaki S. Waste management in the agri-food industry: The conversion of eggshells, spent coffee grounds and brown onion skins into carriers for lipase immobilization / S. Budžaki, N. Velić, M. Ostojčić, M. Stjepanović, B. Bilić Rajs, Z. Šereš, N. Maravić, J.Stanojev, V. Hessel, I. Strelec // Foods. 2022. vol. 11. 16 p. DOI:10.3390/foods11030409
9. Chapman J. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks / J. Chapman, A. E. Ismail, C.Z. Dinu // Catalysts. 2018. vol. 8. 26 p. DOI:10.3390/catal8060238
10. Chattopadhyay S. A comparative performance evaluation of jute and eggshell matrices to immobilize pancreatic lipase / S. Chattopadhyay, R. Sen // Process biochemistry. 2012. vol. 47, no. 5, P. 749–757.
11. Chen S. C. Production of galactooligosaccharides using β -galactosidase immobilized on chitosan-coated magnetic nanoparticles with Tris (hydroxyl-methyl) phosphine as an optional coupling agent / S. C. Chen, K. J. Duan. // International journal of molecular sciences. 2015. vol. 16. P. 12499-12512. DOI:10.3390/ijms160612499
12. Chen W. Immobilization of recombinant thermostable β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk / W. Chen, H. Chen, Y. Xia et al. // Journal of dairy science. 2009. vol. 92, no. 2, P. 491–498. DOI:10.3168/jds.2008-1618
13. de Albuquerque T.L. Immobilization of β -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock / T.L. de Albuquerque, S. Gomes, A.P. D’Almeida, R. Fernández-Lafuente, L. Gonçalves, M. Rocha // Process Biochemistry. 2018. vol. 73. P. 65-73. DOI:10.1016/J.PROCBIO.2018.08.010
14. Gonawan N. Immobilized- β -galactosidase catalysed conversion of lactose on the membrane surface / N. Gonawan, A.H. Kamaruddin, M.Z.A. Bakar, K.A. Karim // Journal of physical therapy science. 2018. Vol. 29. P. 49-56. DOI:10.21315/JPS2018.29.S1.7
15. Haider T. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose / T. Haider, Q. Husain // International journal of biological macromolecules. 2007. vol. 41. no. 1. P. 72-80. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2007.01.001

16. Haider T. Hydrolysis of milk/whey lactose by β galactosidase: a comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme / T. Haider, Q. Husain // *Chemical engineering and processing: process intensification*. 2009. vol. 48. no. 1. P. 576-580. DOI:10.1016/j.cep.2008.02.007
17. Haider T. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk / T. Haider, Q. Husain // *International dairy journal*. 2009. vol. 19. no. 3, P. 172-177. DOI:10.1016/J.IDAIRYJ.2008.10.005
18. Hassan M.E. Covalent immobilization of β -galactosidase enzyme onto modified alginate gel beads / M.E. Hassan, A.G. Ibrahim, H.A. El-Wahab, F.A. Hai, H. Mahmoud, G.E.A. Awad // *Journal of materials and environmental science*. 2018. vol. 9. P. 2483-2492.
19. Hua X. Dual-enzymatic synthesis of lactulose in organic-aqueous two-phase media / X. Hua, R. Yang, W. Zhang, Y. Fei, Z. Jin, BO. Jiang, // *Food research international*. 2010. vol. 43. no. 3. P. 716-722. DOI:10.1016/J.FOODRES.2009.11.008
20. Jesionowski T. Enzyme immobilization by adsorption: a review / T. Jesionowski, J. Zadarta, B. Krajewska // *Adsorption*. 2014. vol. 20. P. 801-821. DOI:10.1007/s10450-014-9623-y
21. Kessi E. Natural Waste Material as a Matrix for the Immobilization of Enzymes: Chicken Eggshell Membrane Powder for β -Galactosidase Immobilization / E. Kessi, J. Arias // *Biotechnology and applied biochemistry*. 2019. vol. 187. P. 101-115. DOI:10.1007/s12010-018-2805-4
22. Khan M. Graphene based magnetic nanocomposites as versatile carriers for high yield immobilization and stabilization of β -galactosidase / M. Khan, Q. Husain, A.H. Naqvi // *RSC Advances*. 2016. Issue 58. 11 p. DOI:10.1039/C6RA06960F
23. Khan M. Immobilization of β -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor / M. Khan, Q. Husain, R. Bushra // *International journal of biological macromolecules*. 2017. vol. 105. P. 693-701. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.088
24. Klein M.P. Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: advantages and disadvantages of macro and nanoparticles / M.P. Klein, M.R. Nunes, R.C. Rodrigues, E.V. Benvenuti, T.M.H. Costa, P.F. Hertz, J.L. Ninow // *Biomacromolecules*. 2012. vol. 13. P. 2456-2464. DOI:10.1021/bm3006984
25. Ladero M. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* / M. Ladero, A. Santos, and F. Garc'ia-Ochoa, // *Enzyme and microbial technology*. 2000. vol. 27. no. 8. P. 583-592. DOI: 10.1016/s0141-0229(00)00244-1
26. Mateo C. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques / C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente // *Enzyme and microbial technology*. 2007. vol. 40. P. 1451-1463. DOI:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018
27. Meller K. Microfluidic reactors with immobilized enzymes – Characterization, dividing, perspectives/ K. Meller, M. Szumski, B. Buszewski // *Sensors and actuators B: Chemical*. 2017. vol. 244. P.84-106. DOI:10.1016/J.SNB.2016.12.021
28. Michon C. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: Strategies and applications / C. Michon, P. Langella, V.G. Eijsink, G. Mathiesen, J.M. Chatel // *Microbial cell factories*. 2016. vol. 15. 16 p.
29. Neto C.A.C.G. The β -galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose / C.A.C.G. Neto, N.C.G.E. Silva, T.de Oliveira Costa, T.L. de Albuquerque, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, M.V.P. Rocha // *International journal of biological macromolecules*. 2021. vol. 176. P. 468-478. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078
30. Nguyen H.M. Display of a β -mannanase and a chitosanase on the cell surface of *Lactobacillus plantarum* towards the development of whole-cell biocatalysts / H.M. Nguyen, G. Mathiesen, E.M. Stelzer, M.L. Pham, K. Kuczkowska, A. Mackenzie, J.W. Agger, V.G. Eijsink,

- M. Yamabhai, C.K. Peterbauer et al. // *Microbial cell factories*. 2016. vol. 15. 14 p. DOI: 10.1186/s12934-016-0570-z
31. Panesar P. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. / P. Panesar, S. Kumari, R. Panesar // *Enzyme research*. 2010. 16 p. DOI:10.4061/2010/473137
 32. Patent CN112481239 (A) Immobilized lactase with hydrophobic property and method for preparing lactulose by applying immobilized lactase/ Yang R., Wang M. — 2021-03-12.
 33. Pessela B. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: complete hydrolysis of lactose in dairy products / B. Pessela, C. Mateo, M. Fuentes, A. Vián, J. García, A. Carrascosa, J. Guisán, R. Fernández-Lafuente // *Enzyme and microbial technology*. 2003. vol. 33. no. 2-3, P. 199-205. DOI:10.1016/S0141-0229(03)00120-0
 34. Pham M.L. Immobilization of β -Galactosidases on the Lactobacillus Cell Surface Using the Peptidoglycan-Binding Motif LysM / M.L. Pham, A.M. Tran, S. Kittibunchakul, T.T. Nguyen, G. Mathiesen, T.H. Nguyen // *Catalysts*. 2019. vol. 9. 18 p. DOI: 10.3390/catal9050443
 35. Pham M.L. Immobilization of β -galactosidases from Lactobacillus on chitin using a chitin-binding domain / M.L. Pham, T. Leister, H.A. Nguyen, B.C. Do, A.T. Pham, D. Haltrich, M. Yamabhai, T.H. Nguyen, T.T. Nguyen // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2017. vol. 65. P. 2965-2976. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04982
 36. Posthuma-Trumpie G.A. A low perfusion rate microreactor for continuous monitoring of enzyme characteristics: Application to glucose oxidase / G.A. Posthuma-Trumpie, K. Venema, W.J.H. van Berkel, J. Korf // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007. vol. 389. P. 2029-2033. DOI: 10.1007/s00216-007-1596-1
 37. Rodrigues R.C. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization / R.C. Rodrigues, O.A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente // *Chemical society reviews*. 2013. vol. 42. P. 6290–6307. DOI:10.1039/c2cs35231a
 38. Rudroff F. Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis / F. Rudroff, M.D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U.T. Bornscheuer // *Nature catalysis*. 2018. vol. 1. P. 12-22. DOI:10.1038/s41929-017-0010-4
 39. Šalić A. Synergy of microtechnology and biotechnology: microreactors as an effective tool for biotransformation processes / A. Šalić, B. Zelić // *Food technology and biotechnology*. 2018. vol. 56. P. 464-479 DOI:10.17113/ftb.56.04.18.5673
 40. Satar R. Role of glutaraldehyde in imparting stability to immobilized β -galactosidase systems / R. Satar, M.A. Jafri, M. Rasool, S.A. Ansari // *Brazilian archives of biology and technology*. 2017. vol. 60. P. 87-92. DOI:10.1590/1678-4324-2017160311
 41. Serey M. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose / M. Serey, C. Vera, C. Guerrero, A. Illanes // *International journal of biological macromolecules*. 2021. vol. 167. P. 1564-1574. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.110
 42. Serri N.A. High reusability of lipase immobilized on eggshells for butyl butyrate synthesis under optimum condition / N.A. Serri, L.S. Mooi // *ASM science journal*. 2019. vol. 12. 10 p. DOI:10.32802/ASMSCJ.2019.247
 43. Silvério S.C. Biocatalytic approaches using lactulose: End product compared with substrate / S.C. Silvério, E.A. Macedo, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016. vol. 15 P. 878-896. DOI:10.1111/1541-4337.12215
 44. Sitanggang A.B. Recent advances on prebiotic lactulose production / A.B. Sitanggang, A. Drews, M. Kraume // *World journal of microbiology and biotechnology*. 2016. vol. 32. 10 p. DOI:10.1007/s11274-016-2103-7
 45. Song Y. Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β -galactosidase / Y. Song, H. Lee, C. Park, S. Kim // *Food chemistry*. 2013. vol. 136. P. 689-694. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.08.074

46. Song Y. β -Galactosidase-immobilized microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilization and its application for continuous synthesis of lactulose / S. Song, H. Shin, J. Lee, C. Park, S. Kim // *Food chemistry*. 2012. vol. 133. P. 611-617. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2012.01.096
47. Taqieddin E. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules / E. Taqieddin, M. Amiji // *Biomaterials*. 2004. vol. 25. P. 1937-1942. DOI:10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.08.034
48. Tavernini L.M. Development of a hybrid bioinorganic nanobiocatalyst: remarkable impact of the immobilization conditions on activity and stability of β -galactosidase / L.M. Tavernini, M.V. Olguín, M. Trench, R.A. Minervino // *Molecules*. 2021. vol. 26. 14 p. DOI:10.3390/molecules26144152
49. Thompson M.P. Biocatalysis using immobilized enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemicals / M.P. Thompson, I. Peñafiel, S.C. Cosgrove, N.J. Turner // *Organic process research & development*. 2019. vol. 23. P.9–18. DOI:10.1021/ACS.OPRD.8B00305
50. Torres R. A novel heterofunctional epoxy-amino sephabeads for a new enzyme immobilization protocol: Immobilization-stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* / R. Torres, C. Mateo, G. Fernandez-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, J. Palomo, J. Guisán, R. Fernández-Lafuente // *Biotechnology progress*. 2003. vol. 19. no. 3. P. 1056-1060. DOI:10.1021/bp025771g
51. Verma M. Immobilization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis / M. Verma, C.J. Barrow, J.F. Kennedy, M. Puri // *International journal of biological macromolecules*. 2010. vol. 50. P. 432-437. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2011.12.029
52. Wu Z. Encapsulation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* based on “fish-in-net” approach with molecular imprinting technique / Z. Wu, M. Dong, M. Lu, Z. Li // *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. 2010. vol. 63. no. 1-2. P. 75–80. DOI:10.1016/j.molcatb.2009.12.012
53. Wu Z. Improving the properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via encapsulation in aggregated silica nanoparticles / Z. Wu, Z. Wang, B. Guan, X. Wang, Y. Zhang, Y. Xiao, B. Zhi, Y. Liu, Y. Li, Q. Huo // *New journal of chemistry*. 2013. vol. 37. P.3793-3797. DOI:10.1039/C3NJ00685A
54. Yovcheva T. Effect of immobilization conditions on the properties of β -galactosidase immobilized in xanthan/chitosan multilayers / T. Yovcheva, T. Vasileva, A. Viraneva, D. Cholev, I. Bodurov, M. Marudova, V. Bivolarski, I. Iliev // *Journal of physics: conference series*. 2012. vol. 794. P. 2456-2464. DOI:10.1088/1742-6596/794/1/012032

ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Табакова Юлия Александровна*, аспирант кафедры прикладной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий СКФУ; тел. +79624217751; tabakova.j@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0077-2778>

Tabakova Yuliya Alexandrovna*, Postgraduate Student, Department of Applied Biotechnology, Faculty of Food Engineering and Biotechnology, NCFU; tel. +79624217751; tabakova.j@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0077-2778>

Рябцева Светлана Андреевна, профессор кафедры прикладной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий Северо-Кавказского федерального университета (СКФУ), д.т.н., профессор; тел.+79280084685; ryabtseva07@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9803-8709>

Ryabtseva Svetlana Andreevna, Professor, Department of Applied Biotechnology, Faculty of Food Engineering and Biotechnology, North Caucasus Federal University (NCFU), Doctor of Technical Sciences, Professor; tel. +79280084685; ryabtseva07@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9803-8709>

Шпак Мария Александровна, доцент кафедры технологии машиностроения и технологического оборудования инженерного института СКФУ, к.т.н.; тел. +79064688080; maria.bratsikhina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0119-9061>

Shpak Maria Alexandrovna, Associate Professor of the Department of Engineering Technology and Technological Equipment of the Engineering Institute of the North Caucasus Federal University, Ph.D.; tel. +79064688080; maria.bratsikhina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0119-9061>

Сазанова Серафима Николаевна, аспирант кафедры прикладной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий СКФУ; тел. +79620243715; serafima.sazanova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8200-3007>

Sazanova Serafima Nikolaevna, Postgraduate Student, Department of Applied Biotechnology, Faculty of Food Engineering and Biotechnology, NCFU; tel. +79620243715; serafima.sazanova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8200-3007>

Дата поступления в редакцию: 19.10.2022

После рецензирования: 13.11.2022

Дата принятия к публикации: 07.12.2022