

## СКРИНІНГ ДРІЖДЖІВ–ПРОДУЦЕНТІВ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗ

Внаслідок скринінгу продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази, проведеного серед 331 штаму дріжджів (представників 12 родів та 17 видів), здатність синтезувати фермент виявлено у 45 % з досліджених штамів дріжджів з активністю від 0,01 до 0,6 од./мл. З культуральної рідини двох найбільш активних продуцентів осадженням сульфатом амонію (90% насичення) отримано комплексні ферментні препарати та вивчено такі їх фізико-хімічні властивості як рН- і термооптимум, рН- і термостабільність, а також специфічність до природних і синтетичних субстратів.

К л ю ч о в і с л о в а: скринінг,  $\alpha$ -L-рамнозидаза, дріжджі, *Saccharomyces albidus*.

$\alpha$ -L-Рамнозидаза (КФ 3.2.1.40) — фермент, здатний гідролізувати термінальні нередукуючі залишки L-рамнози як в природних, так і в синтетичних рамнозидах, синтезується деякими тканинами тварин, рослин, а також бактеріями та грибами. Висока специфічність ферменту щодо термінальних залишків  $\alpha$ -L-рамнози дозволяє використовувати його у двох основних напрямках [1]:

1) теоретичному — для встановлення структури, а також для модифікації природних олігосахаридів, гліканів та глікокон'югатів;

2) практичному – а) для гідролізу рамнозильних залишків, наявних у флавоноїдних глікозидах, що поліпшує якість продуктів, які їх містять. Так здатність  $\alpha$ -L-рамнозидази модифікувати нарингін застосовується для усунення гіркоти в деяких соках із цитрусових; гесперитин, який утворюється з гесперидинового глюкозиду, використовується в кондитерській промисловості; б) для вивільнення з терпенових глікозидів – рутинозидів, ароматичних сполук, які сприяють підсиленню аромату виноградних соків, вин та отриманих з них напоїв; в) здатність ферменту діяти на біофлавоноїди, такі, як рутин, кверцетрин та інші, може бути придатна для попередження та лікування геморагічних діатезів, капіляротоксикозів, крововиливів при гіпертонічній хворобі та атеросклерозі, а також при променевій хворобі; г) в косметології та фармацевтичній промисловості – біофлавоноїди, отримані внаслідок дії ферменту корисні в якості активних інгредієнтів косметичних засобів проти старіння, при догляді за шкірою, а також мають виражені антибактеріальні властивості.

В промисловості використовують препарати рамнозидази, отримані з *Penicillium decumbens* та *Aspergillus niger* [1]. Незважаючи на те, що мікробні  $\alpha$ -L-рамнозидази застосовують для покращення аромату вин та для позбавлення гіркоти деяких соків з цитрусових, бракує достатньої інформації щодо активності  $\alpha$ -L-рамнозидази із дріжджів.

Раніше нами було виділено штам *Penicillium commune* 266, здатний продукувати дві високоєфективні  $\alpha$ -L-рамнозидази [2]. Але продуценти мікроміцетів характеризуються рядом недоліків: по-перше, деякі з них є токсичними, по-друге, активність їх змінюється залежно від сезону культивування тощо. Тому метою даного дослідження було проведення пошуку активних продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази серед дріжджів.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були 331 штам дріжджів, одержаних із музею живих культур ІМВ НАН України.

Культури вирощували глибинним способом в пробірках на качалках зі швидкістю обертання 220 об/хв при температурі 28 °С впродовж 3 діб на рідкому поживному середовищі наступного складу (г/л): L-рамноза – 1; пептон – 0,5; дріжджовий автолізат – 0,3; мальтоза – 0,3; вихідне значення рН – 6,0.

Активність  $\alpha$ -L-рамнозидази визначали за методом Davis [3], як субстрат використовуючи нарингін. За одиницю активності ферменту приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за хвилину в умовах досліду.

Для отримання препаратів ферментів дріжджі вирощували глибинним способом на вищезгаданому середовищі в 0,5-літрових колбах Ерленмейера, які містили 100 мл середовища, при 28°C на качалці зі швидкістю обертання 240 об/хв впродовж 3 діб. У культуральну рідину

© О.М. Рзаєва, Л.Д. Варбанець, С.С. Нагорна, 2010

вносили сульфат амонію (90 % насичення) та витримували впродовж 16 год при 4°C. Потім суміш центрифугували при 5000g, 30 хв, в осаді вимірювали активність  $\alpha$ -L-рамнозидази.

Білок визначали за методом Лоурі [4].

При визначенні інших глікозидазних активностей використовували відповідні синтетичні субстрати: *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид (“Sigma”, USA), *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - і  $\beta$ -D-ксилопіранозид (“Koch-Light”, UK), *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозид (“Sigma”, USA), *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-фукопіранозид (“Koch-Light”, UK), *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-маннопіранозид (“Koch-Light”, UK), *n*-нітрофеніл-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінід (“Koch-Light”, UK), *n*-нітрофеніл-2-ацетамідо-2-деокси- $\alpha$ - і  $\beta$ -D-галактопіранозид (“Koch-Light”, UK), метил-2,3,4,6-тетра-N-ацетил- $\alpha$ -D-галактопіранозид (“Chemapol”, Czechoslovakia).

Антоціаназну активність вимірювали за методом [5].

Вплив температури та pH середовища на активність  $\alpha$ -L-рамнозидази визначали в отриманих нами препаратах ферментів. Дослідження здійснювали в інтервалі температур від 4 °C до 80 °C та pH 2,0-8,0 (інтервал pH створювався 0,01 М фосфатно-цитратним буфером - ФЦБ). При визначенні pH- і термостабільності ферментів по завершенні часу дії на ферменти відповідного фактору відбирали аліквоти по 0,1 мл, додавали по 0,2 мл ФЦБ, pH 5,2 та по 0,1 мл субстрату, розчиненого в цьому ж буфері. Активність вимірювали, як описано вище.

**Результати та їх обговорення.** Внаслідок скринінгу продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази серед 331 штаму дріжджів (представників 12 родів, 17 видів) на середовищі, яке містило потенційний індуктор ферменту – L-рамнозу, була виявлена здатність продукувати  $\alpha$ -L-рамнозидазу у 150 штамів, тобто у 45 % з досліджених штамів (активність становила від 0,01 до 0,6 од/мл) (табл. 1). Найбільшу кількість активних штамів виявлено серед представників родів *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*. Найактивніші продуценти відносились до родів: *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* (активність в культуральній рідині становила від 0,14 до 0,6 од/мл). Не виявлено  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності у представників видів *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*.

Таблиця 1

Скринінг продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази

Види мікроорганізмів	Загальна кількість досліджуваних штамів	Кількість активних штамів	Активність (оптична густина, ОГ <sub>310</sub> (од/мл.))
ДРІЖДЖІ			
Всього : 12 родів, 331 штама			
<i>Candida tropicalis</i>	15	2	0,14-0,24
<i>Cryptococcus albidus</i>	45	25	0,01-0,6
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	42	20	0,01-0,13
<i>D. occidentalis</i> var. <i>persoonii</i>	2	1	0,02
<i>D. polymorphus</i>	10	3	0,015-0,07
<i>Hansenula polymorpha</i>	1	0	0
<i>Kluyveromyces lactis</i>	9	6	0,01-0,06
<i>K. marxianus</i>	10	0	0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	15	7	0,01-0,07
<i>Pichia anomala</i>	29	25	0,01-0,23
<i>P. guilliermondii</i>	75	50	0,01-0,25
<i>Rhodotorula glutinis</i>	15	2	0,06-0,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	0	0
<i>S. unisporus</i>	18	2	0,04-0,085
<i>Williopsis californica</i>	11	5	0,01-0,11
<i>Yarrowia lipolytica</i>	10	0	0
<i>Zygosaccharomyces fermentari</i>	4	1	0,025

З метою вивчення фізико-хімічних параметрів та спектрів глікозидазних активностей для подальших досліджень було відібрано штами *Cryptococcus albidus* УКМ Y-1001 та УКМ Y-1003, які проявили найвищий рівень  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності у культуральній рідині (0,5 -0,6 од/мл).

Згідно з літературними даними, незначний рівень  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності знаходили серед представників видів *S. cerevisiae* Tokaj, *H. anomala*, *D. polymorphus*, *C. guilliermondii*, *P. angusta*, *Aureobasidium pullulans* та *C. terreus* [6]. Проте жодних даних щодо утворення ферменту представниками виду *C. albidus* в доступній нам літературі не знайдено.

Відомо, що у виноробстві, окрім смакових якостей вин, важливе значення також надається кольору напоїв. Тому нами було проведено дослідження антоціаназної активності культуральної рідини штамів *C. albidus* 1001 та 1003 з використанням як субстрату червоного вина (дослідження проводили впродовж тижня). Ніяких значних змін в кольорі між контролем та дослідом (вимірювались при довжині 520 нм) не виявлено. Впродовж періоду культивування не спостерігалось збільшення біомаси, активність  $\alpha$ -L-рамнозидази в обох штамів наприкінці досліду зменшилась до 21 та 14 % від початкової, відповідно. Такі ж значення щодо біомаси були отримані і для культуральної рідини штаму *P. commune* 266, проте активність ферменту вже на другу добу культивування зменшилась на 75 %, а на третю добу культивування в культуральній рідині продуценту  $\alpha$ -L-рамнозидазна активність не виявлялась (рис. 1).

Для одержання частково очищених ферментних препаратів проводили фракціонування культуральної рідини *C. albidus* 1001 та 1003 сульфатом амонію (90 % насичення). Дослідження фізико-хімічних властивостей отриманих препаратів показало, що рН оптимум  $\alpha$ -L-рамнозидаз штамів *C. albidus* 1001 та 1003 складає 5,0 (рис. 2), хоча при рН 6,0  $\alpha$ -L-рамнозидаза *C. albidus* 1001 зберігала 95 %, а  $\alpha$ -L-рамнозидаза шт. 1003 при рН 4,0 та 6,0 зберігала 71 % від початкової активності ферменту. Однак при значеннях рН вище 6,5 і до 7,0 та при рН 3,0 активність ферментів обох штамів знижувалась до 30 %.

Препарати  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* 1001 та 1003 були стабільними у діапазоні рН від 3,0 до 7,0 впродовж доби (рис. 3 та 4). Активність ферменту *C. albidus* 1001 через 60 хв інкубування при рН 3,0 зменшувалась до 33 % (рис. 3), та у *C. albidus* 1003 при значенні рН 7,0 до 80 % (рис. 4). Через добу при рН 5,0 активність  $\alpha$ -L-рамнозидази збільшувалась у обох штамів до 118 та 131 % відповідно для штамів *C. albidus* 1001 та 1003.

Температурний оптимум для обох  $\alpha$ -L-рамнозидаз знаходився при 60 °С (рис. 5), а при 30 °С та при 80 °С вони зберігали майже 50 % ферментативної активності від максимальної.

Стабільність ферментних препаратів вимірювали при температурі 25 °С та 60 °С. Активність обох ферментів при 25 °С зростала в 2 рази через 60 хв інкубування, і залишалась майже на тому ж рівні впродовж ще 5 год. Препарат  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 через добу витримування при 25 °С виявив активність в 2 рази більшу від нульової точки, в той час як для препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* 1003 була характерною початкова активність ферменту (рис. 6).

Обидва ферментні препарати були стабільними впродовж 120 хв при температурі 60 °С, хоча у 1003 штаму до 90 хв спостерігалось зростання активності, а на 120 хв вона дещо зменшувалась (на 15 % від максимального значення) (рис. 7). Інший ефект температури спостерігали на препараті штаму *C. albidus* 1001. На 30 та 90 хв інкубування активність ферменту зменшувалась, але на 120 хв зростала на 30 % від початкової.

Вивчення субстратної специфічності ферментних препаратів *C. albidus* 1001 та 1003 показало, що, поряд з  $\alpha$ -L-рамнозидазною (нарингіназною) активністю, вони проявляли незначну  $\beta$ -D-галактозидазну,  $\alpha$ -L-фукозидазну (шт. 1001, 1003), а також  $\alpha$ -D-манозидазну, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаміназну, 2-ацетамідо-2-деокси- $\beta$ -D-галактозидазну (шт. 1003) активності. Ферментні препарати обох штамів характеризувались значним рівнем  $\beta$ -D-глюкозидазної активності (рис. 8). Здатність одночасно синтезувати значну кількість ферментів трансформації природних субстратів і тим самим діяти на субстрат в комплексі притаманна більшості відомих продуцентів [1].

Таким чином, за результатами скринінгу 331 штамів дріжджів встановлено, що *C. albidus* штами 1001 та 1003 виявились найактивнішими продуцентами  $\alpha$ -L-рамнозидази (0,5-0,6 од/мл у культуральній рідині), які є рН- та термостабільними ферментами. Проте не виявлено залежності між здатністю продуцента синтезувати фермент і його належністю до того чи іншого таксону.

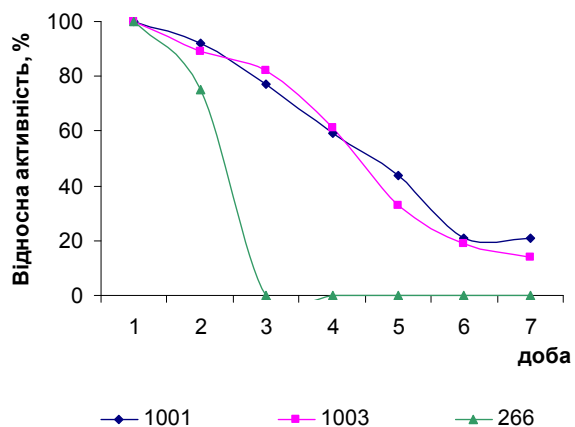


Рис. 1. Зміна активності  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* штамів 1001 та 1003 та *P. commune* 266 при культивуванні у червоному вині

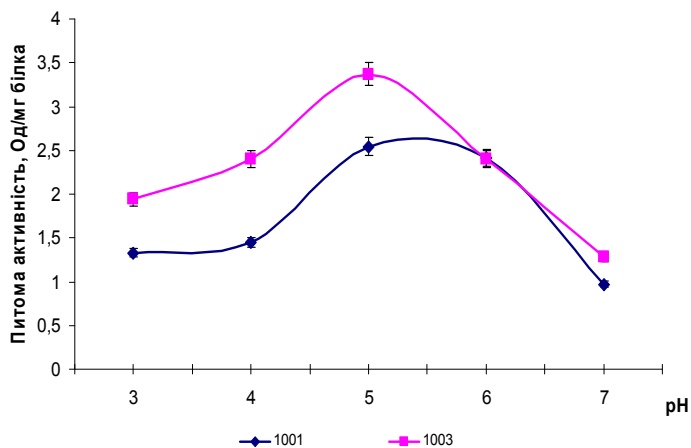


Рис. 2. рН-Оптимум  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* штамів 1001 та 1003

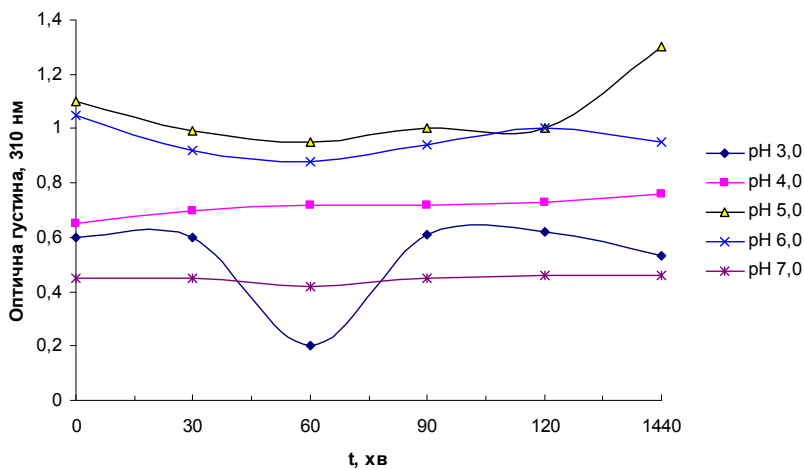


Рис. 3. рН-Стабільність  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* 1001

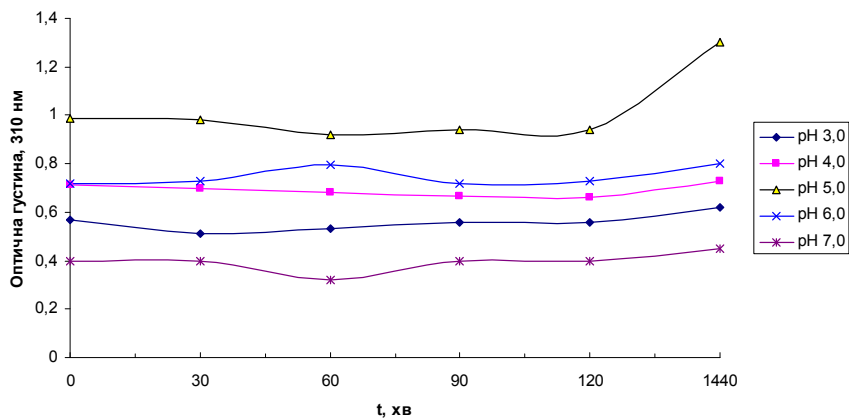


Рис. 4. pH-Стабільність  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* 1003

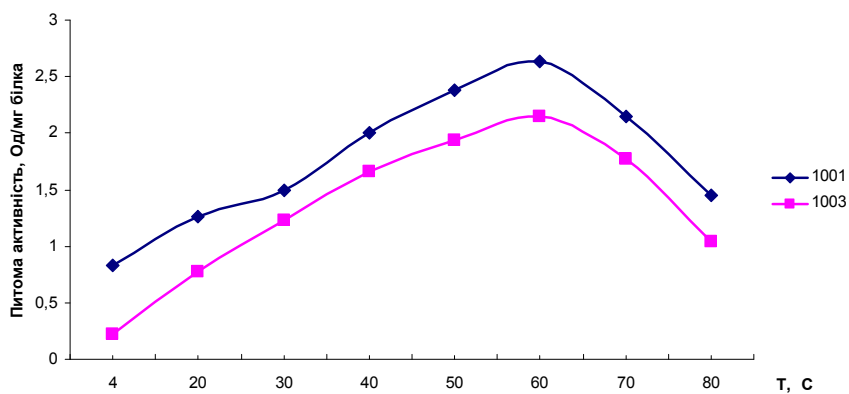


Рис. 5. Температурний оптимум  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* штамів 1001 та 1003

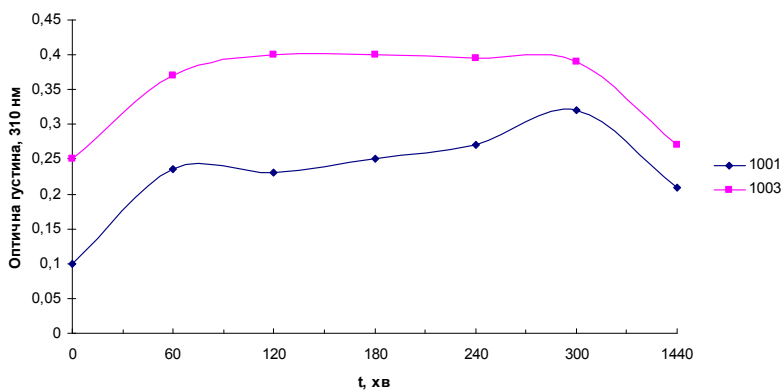


Рис. 6. Термостабільність  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* штамів 1001 та 1003 при 25°C

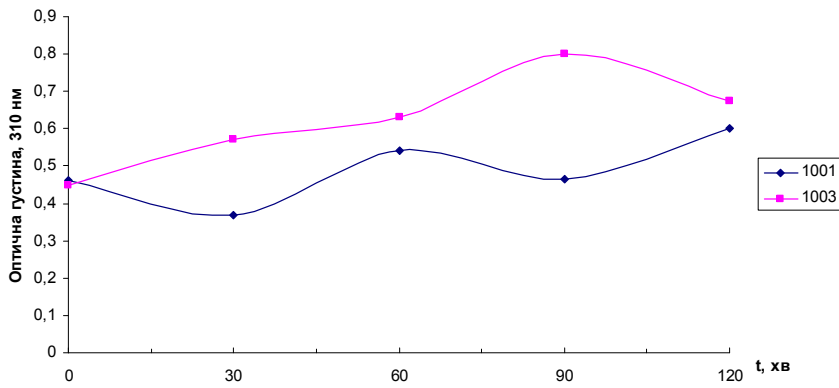


Рис. 7. Термостабільність  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* штамів 1001 та 1003 при 60°C

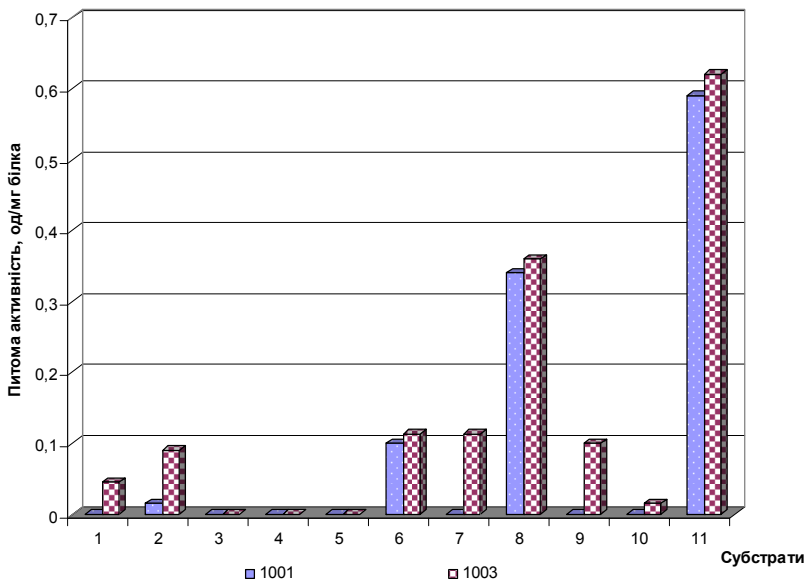


Рис. 8. Субстратна специфічність препаратів  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* 1001 та 1003

- 1 – *n*-НФ- $\alpha$ -D-манозид;
- 2 – *n*-НФ- $\beta$ -D-галактопіранозид;
- 3 – *n*-НФ- $\alpha$ -D-ксилопіранозид;
- 4 – *n*-НФ- $\beta$ -D-ксилопіранозид;
- 5 – *n*-НФ-2-ацетамідо-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопіранозид;
- 6 – *n*-НФ- $\alpha$ -L-фукопіранозид;
- 7 – *n*-НФ-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінід;
- 8 – *n*-НФ- $\beta$ -D-глюкопіранозид;
- 9 – *n*-НФ-2-ацетамідо-2-дезоксид- $\beta$ -D-галактопіранозид;
- 10 – метил-2,3,4,6-тетра-N-ацетил- $\alpha$ -D-галактопіранозид
- 11 – нарингін

**О.Н. Рзаева, Л.Д. Варбанец, С.С. Нагорная**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев*

## **СКРИНИНГ ДРОЖЖЕЙ–ПРОДУЦЕНТОВ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗ**

### **Резюме**

В результате скрининга продуцентов  $\alpha$ -L-рамнозидазы, проведенного среди 331 штамма дрожжей (представителей 12 родов и 17 видов), способность синтезировать фермент выявлена у 45 % исследованных штаммов дрожжей с активностью от 0,01 до 0,6 ед/мл. Из культуральной жидкости двух наиболее активных продуцентов осаждением сульфатом аммония (90 % насыщения) получены комплексные ферментные препараты и изучены такие их физико-химические свойства как pH- и термооптимум, pH- и термостабильность, а также специфичность по отношению к природным и синтетическим субстратам.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** скрининг,  $\alpha$ -L-рамнозидаза, дрожжи, *Cryptococcus albidus*.

**О.М. Rzaeva, L.D. Varbanets, S.S. Nagorna**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **SCREENING OF YEAST–PRODUCERS OF $\alpha$ -L-RHAMNOSIDASE**

### **S u m m a r y**

Screening of producers of  $\alpha$ -L-rhamnosidase among 331 yeast strains (representatives of 12 genera and 17 species) has been performed. A capacity to synthesize the enzyme was revealed in 45 % of the studied strains with activity 0.01-0.6 un/ml. Complex enzymatic preparations of  $\alpha$ -L-rhamnosidase were obtained from cultural liquid of two the most active producers by fractionation with ammonium sulfate (90 % saturation). The influence of pH and temperature on enzymes activities and also specificity towards natural and synthetic substrates were studied.

The paper is presented in Ukrainian.

**К е у w o r d s:** screening,  $\alpha$ -L-rhamnosidase, yeast, *Cryptococcus albidus*.

**The a u t h o r ' s a d d r e s s:** Rzaeva O.M., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Рзаева О.М., Варбанець Л.Д.  $\alpha$ -L-Рамнозидаза мікроорганізмів//Мікробіол. журн. - 2006. – 68, №1. – С. 69-85.
2. Рзаева О.М.  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Penicillium commune* 266 : Автореф. дис. канд. біол. наук. – Київ, 2007. – 21 С.
3. Davis B.J. Assay of Naringinase /Anal. Biochem. – 1985. – **149**, N 2. – P. 566 – 571.
4. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265 . – 275.
5. Rodriguez M.E., Lopes C.A., van Broock M. et al. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities // J. of Appl. Microbiol. – 2004. – **96**. – P. 84 – 95.
6. Yanai T., Sato M. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X 349 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – **64**, N 10. – P. 2179 – 2185.

Отримано 23.09.2009