

ПУТЬ ТРАНСФОРМАЦИИ ЛАКТОЗЫ В ЭТАНОЛ ДРОЖЖАМИ KLUYVEROMYCES LACTIS

Е.С. Лушникова, студент
Волгоградский государственный университет
(Россия, г. Волгоград)

DOI:10.24412/2500-1000-2024-4-4-20-23

Аннотация. В настоящем исследовании представлены результаты анализа ферментативного процесса переработки лактозы в этанол дрожжами *Kluyveromyces lactis*. Актуальность исследования обусловлена недостатком структурированных данных о полном каталитическом пути биотрансформации лактозы в этанол дрожжами *K. lactis*. В ходе исследования был проведен анализ структуры и свойств ферментов, участвующих в данном процессе. Выяснилось, что осуществляемый процесс проходит в 9 этапов с участием 9 ферментов. Исследование позволило составить наглядную таблицу каталитических реакций, участвующих в процессе переработки лактозы в этанол дрожжами *K. lactis*.

Ключевые слова: *Kluyveromyces lactis*, трансформация лактозы в этанол, молочная сыворотка, подсырная сыворотка, переработка лактозы.

На предприятиях, выпускающих творожную и сырную продукцию, ежедневно образуются тонны побочного продукта – сыворотки, содержащей большое количество лактозы. Значительная часть данного продукта утилизируется в окружающую среду, нанося ощутимый ущерб окружающей среде [1].

Трансформация лактозы в этанол помогает завершить цепочку переработки молока, принося дополнительную прибыль и частично решает проблему утилизации лактозосодержащего сырья [2]. В качестве катализаторов ферментации лактозы используют дрожжи *Kluyveromyces lactis* [3].

Цель исследования – анализ ферментативного пути трансформации лактозы в этанол дрожжами *Kluyveromyces lactis*.

Для проведения теоретического исследования биотрансформации лактозы в этанол дрожжевыми культурами *K. lactis* использовалась информация из открытых баз данных белков и ферментов (KEGGA, NCBI, SCOP, UniProt).

Для биотрансформации молочной сыворотки в этанол дрожжи *Kluyveromyces lactis* сначала осуществляют гидролиз лактозы в глюкозу и галактозу, затем метаболизируют глюкозу по окислительному пентозофосфатному пути. В результате ряда ферментативных превращений обра-

зуется ацетил-фосфат, восстановление которого в два этапа приводит к появлению молекулы этилового спирта [4].

В начале пути выработки биоэтанола из молочной сыворотки происходит гидролиз дисахарида лактозы ферментом из семейства β -галактозидаз – лактазы. Лактаза представляет собой экзогликозидазу, которая гидролизует бета-1-4-гликозидную связь, образованную между молекулами галактозы и глюкозы. Является четвертичной структурой, свёрнутой по классической для ферментов семейства GH2 схеме. Состоит из 1025 аминокислот, в последовательности которых определяется в 5 доменов.

В результате, из молекулы лактозы образуется по одной молекуле галактозы и глюкозы за счёт расщепления β -галактозидных связей. Далее, фермент гексокиназа катализирует фосфорилирование D-глюкозы с использованием энергии АТФ, результатом которой является образование глюкозо-6-фосфата. Гексокиназа относится к классу трансфераз и обладает способностью переносить неорганическую фосфатную группу с АТФ на субстрат. Длина последовательности состоит из 475 аминокислот.

Далее происходит окисление глюкозо-6-фосфата с помощью фермента из группы

оксидоредуктазы – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. G6PD представляет собой цитозольный фермент – первый фермент, катализирующий реакцию пентозофосфатного гликолиза, восстанавливая НАДФ до НАДФН. Состоит из 515 аминокислот и обычно находится в виде димера двух идентичных мономеров.

Затем происходит реакция гидролиза 6-фосфоглюконо- δ -лактона до 6-фосфоглюконата с помощью 6-фосфоглюконолактоназы посредством переноса протона на атом кислорода в кольце O5. 6PGL является цитозольным ферментом, относящимся к классу гидролазы. Третичная структура 6PGL состоит в виде α/β -гидролазной складки с остатками активного центра, сгруппированными на петлях α -спиралей. Состоит из 321 аминокислоты.

Следующим шагом в процессе является декарбоксилирующее восстановление 6-фосфоглюконата в рибулозо-5-фосфат в присутствии НАДФ ферментом 6-фосфоглюконатдегидрогеназа. 6PGD принадлежит к группе окислительных декарбоксилаз. Является гомодимером и содержит смешанный параллельный и антипараллельный 6-цепочечный бета-лист. 6PGD состоит из высококонсервативной последовательности 492 аминокислот.

Следующий этап неокислительной фазы пентозофосфатного пути – это взаимное превращение между D-рибулозо-5-фосфатом и D-ксилоулозо-5-фосфатом с помощью фермента фосфопентозэпимеразы, принадлежащей к семейству изомераз. Кроме того, в базе данных Structural

Classification of Proteins (SCOP) определено суперсемейство «связывания рибулозо-фосфата», членом которого является эта эпимераза. PPE существует в виде гомодимера, который сворачивается в бочкообразную структуру β/α . PPE состоит из 327 аминокислот.

Затем происходит активация фосфокетотлазой реакции расщепления D-ксилоулозо-5-фосфата на ацетил-фосфат. Фосфокетотлаза может использовать 3 различных сахарофосфата в качестве субстратов и лишь один кофактор - дифосфат тиамина. Фермент имеет бочкообразную структуру TIM (α/β баррель).

Далее происходит двухэтапное восстановление ацетилфосфата до этилового спирта. С помощью фосфатацетилтрансферазы ацетил-фосфат дефосфорилируется до уксусного альдегида. Фосфатацетилтрансфераза принадлежит к семейству ацилтрансфераз, передающим группы, отличные от аминокислотных групп. Пептидная последовательность из 714 аминокислот сворачивается в третичную структуру белка $\alpha+\beta$.

Последним этапом происходит окисление ацетальдегида до этанола, катализируемое алкогольдегидрогеназой. ADH1 – фермент семейства оксидоредуктаз, катализирующих окисление первичных и вторичных спиртов до альдегидов и кетонов. ADH1 содержит цинк в своем каталитическом центре. Состоит из 350 аминокислот.

В таблице указана общая информация о протекающих в ходе процесса биотрансформации лактозы в этанол реакций.

Таблица. Процесс биотрансформации лактозы в этанол с указанием принимавших участие веществ и ферментов

Субстраты	Продукты	Фермент	Описание
Лактоза	Глюкоза и галактоза	Лактаза, EC 3.2.1.108	Гидролиз дисахарида лактозы на глюкозу и галактозу.
Глюкоза + АТФ	Глюкозо-6-фосфат + H ⁺ + ADP	Гексокиназа, EC 2.7.1.1	Реакция фосфорилирования глюкозы с использованием энергии АТФ.
Глюкозо-6-фосфат + NADP ⁺	6-фосфоглюконо-δ-лактон + NADPH + H ⁺	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, EC 1.1.1.49	Гидрирование. Гидроксильная группа при первом атоме углерода глюкозо-6-фосфата превращается в карбонильную, образуя лактон, при этом также происходит восстановление NADPH.
6-Фосфоглюконо-δ-лактон + H ₂ O	6-фосфоглюконат + H ⁺	6-Фосфоглюконолактоназа, EC 3.1.1.31	Гидролиз 6-Фосфоглюконо-δ-лактона до 6-фосфоглюконата.
6-Фосфоглюконат + NADP ⁺	D-рибулозо-5-фосфат + NADPH + H ⁺ + CO ₂	6-Фосфоглюконатдегидрогеназа, EC 1.1.1.44	6PGD катализирует и дегидрирование, сопровождающееся восстановлением NADP, и декарбоксилирование.
D-рибулозо-5-фосфат	D-ксилулозо-5-фосфат	Фосфопентозэпимераза, EC 5.1.3.1	Превращение D-рибулозо-5-фосфата в D-ксилулозо-5-фосфат. изомера
D-ксилулозо-5-фосфат + фосфат	Ацетил-фосфат + D-глицеральдегид-3-фосфат + H ₂ O	Фосфокетолаза EC 4.1.2.9	Расщепление ксилулозо-5-фосфат до ацетил-фосфата.
Ацетил-фосфат	Ацетальдегид	Фосфатацетилтрансфераза, EC 2.3.1.4	Перенос ацетильной группы от ацетил-фосфат до ацетальдегида.
Ацетальдегид + NADH + H ⁺	Этанол + NAD ⁺	Алкогольдегидрокиназа, EC 1.1.1.1	Восстановление ацетальдегида до этанола.

Описание структурной характеристики ферментов *Kluuyveromyces lactis*, участвующих в биотрансформации лактозы в этанол позволит получить подробное представление о данном процессе, и создать

опорные данные для применения процесса в молочной промышленности с целью получения экономической выгоды и предотвращения ущерба окружающей среде.

Библиографический список

- Исина, Н.Ю. Финансовый механизм внедрения эколого-ориентированной технологии переработки молочной сыворотки / Н.Ю. Исина // Труды Костромской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 90. – С. 111-119.
- Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered *Escherichia coli* / Pasotti L., Zucca S., Casanova M., ect. // BMC Biotechnology. – 2017. – №17. – С. 48.
- Молекулярный полиморфизм генов β-галактозидазы LAC4 у молочных и природных штаммов дрожжей *Kluuyveromyces* / Л.В. Лютова, Г.И. Наумов, А.В. Шнырева и др. // Молекулярная биология. – 2021. – Т. 55, №1. – С. 75-85.
- Микробиология: Учебник для студентов биологических специальностей вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева // – 4-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.

PATHWAY OF LACTOSE TO ETHANOL TRANSFORMATION BY THE YEAST KLUYVEROMYCES LACTIS

E.S. Lushnikova, Student
Volgograd State University
(Russia, Volgograd)

***Abstract.** This study presents the results of analyzing the enzymatic process of lactose conversion to ethanol by the yeast *Kluyveromyces lactis*. The relevance of the study is due to the lack of structured data on the complete catalytic pathway of lactose biotransformation into ethanol by *K. lactis* yeast. The study analyzed the structure and properties of enzymes involved in this process. It was found out that the realized process takes place in 9 stages with the participation of 9 enzymes. The study made it possible to draw up a visual table of catalytic reactions involved in the processing of lactose into ethanol by *Kluyveromyces lactis* yeast.*

***Keywords:** *Kluyveromyces lactis*, transformation of lactose to ethanol, whey, cheese whey, lactose conversion.*