

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ: БИОХИМИЧЕСКОЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

А.А. Костеневич, Л.И. Сапунова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

e-mail: A.Kastsianeovich@gmail.com

β -Галактозидаза (лактаза, β -галактозид-галактогидралаза, КФ 3.2.1.23) относится к классу гидролаз, которые действуют на О-гликозильные соединения и отщепляют концевой нередуцированный остаток β -D-галактозы в β -галактозидах, включая лактозу, с образованием свободных моносахаридов [1] либо переносят остаток β -D-галактозы на молекулу лактозы или других β -D-галактозидов с образованием галактоолигосахаридов (рисунок 1) [2]. В результате ферментативной реакции трансгалактозилирования образуются олигосахариды различной степени полимеризации: α -D-глю-(1 \rightarrow 4)-[β -D-гал-(1 \rightarrow 6)-] n , где n – количество галактопиранозильных колец, обычно 2–5, реже 6–10, связанных β -(1 \rightarrow 6)-связью друг с другом и β -(1 \rightarrow 4)-связью с последним глюкопиранозильным остатком молекулы олигосахарида [3, 4].

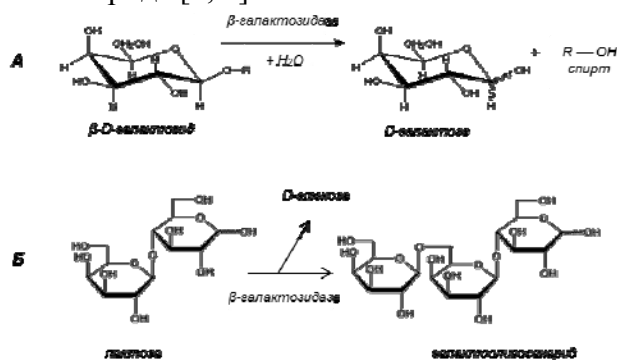
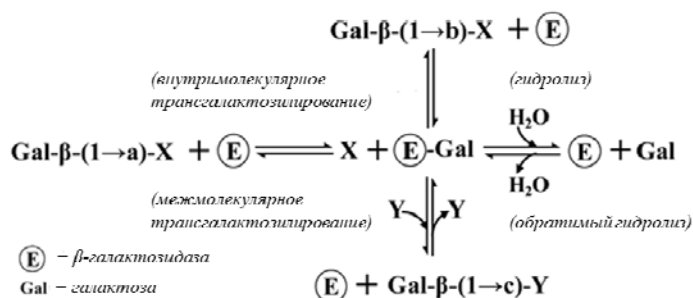


Рисунок 1 – Схема ферментативного гидролиза β -D-галактозида (А) и трансгалактозилирования лактозы (Б)

Схема обратимых реакций гидролиза и трансгалактозилирования β -D-галактозидов с участием β -галактозидазы приведена на рисунке 2.

Свойство β -галактозидазы предпочтительно катализировать ту или иную из указанных реакций и обуславливает два основных направления ее использования. Традиционно фермент применяется для производства из молока и отходов его переработки продуктов функционального питания и кормов с пониженным содержанием лактозы и глюкозо-галактозных сиропов, а также лекарственных препаратов для компенсации лактазной недостаточности [5, 6]. По разным данным, до 90–95% населения Земли, в том числе около 70% взрослых людей, не усваивают лактозу, что обусловлено связанным с возрастом повышением уровня лактозной интолерантности [7]. Ситуация осложняется тем, что современная пищевая промышленность активно использует молочный сахар при производстве кондитерских и мясных изделий, продуктов быстрого приготовления, напитков, а фармацевтическая промышленность – в качестве наполнителей лекарственных средств. Поэтому увеличение производства безлактозных продуктов питания и содержащих β -галактозидазу лекарственных средств является актуальной задачей, своевременное решение которой способствует укреплению здоровья людей с лактазной недостаточностью (лактозной непереносимостью) (рисунок 3) [5, 6].

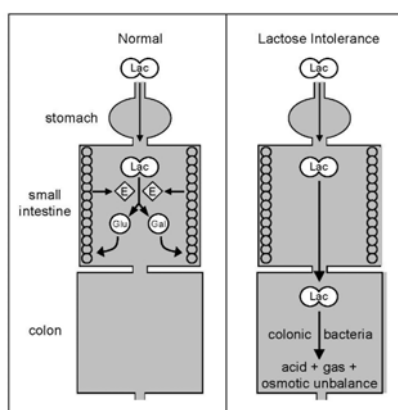
В меньшей мере изучено и используется свойство микробных β -галактозидаз осуществлять реакцию трансгликозилирования, востребованное при производстве галактоолигосахаридов. Последние обладают пребиотическим действием, угнетают рост патогенных микроорганизмов, стимулируют перистальтику кишечника, способствуют усвоению кальция и магния, активизируют специфические и неспецифические системы защиты человека и животных, проявляют иммуномодулирующее и гипохолестеринемическое действие, снижают риск развития опухолей [4, 9].



a, b и c ($a \neq b$) указывают на положение гликозидной связи; X – донор остатка галактозида; Y – акцептор остатка β -D-галактозида. В реакции внутримолекулярного трансгалактозилирования донор β -D-галактозида X всегда является также и его акцептором (меняется лишь место положения связи). Исходным субстратом фермента обычно является лактоза ($a = 4$, X – глюкоза), но могут быть также и промежуточные продукты реакции. В качестве акцептора Y могут

выступать глюкоза, галактоза, галактоза-галактоза или [галактоза]_n-глюкоза ($1 \leq n \leq 6$)

Рисунок 2 – Схема ферментативного гидролиза β -D-галактозидов и синтеза галактоолигосахаридов [4]



А: В норме, лактоза (Lac) проходит через желудок, а затем в тонком кишечнике подвергается гидролизу с участием β -галактозидазы (β), локализованной на плазматических мембранах энтероцитов. Образовавшаяся глюкоза и галактоза впоследствии всасываются.

Б: У людей, страдающих лактозной непереносимостью, организм не вырабатывает β -галактозидазу. Вследствие этого лактоза, в неизменном виде попадающая в толстый кишечник, сбраживается анаэробной микрофлорой, что вызывает образование органических кислот, газов и осмотический стресс

Рисунок 3 – Утилизация лактозы в организме человека в норме и при лактозной интолерантности [8]

Очевидно, что именно пищевая и, в меньшей мере, фармацевтическая промышленность и сельское хозяйство являются основными потребителями препаратов β -галактозидазы различной степени очистки во все возрастающих объемах. Это, в свою очередь, объясняет непреходящий интерес исследователей к этому достаточно изученному ферменту.

Классификация β -галактозидаз требует совершенствования вследствие накопления новых данных, полученных с использованием современных молекулярно-генетических методов. Так, общепризнанная Международная классификация и номенклатура ферментов основывается на их субстратной специфичности и, в отдельных случаях, на молекулярном механизме действия. Согласно этой классификации, β -галактозидазу относят к классу гидролаз (3), подклассу гликозил-гидролаз (3.2), подподклассу гликозидаз (3.2.1) без учета структурных особенностей ферментных белков [1].

На информации об аминокислотной последовательности молекулы фермента базируется классификация, объединяющая гликозил-гидролазы (CAZy database) в семейства [10, 11]. Согласно предлагаемой системе, в семейство объединяют гомологичные белки со степенью идентичности более 30%. Признавая, что сходство аминокислотных последовательностей белка определяет сходство способа укладки его полипептидной цепи (третичной структуры), эта классификация отражает структурные особенности ферментных белков и эволюционные связи между ферментами различных микроорганизмов, а также содержит информацию о механизме их действия. С учетом того, что третичная структура белка более консервативна, чем первичная, семейства объединяют в кланы – группы семейств со значительным сходством третичных структур. Это указывает на возможное родство данных белков и подразумевает сходство строения их каталитических центров и механизмов каталитического действия.

С увеличением числа идентифицированных аминокислотных последовательностей гликозил-гидролаз, их классификация постоянно обновляется и в настоящее время насчитывает 14 кланов, разбитых на 120 семейств [10, 12].

β -Галактозидазы различного происхождения относят к 1, 2, 35 и 42 семействам гликозил-гидролаз (таблица 1). Они, в свою очередь, принадлежат клану GH-A,

объединяющему β/α -белки скаталитически активными остатками глутаминовой кислоты. На основании результатов изучения аминокислотных последовательностей и филогенетического анализа сделано заключение о том, что все 4 семейства гликозил-гидролаз, к которым относятся β -галактозидазы, имеют различное происхождение и эволюционно удалены друг от друга [10, 12].

Таблица 1 – Ферменты-представители 1, 2, 35 и 42 семейств гликозил-гидролаз [10]

Семейство	Активности ферментов (входящие)	Количество Бактериальных β -галактозидаз	Количество экспериментально охарактеризованных β -галактозидаз	Общее количество β -галактозидаз	Всего представителей семейства
1	β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23); β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21); β -маннозидазы (КФ 3.2.1.25); β -глюкоронидазы (КФ 3.2.1.31); β -ксилозидазы (КФ 3.2.1.37); β -D-фукозидазы (КФ 3.2.1.38); флоризингидролазы (КФ 3.2.1.62); экзо- β -1,4-глюканазы (КФ 3.2.1.74); 6-фосфо- β -галактозидазы (КФ 3.2.1.85); 6-фосфо- β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.86); стриктозидин- β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.105); лактаза (КФ 3.2.1.108); амигдалин- β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.117); пруназин- β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.118); раукафрицин- β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.125); тиоглюкозидазы (КФ 3.2.1.147); β -примеверозидаза (КФ 3.2.1.149); изофлавоноид-7-O- β -апиозил- β -глюкозидаза (КФ 3.2.1.161); гидроксиизоуратгидролаза (КФ 3.-.-.-); β -глюкозидаза (КФ 3.2.1.-); АВА-специфичная β -глюкозидаза (КФ 3.2.1.175)	–	4	–	5020
2	β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23); β -маннозидазы (КФ 3.2.1.25); β -глюкоронидазы (КФ 3.2.1.31); маннозилгликопротеин-эндо- β -маннозидазы (КФ 3.2.1.152); экзо- β -глюкозамидаза (КФ 3.2.1.165);	–	111	–	3635
35	β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23); глюкозамидаза (КФ 3.2.1.165); β -1,3-галактозидаза (КФ 3.2.1.-);	432	Бактерии (11) Археи (2)	–	789
42	β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23); α -L-арабинопиранозидазы (КФ 3.2.1.-)	640	Бактерии (50) Археи (2)	651	651

β -Галактозидазы условно разделяют на вне- и внутриклеточные. Внутриклеточными являются ферменты большинства бактерий и некоторых дрожжей, внеклеточными – ферменты грибов. Внутриклеточным β -галактозидазам свойственна высокая молекулярная масса олигомерной молекулы, отсутствие углеводного компонента, выраженная зависимость каталитической активности от ионов двухвалентных металлов – Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} . Для них также характерны высокая термо- и pH-чувствительность [13], часто – ингибирование EDTA, Hg^{2+} , окисляющими агентами, фенантролином.

β -Галактозидазы дрожжей, как правило, являются олигомерами, имеющими молекулярную массу от 200 до 600 кДа и представлены различным количеством субъединиц. Ферментные белки этих микроорганизмов отличаются высоким содержанием в их структуре цистеина, термолабильны, проявляют максимум активности в диапазоне pH 6,8–7,2, активируются ионами одно- и двухвалентных металлов и полностью инактивируются п-хлормеркурийбензойной кислотой (ПХМБ).

β -Галактозидазы грибов являются внеклеточными гликопротеинами, представленными одной полипептидной цепью массой 96–150 кДа и содержащими в своем составе 5–30% углеводов, которые и определяют их высокую кислото- и термостабильность. В составе молекулы грибных ферментных белков обнаруживается большое количество отрицательно заряженных и незначительное количество серосодержащих аминокислот, что обуславливает устойчивость ферментов к инактивации ПХМБ. Ионы двухвалентных металлов не влияют на β -галактозидазу грибного происхождения.

Для грибных β -галактозидаз, в отличие от ферментов дрожжей и бактерий, характерна низкая удельная активность. Например, эта характеристика очищенных β -галактозидаз грибов *Curvularia inaequalis* и *Alternaria tenuis* составляют 52 и 160 ед/мг, соответственно, а фермента *Bacillus subtilis* – 3110 ед/мг [14].

β -Галактозидазы бактериального происхождения за редким исключением [15] представляют собой белки внутриклеточной локализации, которые различаются молекулярной массой, количеством субъединиц, аффинностью к различным субстратам, pH-оптимумом действия, термостабильностью. Сегодня наиболее полно охарактеризованной является β -галактозидаза *Escherichia coli*, которая имеет молекулярную массу 540 кДа и состоит из четырех субъединиц. Бактериальные β -галактозидазы, как и дрожжевые, проявляют максимум активности в диапазоне pH 6,5–7,5, тогда как грибные ферменты – при pH 3,5–5,0 [16].

Некоторым бактериальным β -галактозидазам свойственны высокие температурный оптимум действия и термостабильность [17, 18]. Например, продуцируемый термофильными анаэробными бактериями NA10 фермент стабилен при 70°C в течение 3 ч [19], а β -галактозидаза *Sulfolobus solfataricus* с оптимумом действия при 95°C сохраняет 50% активности после 2,4 ч инкубации при 75°C [18]. Максимум активности ферментов *Thermus* sp. T2 ATCC 27737 [20] проявляется при 70°C, а *Thermus* sp. IB-21 ATCC 43815 [21] и *Thermus thermophilus* A4 [22, 23] – при температуре $\geq 90^\circ\text{C}$.

В ограниченном числе публикаций представлены данные о β -галактозидазах мезо- и психрофильных микроорганизмов, проявляющих активность при низких температурах. Сообщается, например, о каталитической активности ферментов мезофильных бактерий *Xanthomonas* sp. и *Bacillus subtilis* при 10°C [24, 25]. Указанный температурный режим является оптимальным для действия ферментов психрофильных бактерий *Arthrobacter psychrolactophilus* [26].

Сообщается также, что β -галактозидазы различных штаммов *Arthrobacter* sp. представлены 2–3 изоформами, которые при температуре 25°C существуют в форме неактивных субъединиц, при 4°C – в виде каталитически активного гомотетрамера [27]. Фермент *Arthrobacter* sp. SB также существует в виде двух молекулярных форм, различающихся температурными оптимумами действия – при 15 и 35°C [28].

Одна из двух (возможно, трех) изоформ β -галактозидазы *Arthrobacter* sp. C2-2 при 5°C проявляет 20% своей максимальной активности, обнаруживаемой при 45°C [29]. Предполагается также, что высокая каталитическая активность фермента (39,7% от максимума, выявляемого при 40°C является следствием продукции *Bacillus* sp. не менее двух молекулярных форм ферментного белка [30].

β -Галактозидаза *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAE 79b характеризуется оптимумом действия при 26°C и проявляет не менее 33% активности при 4°C [31], а фермент *Pseudoalteromonas* sp. 22b – 20% от максимума, обнаруживаемого при 40°C [32]. Каталитически активную β -галактозидазу даже при 0°C продуцируют базидиомицетные дрожжи *Guehomyces pullulans*, растущие при температуре $\leq 5^\circ\text{C}$ [33].

Принято считать, что природный субстрат β -галактозидазы – лактоза, однако некоторые ферменты, в том числе и животного происхождения, не обладают сродством к этому дисахариду. Как правило, наибольшую аффинность ферменты различного происхождения проявляют в отношении синтетических субстратов – орто- и паранитрофенил- β -D-галактопиранозидов (ОНФГ и ПНФГ). Исключением являются некоторые β -галактозидазы растительного происхождения, которые гидролизуют пектины, целлюлозы и ряд п-нитрофенилгликозидов [34].

Многие β -галактозидазы, в том числе не обладающие высоким сродством к лактозе, ингибируются галактозой и, в меньшей степени, глюкозой. Например, ингибирующее влияние указанных соединений (0,01 М) на фермент *Bacillus stearothermophilus* NRC-16 составляет 30 и 7%, соответственно. В то же время галактоза снижает, а глюкоза не влияет на активность β -галактозидазы термофильных анаэробных бактерий NA10 [19]. Сообщается, кроме того, об активирующем действии глюкозы (1–10%) на фермент *Thermoanaerobacter* sp. [17].

Для β -галактозидаз *Thermusaquaticus* [35], *Pediococcus* [36], *Sulfolobus solfataricus* [18] характерна активация каталитической активности сульфгидрильными агентами (дитиотрейтолом, цистеином, 2-меркаптоэтанолом) вследствие того, что -SH группы могут вовлекаться в процесс ферментативного катализа или способствовать сохранению конформации, свойственной каталитически активному белку. Для таких β -галактозидаз классическим ингибитором является ПХМБ.

Бактериальные β -галактозидазы различаются между собой строением белковых молекул, обуславливающим принципиально различное влияние на них ионов металлов. Так, β -галактозидазы различных штаммов *E. coli* и других микроорганизмов, выделяющиеся большим молекулярными массами и состоящие из нескольких субъединиц, активируются ионами Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ . Ионы Mg^{2+} , например, связываются с мономерами фермента *E. coli*, предохраняя белок от диссоциации на субъединицы и ускоряя образование субстрат-ферментного комплекса. Ионы щелочных, щелочно-земельных металлов и EDTA являются активаторами β -галактозидазы *Thermoanaerobacter* sp., тогда как ионы Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} – ингибиторами [17]. Активирующее действие на фермент *Thermusaquaticus* оказывают ионы Mn^{2+} и Fe^{2+} [35], на β -галактозидазу *Pediococcus* sp. – Mg^{2+} , Mn^{2+} или Zn^{2+} [36]. Отмечается снижение активности фермента *Pediococcus* sp. в присутствии ионов Ca^{2+} , Hg^{2+} и EDTA [36], тогда как не обнаружена зависимость активности β -галактозидаз *Sulfolobus solfataricus* [18] от ионов металлов и EDTA, при том, что названные белки, по-видимому, являются металлоферментами.

Согласно данным таблицы 1, β -галактозидазы семейства 1 обладают широкой субстратной специфичностью, их активность не активируется металлами. Ферменты семейства 2 высоко специфичны в отношении β -D-галактозидов и в каталитическом центре содержат ионы двухвалентных металлов – магния, кальция, марганца. β -Галактозидазы семейства 35 являются кислыми гликозидазами, гидролизующими α -L-арабинозиды и содержащими галактозу полисахариды, например, арабиногалактан [10]. В семейство 42 (β -галактозидазы, КФ 3.2.1.23; α -L-арабинопиранозидазы, КФ 3.2.1.-) включены β -галактозидазы, имеющие различное происхождение, характеризующиеся различными физико-химическими свойствами и структурными особенностями и не сходные по составу аминокислотных последовательностей с ферментами других семейств.

Бактериальные β -галактозидазы – самая многочисленная группа ферментов среди гликозил-гидролаз с установленной первичной структурой, депонированной в электронных базах данных. Большую часть этих ферментов относят к семействам 2 и 42 (таблица 2 и таблица 3).

Семейству 2 принадлежит также β -галактозидаза *Escherichia coli*, в активном центре которой присутствуют катионы магния [44, 45].

Таблица 2 – Характеристика β -галактозидаз семейства 2

Организм	Акроним белка/гена	Масса мономера, кДа	Масса мультимера, кДа	Субстрат	Термооптимум, °С	pH-оптимум	Источник литературы
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> F2	rBglAp	130	–	ОНФГ, лактоза	10	8	[37]
<i>Arthrobacter</i> sp. ON 14	galA	116	–	ОНФГ, лактоза	15	8	[38]
<i>Arthrobacter</i> sp. 20B	β -galactosidase	116	460	ОНФГ ПНФГ	25	6–8	[39]
<i>Arthrobacter</i> sp. C2-2	C2-2-1 β -isoenzyme	111	660	Лактоза, ОНФГ	40	7,6	[29]
<i>Arthrobacter</i> sp. SB	BgaS	–	–	ОНФГ, ПНФГ	18	7,2	[28]
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 31382	β -Gal-A β -Gal-B β -Gal-C β -Gal-D	–	190 155 135 92	Лактоза, ОНФГ	–	–	[40]
<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM20215	BIF3 BIF1 BIF2	360 112 130	180 620 236	ОНФГ	–	–	[41]
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b		115	460	ОНФГ, ПНФГ, лактоза	40	6–8	[42]

Таблица 3 – Характеристика β -галактозидаз семейства 42

Организм	Акроним белка/гена	Масса мономера, кДа	Масса мультимера, кДа	Субстрат	Термооптимум, °С	pH-оптимум	Источник литературы
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> B7	BgaG Isozyme 12	71	–	ОНФГ	45–50	6,6	[54]
<i>Arthrobacter</i> sp. ON 14	galA (сем2) galB	–	–	ОНФГ	37	–	[38]
<i>Arthrobacter</i> sp. 32c	β -galactosidase gene	70–76	195	ОНФГ	50	6,5	[55]
<i>Bacillus licheniformis</i>	LacBl	80	–	ОНФГ	45	5,7	[56]
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Bgal II	89 81	350 235	ПНФГ	50	6	[57, 58]
<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM20215	INF1	73	140	–	–	–	[41]
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>infantis</i>	INF1	73	140	ОНФГ	–	–	[41]
<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>infantis</i> HL96	B-gal III	76	–	ОНФГ	40	8	[59]
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> BA	BgaB	–	–	ОНФГ	30	6–7	[60]
<i>Clostridium cellulovorans</i>	BgaA	78	170	ПНФГ, ПНФГа п*	30–40	6	[61]
<i>Haloferax lucentense</i> DSM	BgaH	78	180	ОНФГ	–	–	[62]
<i>Planococcus</i> sp. 'SOS Orange'	BgaA	75	155	ОНФГ	42	6,5	[64]
<i>Thermus</i> sp. IB-21 ATCC43815	BgaA	73	73	ПНФГ	90	5–6	[21]
<i>Thermus</i> sp. T2 ATCC 27737	BgaA	–	–	ОНФГ	70	5	[20]
<i>Thermus thermophilus</i> A4	A4-B-gal	75	86 170	ОНФГ	>90	6,5	[22, 23]

Примечание: *ПНФГап – п-нитрофенил- α -L-арабинопиранозид.

Обитающие в Антарктике бактерии *Arthrobacter* sp. синтезируют два изофермента β -галактозидазы, один из которых гидролизует лактозу [29]. Этот фермент, также как и β -

галактозидаза *E. coli*, является гомотетрамером, субъединица которого содержит 1023 аминокислотных остатка (а.о.). Высокая степень сходства аминокислотных последовательностей обнаружена у ферментов *Klebsiella pneumonia* и *E. coli* [45]. Предполагается, что эти ферментные белки состоят в близком родстве и происходят от одного белка-предшественника. Синтезируемая бактериями *Klebsiella pneumonia* β-галактозидаза массой 118 кДа также существует в виде каталитически активных гомотетрамеров, каждый из мономеров которого содержит 1034 аминокислотных остатка.

Молекулы многих бактериальных β-галактозидаз являются олигомерами, как, например, фермент *Thermus aquaticus* YТ-1, имеющий молекулярную массу более 700 кДа [35]. Ферментный белок *Thermus* sp. T2 идентифицирован как октомер с молекулярной массой 550 кДа. Его димерная форма имеет массу 140 кДа [20]. Изоферменты штаммов В7, D2 и D5 бактерий *Arthrobacter* sp. при температуре 25°C представлены неактивными субъединицами, а при 4°C – каталитически активными гомотетрамерами [27].

β-Галактозидаза *Rhizobium meliloti* представляет собой димер массой 174 кДа [46], а каждая из двух каталитически неактивных субъединиц фермента *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* – 85 кДа [47]. Три изоформы фермента *Bacillus circulans* представлены три-, ди- и мономерами с молекулярными массами соответственно 212, 145 и 86 кДа [48]. В виде каталитически активных гетеродимеров существуют β-галактозидазы бактерий *Leuconostoc lactis* [49] и *Lactobacillus sakei* [50].

Как видно из приведенных выше данных, каталитическая активность присуща, как правило, ди- и тетрамерным формам бактериальных β-галактозидаз, иногда – их мономерам. Например, β-галактозидаза термофильных бактерий *Saccharopolyspora rectivirgula*, относящаяся к семейству 2, представляет собой мономер размером 145 кДа и содержит в своем составе уникальную аминокислотную последовательность, не встречающуюся в других белках и включающую приблизительно 200 остатков [51, 52]. Именно ее наличием обязана каталитическая активность мономеров данного фермента, в активном центре которого обнаруживаются катионы кальция, магния и марганца в различном сочетании. В форме активного мономера существует также β-галактозидаза *Lactobacillus bulgaricus* [53].

Часть β-галактозидаз бактериального происхождения принадлежит гликозил-гидролазам семейств 1 и 42. К семейству 1 относится термостабильная β-галактозидаза *Sulfolobus solfataricus*, активность которой не зависит от катионов металлов. Фермент является тетрамером с массой мономеров, равной 60 кДа [18]. Небольшие по размеру мономеры, содержащие 600–700 аминокислотных остатков, характерны и для ферментов семейства 42 (таблица 3). Так, 644 аминокислотных остатка содержится в субъединице β-галактозидазы гипертермофильных бактерий *Thermus thermophilus* А4. Только объединение субъединиц массой 75 кДа в гомотример обуславливает каталитическую активность фермента [23].

Выполнены многочисленные работы по выделению и клонированию генов, ответственных за синтез β-галактозидазы у различных бактерий. Наиболее изучен ген β-галактозидазы *E. coli* – *lacZ* [64], который кодирует ферментный белок-тетрамер (540 кДа), состоящий из идентичных субъединиц. У *E. Coli* с делецией *lacZ* обнаружен еще один ген (*ebgA*), кодирующий белок с лактазной активностью [65]. Оба гена обладают высокой степенью гомологии (из 570 сохраненных консервативных остатков 340 являются инвариантными) и иммунологически не связаны между собой.

Система утилизации лактозы, характерная для *E. coli*, обнаружена также у некоторых стрептококков [66, 67], молочнокислых бактерий [68], *Klebsiella pneumoniae* [45].

Гены, кодирующие β-галактозидпермеазу и β-галактозидазу у молочнокислых бактерий *Lactobacillus bulgaricus*, являются частью оперона, устроенного подобного лактозному оперону *E. coli*. [68]. Высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей (75%) обнаружена у β-галактозидаз *L. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* [69]. Гомологичность *lacZ E. coli*, *ebgA E. coli*, *lacZ Klebsiella pneumoniae* составляет 30–34%. У этих ферментных белков, имеющих активные сайты Glu-461 и Tyr-503, существует семь

регионов с высокой степенью гомологии, консервативность которых свидетельствует об их происхождении от общего анцестрального гена.

Сообщается о большой степени сходства *lac*-оперонов *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli* [45]. Обнаруженные у *K. Pneumoniae* гены *lacZ* и *lacY* соответственно на 61% и 67% сходны с соответствующими генами *E. coli*.

Оперонная организация генов, вовлеченных в катаболизм лактозы, была также обнаружена и у *Streptococcus bovis* [66]. Сообщается о клонировании фрагмента ДНК, содержащего гены β -галактозидазы, β -галактозидпермеазы, тиогалактозидтрансацилазы под контролем репрессорного белка. Секвенирующий анализ предполагаемой регуляторной области *lac*-оперона *S. bovis* показал, что его промотор и оператор имеют большую степень сходства с операторной областью лактозного оперона *E. coli*. БАК-связующая (белок, активирующий катаболизм) последовательность, присутствующая в промоторе лактозного оперона *E. coli*, у *S. bovis* не обнаружена. Это объясняет отсутствие катаболитной репрессии в регуляции выражения генов утилизации лактозы стрептококка.

В литературе представлено незначительное количество информации о β -галактозидазах термофильных бактерий. Так, охарактеризованы гены ферментов, продуцируемых *Streptococcus thermophilus* [70], *Bacillus stearothermophilus* (*bgaB*) [71], *Clostridium thermosulfurogenes* EMI [73], термофильными анаэробными бактериями NA10 [19]. Показано, что две из трех β -галактозидаз (II, III), обнаруженных у *Bacillus stearothermophilus*, являются продуктами гена *bgaA*, а β -галактозидаза I кодируется геном *bgaB*. Гибридизация и иммунологическое тестирование показали, что гены не гомологичны [71]. В результате секвенирующего анализа обнаружены существенные различия между аминокислотными последовательностями β -галактозидазы I *B. stearothermophilus* и продуктами генов *lacZ* бактерий *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*, *ebgA E. coli* [65]. Наибольшая степень гомологии у β -галактозидаз, кодируемых *lacZ E. coli* и *bgaB B. stearothermophilus*, наблюдается в районе активного центра соответствующих белков между соответственно 457–463 и 94–100 аминокислотными остатками. Сходные области обнаружены у β -галактозидаз *Bacillus stearothermophilus* и *Arthrobacter* sp. [54].

В составе гена *lacN*, кодирующего β -галактозидазу у штамма NA10 термофильной анаэробной бактерии, обнаружено 2031 п.о., кодирующих полипептид из 676 аминокислот с молекулярной массой 79 кДа [19].

В составе аминокислотной последовательности β -галактозидазы *Clostridium thermosulfurogenes* обнаружено пять больших регионов, гомологичных консервативным участкам ферментов *E. coli* (*lacZ*, *ebgA*), *Klebsiella pneumoniae* (*lacZ*) и *Lactobacillus bulgaricus*, в которых сохранены активные сайты [72]. Структуры *bgaB*-генов, кодирующих β -галактозидазу *Bacillus stearothermophilus* и *C. thermosulfurogenes*, существенно отличаются. На основании того, что структурно термостабильная β -галактозидаза *C. thermosulfurogenes* более близка ферменту *E. coli*, чем ферменту *B. stearothermophilus*, сделан вывод о том, что эти термостабильные ферментные белки не являются представителями отдельного класса β -галактозидаз.

Ген *cbgA*, кодирующий β -галактозидазу *Clostridium acetobutlicum*, клонирован в клетках *E. coli* и секвенирован [73]. В результате обнаружено, что продукт экспрессии гена обладает большей степенью схожести с β -галактозидазой молочнокислых бактерий, чем с LacA β -галактозидазой бактерий *Clostridium thermosulfurogenes*. Консервативные области, свойственные генам β -галактозидаз *E. coli* и молочнокислых бактерий, также сохранены в *cbgA C. acetobutlicum*, за исключением С-терминальной области. В этом гене дополнительно идентифицирован локус *cbgR* (0,4 т.п.н.), необходимый для экспрессии β -галактозидазы. Сходства между продуктом экспрессии *cbgR* и известными β -галактозидазами не обнаружено. Предполагается, что *cbgR* может выполнять либо функцию положительного регуляторного элемента с цис-действием либо функцию элемента, кодирующего дополнительную субъединицу фермента. Не исключено, что *cbgA-cbgR* локусы могут быть частью большой транскрипционной единицы, включающей другие гены, подобно *lacZ*-гену энтеробактерий [73].

Иное строение *lac*-генов (*lacL* и *lacM*), контролирующих ферменты сбраживания лактозы и кодирующие субъединицы размером 72 и 35 кДа, было обнаружено у *Leuconostoc lactis* [49]. Максимальным сходством аминокислотных последовательностей обладают ферменты *L. actis* и *Clostridium acetobutylicum*. Продукт *lacL*-гена *L. Lactis* имеет высокую степень гомологии с N-концом β-галактозидаз *E. coli*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, а продукт *lacM*-гена – с C-концом. Высказывается предположение о том, что *lacL* и *lacM* произошли от общего анцестрального гена в результате внутригенной делеции. У *L. Lactis* не выявлены считываемые последовательности белка, ответственного за транспорт лактозы.

Организация генов утилизации лактозы, подобная *L. lactis*, обнаружена также у *Lactobacillus sake* [50]. У этих микроорганизмов продукты соответствующих генов гомологичны на 59%. Степень гомологии β-галактозидаз *L. Sake* и *Streptococcus thermophilus* составляет 44%, *L. sake* и *Clostridium thermosulfurogenes* – лишь 26%.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей целого ряда β-галактозидаз показал, что наиболее консервативные их участки сосредоточены в N-терминальной области аминокислотной цепи фермента *E. coli* (а.о. 1–771) [74], тогда как C-конец (а.о. 772 – до конца) более вариабелен. Это наводит на мысль о том, что C-терминальная область может составлять отдельный домен. Такое выстраивание двух основных доменов по гомологии находится в соответствии с результатами исследований по ограниченному протеолизу β-галактозидазы *E. coli* [75]. Установлено также, что для всех β-галактозидаз существуют гомологичные участки в N-терминальной части. C-конец, по-видимому, определяет специфические свойства фермента, например, субстратную специфичность.

В результате анализа аминокислотных последовательностей ряда β-галактозидаз обнаружено семь консервативных участков [74]. При анализе мутантных штаммов *E. coli*, не утилизирующих лактозу, было выявлено пять отдельных регионов, необходимых для реализации ферментативной активности. Четыре из этих областей совпадали с ранее упомянутыми участками. Это позволило предположить, что большинство, но не все высококонсервативные участки β-галактозидаз этого семейства обуславливают функциональные свойства ферментных белков (связывание с субстратом или взаимодействие субъединиц).

Определена трехмерная структура β-галактозидазы *E. coli* (LacZ) [44], согласно которой каждый ее мономер состоит из пяти компактных доменов и N-конца (около 50 а.о.). Остатки Glu-461, Met-502, Tug-503, Glu-537, которые важны для каталитической функции фермента, расположены рядом и локализованы вокруг углубления, образуемого в третьем домене. Этот карман идентифицирован как субстрат-связывающий участок.

Примеры β-галактозидаз установленной третичной структуры приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Бактериальные β-галактозидазы установленной структуры

Показатель	β-Галактозидаза:		
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
Семейство гликозил-гидролаз	1	2	42
Четвертичная структура	тетрамер	тетрамер	тример
Число аминокислотных остатков в домене	489	1023	644
Масса мономера, кДа	60	116	73
Доменная структура мономера	1	5	3
Каталитический домен	1	3	1
Ссылка на источник литературы	[18]	[44]	[23]

Таким образом, в классификации гликозил-гидролаз, основанной на сходстве аминокислотных последовательностей [10, 12], большинство изученных бактериальных β-галактозидаз принадлежит семейству 2. Фермент *Sulfolobus solfataricus* отнесен к семейству 1 на основании его отличий от других β-галактозидаз и более высокой (30%) степени гомологии с β-глюкозидазами, например, синтезируемыми *Agrobacterium* sp. и *Caldocellum saccharolyticum* (30%). β-Галактозидазы, принадлежащие семейству 42, сходны

с ферментами семейства 2 только на участке размером 100 а.о. Это, несмотря на некоторое сходство структуры, позволяет рассматривать указанные семейства как обособленные, возможно, составляющие одно суперсемейство.

Список литературы

1. Номенклатура ферментов / Рекомендации Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций; ред.: А.Е. Браунштейн. – М.: ВИНТИ, 1979. – 320 с.
2. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase / P.S. Panesar [et al.] // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 81, № 4. – P. 530–543.
3. Prenosil, J.E. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: part I: State of art / J.E. Prenosil, E. Stucker, J.R. Bourne // *Biotechnol. Bioeng.* – 1987. – Vol. 30, № 9. – P. 1019–1025.
4. Gal-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics / D.P.M. Torres [et al.] // *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.* – 2010. – Vol. 9, № 5. – P. 438–454.
5. Husain, Q. β -Galactosidases and their potential applications: a review / Q. Husain // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 30, № 1. – P. 41–62.
6. Сухих, О.А. Получение препарата грибной β -галактозидазы для коррекции лактозной недостаточности: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. / Сухих О.А. НТЦ «ЛекБиоТех». – М., 2007. – 21 с.
7. Heyman, M.B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents / M.B. Heyman // *Pediatrics.* – 2006. – Vol. 118, № 3. – P. 1279–1286.
8. Hutkins, R.W. Microbiology and technology of fermented foods / R.W. Hutkins. – Iowa: Wiley-Blackwell, 2006. – 488 с.
9. Asraf, S.S. Current trends of β -galactosidase research and application / S.S. Asraf, P. Gunasekaran // *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* / edit. A. Mendez-Vilas. – 2nd edit. – Badajoz: Formatex, 2010. – Vol. 2 – P. 880–890.
10. Carbohydrate-Active enZYmes Database (Cazy) [Electronic resource] – Mode of access: <http://www.cazy.org>. – Date of access: 11.10.2013.
11. Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities / B. Henrissat // *Biochem. J.* – 1991. – Vol. 280. – P. 309–316.
12. Наумов, Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз, биохимия / Д.Г. Наумов // *Биохимия.* – 2011. – Т. 76, № 6. – С. 764–780.
13. Gekas, V. Hydrolysis of lactose: a literature review / V. Gekas, M. Lopez-Leiva // *Process Biochemistry.* – 1985. – Vol. 20. – P. 2–11.
14. Hirata, H. High production of thermostable beta-galactosidase of *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis* / H. Hirata, S. Negoro, H. Okada // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1985. – Vol. 49, № 6. – С. 1547–1549.
15. Способ получения внеклеточной β -галактозидазы: пат.15050 Респ. Беларусь, МПК C2N9/38, C12N1/20, C12R1/06 / Л.И. Сапунова, И.О. Тамкович, А.Г. Лобанок, А.А. Костеневич; заявитель ГНУ «Ин-т микробиологии НАН Беларуси». – № a20091062; 14.07.09; опубл. 28.02.2011 // *Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці.* – 2011. – № 5. – С. 130–131.
16. Захарова, И.Я. Ферменты трансформирующие галактозу / И.Я. Захарова, Т.Т. Буглова, А.С. Тихомирова. – Киев: Наук. думка, 1988. – 224 с.
17. β -galactosidase from a strain of anaerobic thermophile, *Thermoanaerobacter* / D.L. Lind [et al.] // *Enzym. Microb. Technol.* – 1989. – Vol. 11, № 3. – P. 180–186.
18. Thermostable beta-galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties / F.M. Pisani [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – Vol. 187, № 2. – P. 321–328.
19. Nucleotide sequence of the lacN gene encoding thermostable β -galactosidase of a thermophilic anaerobe, strain NA10 / T. Saito [et al.] // *J. Ferment. Bioeng.* – 1992. – Vol. 73, № 1. – P. 51–53.
20. Structure of the β -galactosidase gene from *Thermus* sp. strain T2: expression in *Escherichia coli* and purification in a single step of an active fusion protein / A. Vian [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64, № 6. – P. 2187–2191.
21. Three forms of thermostable lactose-hydrolase from *Thermus* sp. IB-21: cloning, expression, and enzyme characterization / S. K. Kang [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 116, № 4. – P. 337–346.
22. Thermostable beta-galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus* sp. A4: enzyme purification and characterization, and gene cloning and sequencing / N. Ohtsu [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1998. – Vol. 62, № 8. – P. 1539–1545.
23. Trimeric crystal structure of the glycosyl hydrolase family 42 beta-galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose / M. Hidaka [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 322, № 1. – P. 79–91.
24. Wong-Madden, S.T. Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas* / S.T. Wong-Madden, D. Landry // *Glycobiology.* – 1995. – Vol. 5, № 1. – P. 19–28.
25. Torres, M.J. Cloning and expression of β -galactosidase from psychotropic *Bacillus subtilis* KL88 into *Escherichia coli* / M.J. Torres, B.H. Lee // *Biotechnol. Lett.* – 1995. – Vol. 17, № 2. – P. 123–128.

26. Purification and molecular characterization of cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2 / T. Nakagawa [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 72, № 4. – P. 720–725.
27. Characterization of psychrotrophic microorganisms producing beta-galactosidase activities / J. Loveland [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60, № 1. – P. 12–18.
28. Biochemical characterization of β -galactosidase with a low temperature optimum obtained from an Antarctic *Arthrobacter* isolate / J.A. Coker [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185, № 18. – P. 5473–5482.
29. The cloning, purification and characterization of a cold-active β -galactosidase from the psychrotolerant Antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. C2-2 / P. Karasova-Lipova [et al.] // *Enz. Microbiol. Technol.* – 2003. – Vol. 33, № 6. – P. 836–844.
30. Dhaked, R.K. Characterization of β -galactosidase from an Antarctic *Bacillus* sp / R.K. Dhaked, S.I. Alam, L. Singh // *IJBT.* – 2004. – Vol. 4. – P. 227–231.
31. Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis / S. Fernandes [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 58, № 3. – P. 313–321.
32. Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted β -galactosidase from Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b / H. Cieslinski [et al.] // *Prot. Expr. Purif.* – 2005. – Vol. 39, № 1. – P. 27–34.
33. β -Galactosidase production by the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica and lactose hydrolysis / C. Song [et al.] // *Bioproc. Biosyst. Eng.* – 2010. – Vol. 33, № 9. – P. 1025–1031.
34. Purification and characterization of isoforms of β -galactosidase in mung bean seedlings / S-C. Li [et al.] // *Phytochem.* – 2001. – Vol. 57, № 3. – P. 349–359.
35. Berger, J.-L. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-1 / J.-L. Berger, B.H. Lee, C. Lacroix // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1997. – Vol. 25, № 1. – P. 29–41.
36. Browmik, T. β -Galactosidase *Pedicoccus* species: induction, purification and partial characterization / T. Browmik, E.H. Marth // *Appl. Microb. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 33. – P. 317–323.
37. Overexpression and functional analysis of cold-active beta-galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2 / T. Nakagawa [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 2007. – Vol. 54, № 2. – P. 295–299.
38. Molecular characterization of cold-inducible beta-galactosidase from *Arthrobacter* sp. ON14 isolated from Antarctica / K. Xu [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 21, № 3. – P. 236–242.
39. A new beta-galactosidase with a low temperature optimum isolated from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 20B: gene cloning, purification and characterization / A.M. Biaikowska [et al.] // *Arch. Microbiol.* – 2009. – Vol. 191, № 11. – P. 825–835.
40. Cloning and expression of a β -galactosidase gene of *Bacillus circulans* / J. Song [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2011. – Vol. 75, № 6. – P. 1194–1197.
41. Intra- and extracellular beta-galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization / P.L. Moller [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67, № 5. – P. 2276–2283.
42. Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b as a source of cold-adapted β -galactosidase / M. Turkiewicz [et al.] // *Biomol. Eng.* – 2003. – Vol. 20, № 4–6. – P. 317–324.
43. Trantafillidou, D. Barley beta-galactosidase: structure, function, heterogeneity and gene origin / D. Trantafillidou, J.G. Georgatsos // *J. Protein Chem.* – 2001. – Vol. 20, № 7. – P. 551–562.
44. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli* / R.H. Jacobson [et al.] // *Nature.* – 1994. – Vol. 369, № 6483. – P. 761–766.
45. Buvinger, W.E. Nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* lac genes / W.E. Buvinger, M. Riley // *J. Bacteriol.* – 1985. – Vol. 163, № 3. – P. 850–857.
46. Purification and some characteristics of a recombinant dimeric *Rhizobium meliloti* β -galactosidase expressed in *Escherichia coli* / M. Leahy [et al.] // *Enzyme Microbiol. Technol.* – 2001. – Vol. 28, № 7–8. – P. 682–688.
47. Huber, R.E. Quarternary structure, Mg^{2+} interactions, and some kinetic properties of the β -galactosidase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 / R.E. Huber, N.J. Roth, H.J. Bahl // *Protein Chem.* – 1996. – Vol. 15, № 7. – P. 621–629.
48. Vetere, A. Separation and characterization of three β -galactosidase from *Bacillus circulans* / A. Vetere, S. Paoletti // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1380, № 2. – P. 223–231.
49. *Leuconostoc lactis* β -galactosidase is encoded by two overlapping genes / S. David [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174, № 13. – P. 4475–4481.
50. Two genes encoding the beta-galactosidase of *Lactobacillus sakei* / M. Obst [et al.] // *Microbiology.* – 1995. – Vol. 141, № 12. – P. 3059–3066.
51. Divalent metal ion requirements of a thermostable multimetal β -galactosidase from *Saccharopolyspora rectivirgula* / M. Harada [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, № 35. – P. 22021–22026.
52. Unique primary structure of a thermostable multimetal β -galactosidase from *Saccharopolyspora rectivirgula* / M. Inohara-Ochiai [et al.] // *BBA – Protein Struct. Mol. Enzymol.* – 1998. – Vol. 1388, № 1. – P. 77–83.

53. Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus* beta-galactosidase gene cloned in *Escherichia coli* / B.F. Schmidt [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1989. – Vol. 171, № 2. – P. 625–635.
54. Analysis of a novel gene and beta-galactosidase isozyme from a psychrotrophic *Arthrobacter* isolate / K.R. Gutshall [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177, № 8. – P. 1981–1988.
55. Hildebrandt, P. A new cold-adapted beta-D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties / P. Hildebrandt, M. Wanarska, J. Kur // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9, № 151. – P. 1–11.
56. Isolation of a beta-galactosidase-encoding gene from *Bacillus licheniformis*: purification and characterization of the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli* / L. Tran [et al.] // *Curr. Microbiol.* – 1998. – Vol. 37, № 1. – P. 39–43.
57. Characterization of a novel beta-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides / K.M. Van Laere [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, № 4. – P. 1379–1384.
58. Beta-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 prefers beta-(1,4)-galactosides over lactose / S.W. Hinz [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 66, № 3. – P. 276–284.
59. Hung, M.-N. Cloning and expression of beta-galactosidase gene from *Bifidobacterium infantis* into *Escherichia coli* / M.-N. Hung, B.H. Lee // *Biotechnol. Lett.* – 1998. – Vol. 20, № 7. – P. 659–662.
60. Coombs, J.M. Biochemical and phylogenetic analyses of a cold-active beta-galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA / J.M. Coombs, J.E. Brenchley // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65, № 12. – P. 5443–5450.
61. Kosugi, A. Characterization of two noncellulosomal subunits, ArfA and BgaA, from *Clostridium cellulovorans* that cooperate with the cellulosome in plant cell wall degradation / A. Kosugi, K. Murashima, R.H. Doi // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, № 24. – P. 6859–6865.
62. Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei* / M.L. Holmes [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1337, № 2. – P. 276–286.
63. Sheridan, P.P. Characterization of a salt-tolerant family 42 beta-galactosidase from a psychrophilic Antarctic *Planococcus* isolate / P.P. Sheridan, J.E. Brenchley // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, № 6. – P. 2438–2444.
64. Sequence of the lacZ gene of *Escherichia coli* / A. Kalnins [et al.] // *EMBO J.* – 1983. – Vol. 2, № 4. – P. 593–597.
65. Stokes, H.W. Sequence of the ebgA gene of *Escherichia coli*: comparison with the lac Z gene / H.W. Stokes, P.W. Betts, B.G. Hall // *Mol. Biol. Evol.* – 1985. – Vol. 2, № 6. – P. 469–477.
66. Gilbert, H.J. Molecular cloning of *Streptococcus bovis* lactose catabolic genes / H.J. Gilbert, J. Hall // *Microbiology.* – 1987. – Vol. 133, № 8. – P. 2285–2293.
67. Plasmid linkage of the D-tagatose-6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: effect on lactose and galactose metabolism / V.L. Crow [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1983. – Vol. 153, № 1. – P. 76–83.
68. Leon-Morgenthaler, P. Lactose metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: analysis of the primary structure and expression of the genes involved / P. Leon-Morgenthaler, M.C. Zwahlen, H. Hottinger // *J. Bacteriol.* – 1991. – Vol. 173, № 6. – P. 1951–1957.
69. Analysis of the lacZ sequences from two *Streptococcus thermophilus* strain: comparison with the *Escherichia coli* and *Lactobacillus bulgaricus* beta-galactosidase sequences / C.J. Schroeder [et al.] // *J. Gen. Microbiol.* – 1991. – Vol. 137, № 2. – P. 369–380.
70. Herman, R.E. Cloning and expression of the beta-galactosidase gene from *Streptococcus thermophilus* in *Escherichia coli* / R.E. Herman, L.L. McKay // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – Vol. 52, № 1. – P. 45–50.
71. Hirata, H. Molecular basis of isozyme formation of beta-galactosidases in *Bacillus stearothermophilus*: isolation of two beta-galactosidase genes, bgaA and bgaB / H. Hirata, S. Negoro, H. Okada // *J. Bacteriol.* – 1984. – Vol. 160, № 1. – P. 9–14.
72. Burchhardt, G. Cloning and analysis of the beta-galactosidase-encoding gene from *Clostridium thermosulfurogenes* EM1 / G. Burchhardt, H. Bahl // *Gene.* – 1991. – Vol. 106, № 1. – P. 13–19.
73. Expression and nucleotide sequence of the *Clostridium acetobutylicum* beta-galactosidase gene cloned in *Escherichia coli* / K.R. Hancock [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1989. – Vol. 173, № 10. – P. 3084–3095.
74. Sequence of the *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis / O. Poch [et al.] // *Gene.* – 1992. – Vol. 118, № 1. – P. 55–63.
75. The use of limited proteolysis to probe interdomain and active site regions of beta-galactosidase (*Escherichia coli*) / L.A. Edwards [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263, № 4. – P. 1848–1854.