



Charakterystyka preparatów β -galaktozydazy z *Sulfolobus shibatae*

Sylwia Wołosowska, Józef Synowiecki

Katedra Chemii i Technologii Żywności, Politechnika Gdańska, Gdańsk

β -galactosidase activity of proteins extracted from *Sulfolobus shibatae*

Summary

The cytoplasmic β -galactosidase/ β -glucosidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* has been characterized with regard to its use in lactose hydrolysis. Cell extract was purified 16-fold to a specific activity 29.5 U/mg using ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography, and gel filtration. Isolated enzyme exhibited optimum activity at pH 5.5 and 98°C and had a half-life of 7 h in acetate buffer (pH 5.5) at 90°C. Cu^{2+} , Hg^{2+} and Zn^{2+} strongly inhibited the enzyme, whereas catalytic properties of other investigated cations were barely influenced. Glucose and galactose were predominantly produced from lactose. However, at the substrate concentration of 0.15 M, small amount of lactose was converted into transgalactosylation products.

Key words:

β -galactosidase, thermostable enzymes, *Sulfolobus shibatae*.

Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,
Katedra Chemii
i Technologii Żywności,
Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska,
ul. Gabriela Narutowicza
11/12,
80-952 Gdańsk.

1. Wstęp

Preparaty β -galaktozydazy są stosowane do hydrolizy laktozy w mleku i serwatce oraz do biosyntezy laktulozy i oligosacharydów w których występują głównie wiązania $\beta(1\rightarrow3)$ lub $\beta(1\rightarrow6)$ glikozydowe (1). Wymienione cukry nie są przyswajane i ich spożycie może niekiedy wywoływać objawy podobne do nietolerancji laktozy. Są one jednak stymulatorem rozwoju w przewodzie pokarmowym *Bifidobacterium bifidus* oraz innej mikroflory

o korzystnym oddziaływaniu fizjologicznym (2). Szybkość hydrolizy laktozy i stopień konwersji substratu są ograniczone hamowaniem produktami reakcji (3). Wpływ tego niekorzystnego zjawiska można zmniejszyć stosując reaktory kolumnowe z unieruchomionym enzymem. Hamowanie reakcji w początkowej części kolumny jest niewielkie z powodu małego jeszcze stężenia produktów hydrolizy. Podczas kilkunastogodzinnej pracy reaktora dużym problemem jest możliwość rozwoju drobnoustrojów, któremu można zapobiec stosując β -galaktozydazę aktywną w podwyższonej temperaturze, ograniczającej niepożądany rozwój mezofili. Ponadto niektóre termostabilne β -galaktozydazy są w przeciwieństwie do enzymów z drobnoustrojów mezofilnych mniej podatne na hamowanie reakcji wytwarzaną podczas hydrolizy galaktozą a glukoza jest niekiedy ich aktywatorem (4). Dotychczas poznano jednak niewiele termostabilnych β -galaktozydaz (3). Enzym o dużej termostabilności i optymalnej temperaturze działania 97°C uzyskano poprzez ekspresję genu kodującego syntezę termostabilnej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* w komórkach *Escherichia coli* (5). Białko o aktywności β -galaktozydazy jest też wytwarzane przez hipertermofilny archeon *Sulfolobus solfataricus* należący do rodzaju *Sulfolobus* obejmującego ponadto *Sulfolobus acidocaldarius* i *Sulfolobus shibatae* oraz kilka innych, mało dotychczas zbadanych mikroorganizmów. Archeony te utleniające siarkę i siarczki do siarczanów występują w znajdujących się głównie w obszarach wulkanicznych zbiornikach zakwaszonej i gorącej wody, rosnąc w temperaturach od 55 do 90°C w zakresie pH 1,0-6,0 (6). Wymienione drobnoustroje mogą się również rozwijać w warunkach beztlenowych i wtedy funkcję tlenu jako akceptora elektronów spełnia Fe^{3+} lub MoO_4^{2-} (7). W obecności tlenu archeony rodzaju *Sulfolobus* mogą rosnąć heterotroficznie, przyswajając np. składniki ekstraktu drożdżowego oraz rozmaite cukry i aminokwasy. Hydrolizujący laktozę preparat enzymatyczny z *Sulfolobus solfataricus* klasyfikowano pierwotnie jako β -galaktozydazę (8). W dalszych badaniach wykazano jednak, że należy go raczej zaliczyć do grupy β -glukozydaz (9). Spokrewniony z *Sulfolobus solfataricus* szczep *Sulfolobus shibatae* również wytwarza katalizujący hydrolizę laktozy enzym o mało dotychczas poznanych właściwościach, stabilności i optymalnych warunkach działania. W artykule tym przedstawiono wyniki badań umożliwiających ocenę jego przydatności w przetwórstwie mleka i serwatki.

2. Materiały i metody

2.1. Warunki hodowli

Kulturę z liofilizowanego szczepu *Sulfolobus shibatae* (DSM5389) zakupionego w Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Niemcy) przygotowywano zgodnie ze standardową procedurą zalecaną przez producenta. *Sulfolobus shibatae* hodowano w warunkach tlenowych w podłożu o pH 3,5, zawierającym

0,4% ekstraktu drożdżowego, 0,8% peptonu K i mieszaninę substancji mineralnych wg Brocka (10). Porcje podłoża o objętości 100 ml zaszczipiano 6 ml zawiesiny komórek ($OD_{600} > 0,8$) i inkubowano przez 72 h bez dodatkowego napowietrzania w termostатовanej wstrząsarce w temperaturze 75°C, z szybkością wstrząsania 150 cykli/min przy amplitudzie 4 cm.

2.2. Izolacja i oczyszczanie β -galaktozydazy

Zamrożoną biomasę (10 g) rozcierano w moździerzu (15 min, 4°C) z 20 g Aluminu A-5 (Sigma) dodając stopniowo 70 ml buforu fosforanowego (pH 7,5), a następnie dezintegrowano komórki przez 5 min w generatorze ultradźwięków typu V-SO1 Ultrason (60 W, 40 kHz). Otrzymaną zawiesinę wirowano 15 min przy 8000 \times g. Z ekstraktu bezkomórkowego strącano kwasy nukleinowe przy 2,5% (w/v) stężeniu siarczanu (VI) streptomycyny (2 h, 4°C). Frakcję białek o aktywności β -galaktozydazy wyodrębniano dodając stopniowo do supernatantu $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma, nr kat. A 2939). Precipitaty wydzielone przy 20, 35, 50 i 65% nasyceniu siarczanu (VI) amonu odwirowywano (15 min, 8000 \times g), rozpuszczano w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5) i oznaczano aktywność enzymatyczną (rozdz. 2.3) oraz stężenie białka metodą Bradford (11). Frakcję białek o największej aktywności β -galaktozydazy, wysoloną przy 50% nasyceniu siarczanu amonu zagęszczano (80 min, 4000 \times g) przez ultrafiltrację stosując Centrifugal Filter Device, Centriplus YM-30 (Milipore) o zdolności rozdzielczej 30 kDa. Zagęszczoną próbkę (5 ml) nanoszono na kolumnę (2,6 \times 38 cm) z DEAE Sepharose CL-6B, zrównoważoną 50 mM buforem Tris-HCl o pH 7,5. Białka eluowano 0,25 M roztworem NaCl w tym samym buforze przy natężeniu przepływu 1,3 ml/min. W poszczególnych frakcjach o objętości 4 ml oznaczano spektrofotometrycznie zmiany zawartości białka (A_{280}) i aktywność β -galaktozydazy (rozdz. 2.3). Frakcję o największej aktywności zagęszczano przez ultrafiltrację (Centriplus YM-30, MW 30 kDa, 4000 \times g) i nanoszono na kolumnę (1,3 \times 32 cm) z Sephadex G-200 zrównoważoną 50 mM buforem Tris-HCl o pH 7,5. Białka eluowano tym samym buforem przy natężeniu przepływu 0,2 ml/min. W poszczególnych frakcjach o objętości 1,3 ml oznaczano zmiany zawartości białka metodą Bradford i aktywność β -galaktozydazy (rozdz. 2.3).

2.3. Oznaczanie aktywności preparatu enzymatycznego z *Sulfolobus shibatae*

Aktywność β -galaktozydazy oznaczano zmodyfikowaną metodą Cravena (12) określając ilość o-nitrofenolu uwolnionego podczas hydrolizy 5 mM roztworu o-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu (oNPG) w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5. Substrat (2,5 ml) wstępnie ogrzewano do 70°C i dodawano 0,5 ml ekstraktu bezkomórkowego po kolejnych etapach oczyszczania lub roztworu oczysz-

zonego preparatu enzymatycznego w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5). Po upływie zaplanowanego czasu reakcji hydrolizę przerywano dodając 1 ml 1 M roztworu Na_2CO_3 i mierzono absorbancję (A_{420}) względem analogicznie ogrzewanej próby odniesienia zawierającej zamiast roztworu enzymu 0,5 ml 0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 5,5.

Aktywność β -glukozydazy w białkach po chromatografii jonowymiennej oznaczano stosując jako substrat 5 mM roztwór p-nitrofenilo- β -D-glukopiranozydu (pNPG) w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5). Do 2,5 ml roztworu substratu ogrzanego do 70°C dodawano 0,5 ml rozcieńczonego 0,1 M buforem fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5) eluatu (2:1,v/v) zagęszczonego uprzednio przez ultrafiltrację (Centriplus YM-30, MW 30kDa). Hydrolizę przerywano po upływie zaplanowanego czasu reakcji dodając 1 ml 1 M roztworu Na_2CO_3 i mierzono absorbancję (A_{420}) względem analogicznie ogrzewanej próby odniesienia.

Aktywność hydrolityczną względem laktozy oznaczano stosując 30 mM roztwór cukru w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5. Ilość wytworzonej glukozy oznaczano metodą Huggeta i Nixona (13). Jako jednostkę aktywności przyjęto ilość enzymu hydrolizującą w ciągu minuty 1 μmol substratu (oNPG lub laktozy) w temperaturze 70°C, w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5.

2.4. Oznaczanie zmian aktywności β -galaktozydazy podczas hodowli *Sulfolobus shibatae*

0,5 ml zawiesiny komórek pobranych podczas hodowli drobnoustroju umieszczono w szczelnie zamykanych probówkach z 2 ml 0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego (pH 5,5), 20 μl chloroformu i 10 μl 0,1% roztworu siarczanu (VI) dodecyłu sodu (SDS). Po 30 min inkubacji w 70°C dodawano do próbek 0,4 ml 5 mM roztworu oNPG w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5 i prowadzono reakcję przez określony czas. Jednocześnie ogrzewano próbę odniesienia zawierającą zamiast zawiesiny bakterii 0,5 ml stosowanego do hodowli podłoża. Reakcję przerywano dodając 1 ml 1 M wodnego roztworu Na_2CO_3 . Próbkę odniesienia i próby badane odwirowywano (5 min, 4000 \times g) i mierzono absorbancję przy $\lambda = 420 \text{ nm}$.

2.5. Warunki działania i termostabilność β -galaktozydazy

Zależność aktywności enzymu od pH reakcji określano stosując 5 mM roztwory oNPG w 0,1 M buforach fosforanowo-cytrynianowych o pH od 2,5 do 8,0. Wpływ temperatury na aktywność β -galaktozydazy, mierzono według danych zawartych w rozdziale 2.3 w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5 zmieniając temperaturę reakcji w zakresie 55-105°C. Oznaczenia aktywności preparatu w temperaturach powyżej 98°C prowadzono w szczelnie zamykanych probówkach, ogrze-

wanych w łaźni glicerynowej. Termostabilność β -galaktozydazy określano mierząc zmniejszenie aktywności podczas inkubacji roztworów enzymu w 0,1 M buforach: fosforanowym (pH 7,2) i octanowym (pH 5,5) przez 20 do 300 minut w temperaturze 70, 80, 90 lub 98°C.

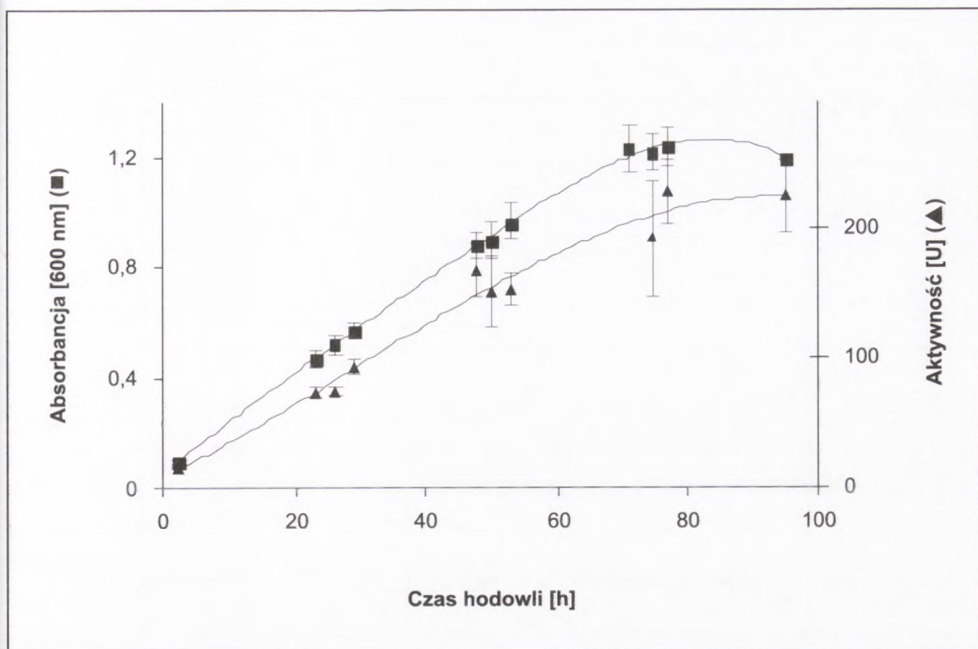
Oddziaływanie K^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} lub Fe^{2+} na aktywność β -galaktozydazy oznaczono (por. rozdz. 2.3) po 15 min inkubacji (70°C) enzymu rozpuszczonego w 1 mM roztworze badanych soli w 0,1 M buforze octanowym (pH 5,5).

2.6. Identyfikacja produktów hydrolizy laktozy

Hydrolizaty 30 mM roztworu laktozy w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5) oczyszczano przez cieplne strącenie białka enzymu (5 min, 110°C), adsorpcję na węglu aktywnym, wirowanie (15 min, 8000 \times g) i sączenie przez filtr 0,2 μ m (Puradisc™, Whatman). Próbki nastrzykiwano na kolumnę Polyspher® CH PB (Merck) i eluowano w 75°C wodą o natężeniu przepływu 0,3 ml/min, stosując zestaw HPLC z detektorem RI (LaChrom L-7490, Merck).

3. Omówienie wyników

Podczas logarytmicznego wzrostu *Sulfolobus shibatae* aktywność β -galaktozydazy w hodowli jest skorelowana ($r = 0,984$) z przyrostem liczby komórek (rys. 1). Po około 72 h hodowli *Sulfolobus shibatae* w 75°C na podłożu drożdżowo-peptonowym następowało zahamowanie wzrostu drobnoustroju i po tym czasie uzyskano z jednego litra hodowli od 2,8 do 3,4 g mokrej biomasy zawierającej białka o aktywności około 642 U β -galaktozydazy. Podobnie jak w hodowli *Sulfolobus solfataricus* β -galaktozydaza wytwarzana przez *Sulfolobus shibatae* nie jest transportowana do podłoża w którym stwierdzono po 72 h hodowli zaledwie 3,8% ogólnej aktywności ekstraktu bezkomórkowego. Ślady aktywności β -galaktozydazy w płynie pohodowlanym są przypuszczalnie wynikiem lizy niektórych komórek drobnoustroju. Pomimo że enzym o aktywności β -galaktozydazy jest wytwarzany przez *Sulfolobus shibatae* konstytutywnie to przy 1% stężeniu laktozy w pożywce uzyskano po 72 h hodowli wzrost wydajności enzymu o około 40%. Podobne oddziaływanie induktorów zaobserwowano podczas hodowli *Thermus thermophilus* w której przy 2% stężeniu laktozy lub glukozy następowało zwiększenie wydajności β -galaktozydazy odpowiednio o 33 i 61% (13). *Sulfolobus shibatae* jest lepszym źródłem β -galaktozydazy (tab.) od spokrewnionego szczepu *Sulfolobus solfataricus*, którego ekstrakt bezkomórkowy wykazuje około 15-krotnie mniejszą aktywność enzymatyczną (8,9).



Rys. 1. Przyrost biomasy (■) i zmiany aktywności β -galaktozydazy (▲) podczas hodowli *Sulfolobus shibatae* na podłożu drożdżowo-peptonowym.

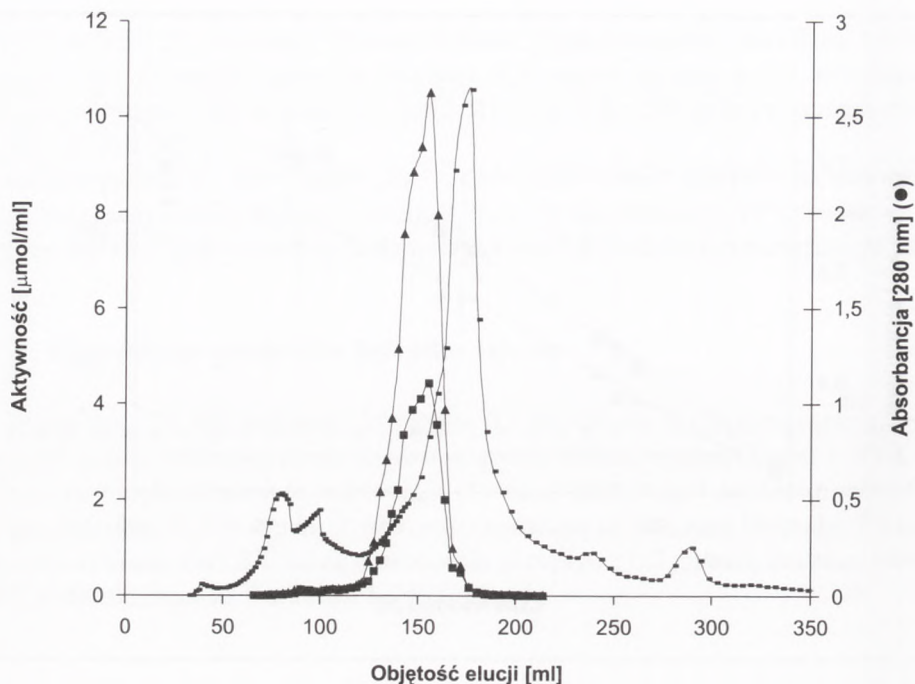
Tabela 1

Etapy oczyszczania preparatu β -galaktozydazy z *Sulfolobus shibatae*

Etap oczyszczania	Aktywność całkowita [U]	Białko całkowite [mg]	Aktywność specyficzna [U/mg]	Krotność oczyszczenia
ekstrakt bezkomórkowy	207,3 \pm 2,5	112,2 \pm 4,4	1,8	1,0
strącenie kwasów nukleinowych	202,0 \pm 3,0	89,8 \pm 4,1	2,2	1,2
wysalanie przy 50% nasyceniu (NH ₄) ₂ SO ₄	135,3 \pm 1,0	47,8 \pm 1,3	2,8	1,5
dializa	111,1 \pm 2,7	39,3 \pm 2,3	2,8	1,5
chromatografia na Sepharose CL-6B	–	–	20,0	10,8
filtracja żelowa (Sephadex G-200)	–	–	29,5	15,9

Aktywności całkowite i zawartości białek są przeliczone na 1 g mokrej biomasy.

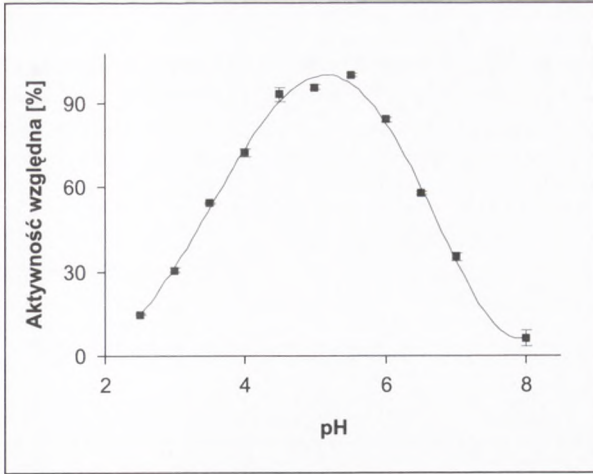
Najwięcej białka o aktywności β -galaktozydazy (2,8 U/mg) znajduje się we frakcji wysolonej z ekstraktu bezkomórkowego przy 50% nasyceniu siarczanu (VI) amonu (tab.). Białka tej frakcji podczyszczano kolejno przez: ultrafiltrację, chromatografię jonowymienną na DEAE Sepharose CL-6B i filtrację żelową na sicie molekularnym



Rys. 2. Aktywność β -galaktozydazy (▲) oraz β -glukozydazy (■) wyeluowanych z kolumny DEAE Sepharose CL-6B frakcji białek ekstraktu bezkomórkowego *Sulfolobus shibatae*.

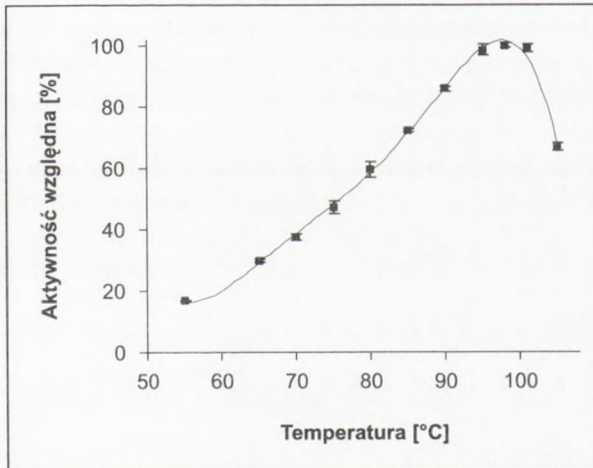
Sephadex G-200. Chromatografia jonowymienna umożliwiła uzyskanie około 11-krotnego oczyszczenia enzymu. Natomiast po filtracji żelowej otrzymano znacznie już podczyszczony preparat o aktywności specyficznej wynoszącej 29,5 U/mg białka, około 16-krotnie większej od aktywności ekstraktu bezkomórkowego (tab.). Występowanie aktywności β -galaktozydazy (20 U/mg białka) jak i β -glukozydazy (8,5 U/mg) tej samej frakcji białek wyeluowanych podczas chromatografii jonowymiennej sugeruje, że frakcja ta zawiera jeden enzym niewielkiej specyficzności substratowej (rys. 2). Aktywność hydrolityczną względem oNPG i pNPG wykazuje też β -glukozydaza z *Sulfolobus solfataricus* (9).

Optymalna temperatura działania badanej β -galaktozydazy (98°C) jest o 11°C wyższa niż dla analogicznego enzymu z *Sulfolobus solfataricus* (rys. 3). W zakresie 95-101°C aktywność preparatu prawie nie zmienia się, ale dalsze podwyższenie temperatury o 5°C powoduje szybki spadek aktywności do około 68% maksymalnej wartości. Podobną optymalną temperaturę działania (103°C) wykazuje β -glukozydaza z *Pyrococcus furiosus* (15). Termostabilność badanego preparatu jest większa od β -galaktozydazy z *Sulfolobus solfataricus*, której czas połowicznej inaktywacji w temperaturze 85°C przy pH 6,5 nie przekracza 3 h (8). Natomiast czasy połowicznej inaktywacji enzymu z *Sulfolobus shibatae* inkubowanego w 90°C w 0,1 M buforach: fos-

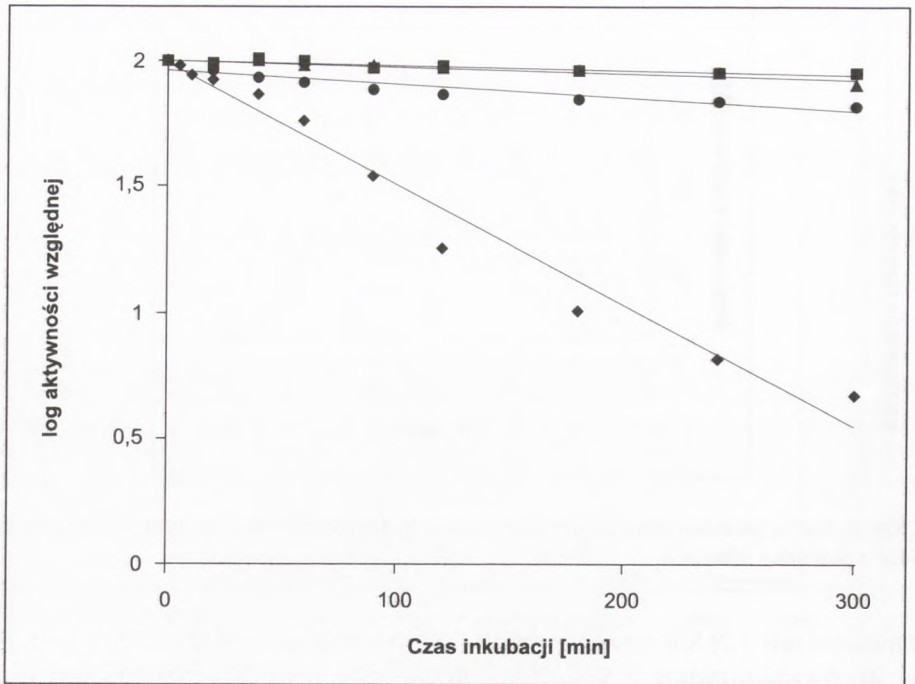


Rys. 3. Wpływ pH środowiska reakcji na aktywność hydrolizy oNPG katalizowanej w 70°C β -galaktozydazą z *Sulfolobus shibatae*.

foranowym (pH 7,2) lub octanowym (pH 5,5) wynoszą odpowiednio 7,9 h oraz 7,0 h (rys. 4). β -galaktozydaza z *Sulfolobus shibatae* zachowuje 50% maksymalnej aktywności w zakresie pH od 3,5 do 6,5 (rys. 5). Pod względem optymalnego pH działania, wynoszącego 5,5 badany preparat prawie nie różni się od β -galaktozydazy z *Sulfolobus solfataricus* o maksymalnej aktywności przy pH 5,4 (16). We wcześniejszych pracach podawano jednak, że optymalna kwasowość środowiska dla działania β -galaktozydazy z *Sulfolobus solfataricus* odpowiada pH 6,5 (8).



Rys. 4. Wpływ temperatury reakcji na aktywność hydrolizy oNPG katalizowanej β -galaktozydazą z *Sulfolobus shibatae* rozpuszczoną w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5).

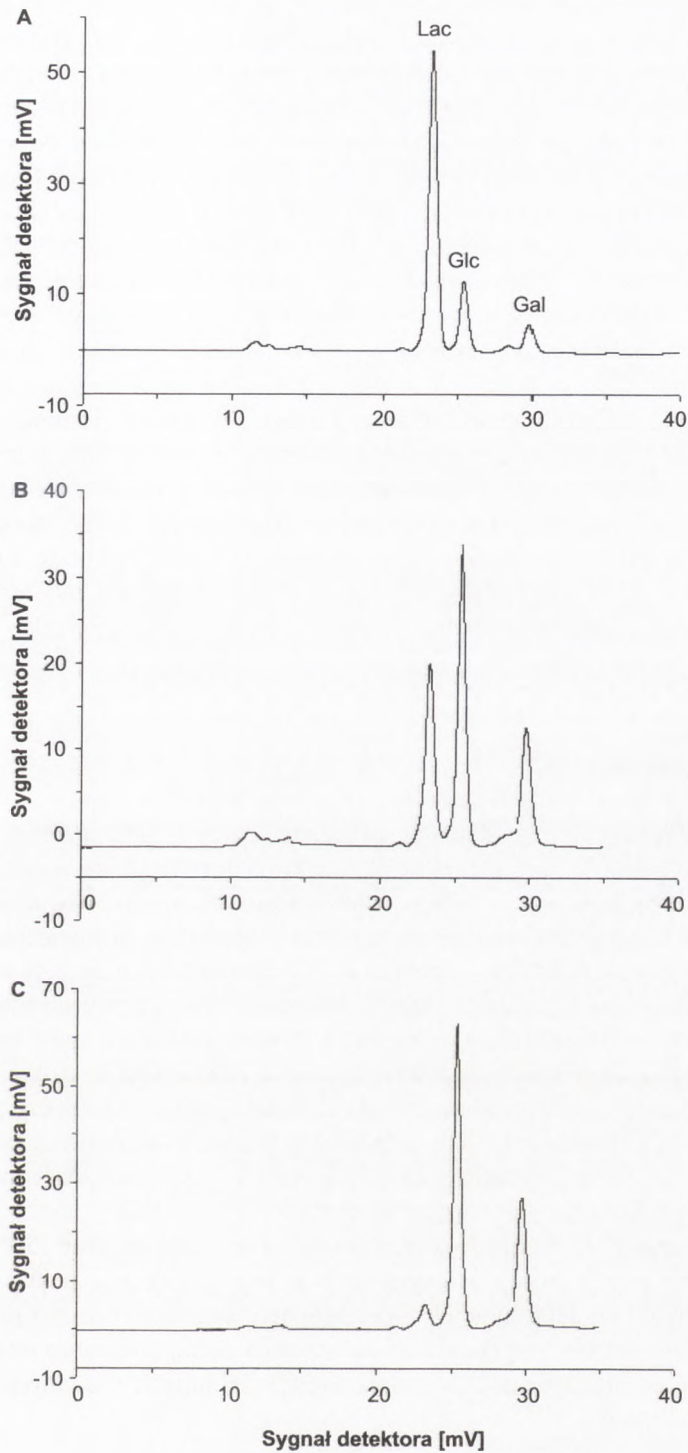


Rys. 5. Termostabilność β -galaktozydazy z *Sulfolobus shibatae* w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,5 w temperaturach 70°C (■), 80°C (▲), 90°C (●) lub 98°C (◆).

W hydrolizatach otrzymanych przy niewielkim stężeniu laktozy (30 mM) prawie jedynymi produktami reakcji katalizowanej β -galaktozydazą z *Sulfolobus shibatae* w 80°C przez 1,5 h są glukoza i galaktoza (rys. 6). Udział tych cukrów w suchej masie hydrolizatu wyliczony na podstawie zmian pola powierzchni pasma laktozy na chromatogramie HPLC wynosi około 97%. Natomiast przy 0,15 M stężeniu laktozy, zbliżonym do jej zawartości w mleku i serwatce zaobserwowano po 1,5 h reakcji tworzenie się niewielkiej ilości niezidentyfikowanych produktów transgalaktozylacji. Oligosacharydy te są jednak w dalszym etapie hydrolizowane po wyczerpaniu się zapasu laktozy względem której β -galaktozydaza wykazuje preferencyjną aktywność.

Rys. 6. Zidentyfikowane metodą HPLC produkty hydrolizy (80°C, pH 5,5) 30 mM roztworu laktozy β -galaktozydazą z *Sulfolobus shibatae* w czasie: 10 min (A), 40 min (B) oraz 100 min (C). Laktoza (Lac), glukoza (Glc), galaktoza (Gal).





Znajdujące się w mleku i serwatce jony wapnia oraz inne kationy wywierają różnicowany wpływ na aktywność β -galaktozydaz pochodzących z różnych źródeł, spowodowany zarówno niejednakową skutecznością katalizowania oksydacji grup tiolowych, prowadzącej do inaktywacji preparatu, jak i zdolnością do stabilizowania konformacji cząsteczek. Jony Na^+ , K^+ i Mg^{2+} zazwyczaj aktywują β -galaktozydazy pochodzące z drobnoustrojów. Natomiast Ca^{2+} , Fe^{2+} i Hg^{2+} są inhibitorami reakcji lub nie powodują zmian aktywności (17-19). Przy 1 mM stężeniu K^+ lub dwuwartościowych kationów: Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} albo Fe^{2+} w środowisku reakcji nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności badanego enzymu. Nie następowała też inaktywacja enzymu przy 5 mM stężeniu kwasu etylenodwuaminocterooctowego (EDTA). Wyniki te sugerują, że wymienione jony metali bezpośrednio nie uczestniczą w katalizie i wiązaniu substratu. Silnymi inhibitorami są natomiast jony Cu^{2+} zmniejszające aktywność β -galaktozydazy o 80% oraz Hg^{2+} i Zn^{2+} powodujące całkowity zanik aktywności enzymatycznej. Inkubacja badanej β -galaktozydazy w 1% roztworze SDS w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 5,5) wywołuje zmniejszenie aktywności preparatu o 75,5%. Podobne oddziaływanie stwierdzono w przypadku analogicznego enzymu z *Sulfolobus solfataricus*, którego cząsteczki są tetramerem i dysocjują pod wpływem SDS na nieaktywne domeny strukturalne (8,16).

4. Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że archeon *Sulfolobus shibatae* jest przydatny jako źródło termostabilnej β -galaktozydazy m.in. ze względu na możliwość hodowli drobnoustroju w tlenowych warunkach na podłożu drożdżowo-peptonowym, bez wydzielania toksycznych metabolitów. Czas połowicznej inaktywacji badanego preparatu w 90°C przy pH 5,5 wynosi około 7 h, co umożliwia jego stosowanie w podwyższonej temperaturze ograniczającej ryzyko mikrobiologicznego zanieczyszczenia reaktora. Niedogodnością hydrolizy laktozy w tych warunkach jest zużycie energii na ogrzanie substratu oraz częściowa cieplna destrukcja witamin, lipidów i reszt niektórych aminokwasów w białkach, jak też możliwość przebiegu reakcji Maillarda i innych przemian składników mleka. Intensyfikacji tych procesów można zapobiec łącząc hydrolizę laktozy z często stosowaną pasteryzacją produktów mlecznych. Funkcje pasteryzatora pełni w tym przypadku reaktor przepływowy z unieruchomioną termostabilną β -galaktozydazą. Zachowanie 50% aktywności w zakresie pH od 3,5 do 6,5 wskazuje na przydatność β -galaktozydazy z *Sulfolobus shibatae* do hydrolizy laktozy w kwaśnej serwatce bez konieczności precyzyjnej regulacji kwasowości środowiska reakcji. Korzystną cechą badanego enzymu jest też brak istotnego oddziaływania Ca^{2+} oraz większości innych zbadanych kationów na aktywność preparatu.

Praca finansowana z funduszu grantu KBN nr PBZ-KBN/021/P06/32.

Literatura

1. Petzelbauer I., Zeleny R., Reiter A., Kulbe K. D., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 140-149.
2. Bednarski W., Kowalewska-Piontas J., (2000), *Biotechnologia*, 49, 131-141.
3. Synowiecki J., Maciuńska J., (2000), *Biotechnologia*, 48, 117-123.
4. Petzelbauer I., Nidetzky B., Haltrich D., Kulbe K. D., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 322-332.
5. Dąbrowski S., Maciuńska J., Synowiecki J., (1998), *Mol. Biotechnol.*, 10, 217-222.
6. Jan R. L., Wu J., Chaw S., Tsai C., Tsen S., (1999), *Intern. J. System. Bacteriol.*, 49, 1809-1816.
7. Stetter K. O., (1989), *Bergey's Manual Syst. Bacteriol.*, 3, 2250-2252.
8. Pisani F. M., Rella R., Raia C. A., Rozzo C., Nucci R., Gambacorta A., de Rosa M., Rossi M., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 187, 321-328.
9. Kengen S. W. M., Stams A. J. M., (1994), *Biocatalysis*, 11, 79-88.
10. Brock T. D., Brock K. M., Belly R. T., Weiss R. L., (1972), *Arch. Microbiol.*, 84, 54-68.
11. Bradford M. M., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
12. Craven G. R., Steers E., Anfinsen C. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 2468-2477.
13. Hugget A. S. C., Nixon D. A., (1955), *Biochem. J.*, 66, 12-19.
14. Maciuńska J., Czyż B., Synowiecki J., (1998), *Food Chem.*, 63, 441-445.
15. Sunna A., Moracci M., Rossi M., Antranikian G., (1997), *Extremophiles*, 1, 2-13.
16. Pouwels J., Moracci M., Cobucci-Ponzano B., Perugino G., Oost J., Kaper T., Lebbink J. H. G., de Vos W., Ciaramella M., Rossi M., (2000), *Extremophiles*, 4, 157-164.
17. Kowalewska-Piontas J., (1993), *Przegląd Mlecz.*, 8, 197-200.
18. Onishi N., Tanaka T., (1995), *Appl. Environm. Microbiol.*, 61, 4026-4030.
19. Thomas G. V., Kaira M. S., Singh A., (1980), *Indian J. Experim. Biol.*, 18, 1020-1023.