

**ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ
CRYPTOCOCCUS ALBIDUS – ПРОДУЦЕНТІВ α -L-РАМНОЗИДАЗИ**

Вивчено вплив складу поживного середовища та режиму ферментації на процес синтезу ферменту α -L-рамнозидази штамами *Cryptococcus albidus* 1001 та 1003 за умов глибинного культивування. Підібрано оптимальне джерело вуглецю (L-рамноза) і азоту (NaNO_3) для максимального продукування α -L-рамнозидази. Встановлено, що температура 25 °C, рН 6,0 та вирощування впродовж 6 діб в 50 мл середовища за швидкості обертання 220 об/хв і внесенні 10 % посівного матеріалу є оптимальними параметрами культивування для обох штамів.

Ключові слова: α -L-рамнозидаза, оптимізація умов культивування, дріжджі, *Cryptococcus albidus*.

α -L-Рамнозидаза відноситься до надзвичайно великої групи гідролаз, а саме глікозидаз, які здатні відщеплювати залишки α -L-рамнози від широкого кола природних та синтетичних глікокон'югатів та глікозидів. Ця властивість дозволяє використовувати фермент у двох основних галузях досліджень: теоретичній – для встановлення структури глікопротеїнів та гліколіпідів; та практичній – в сучасних медико-технологічних процесах для вивільнення з терпенових глікозидів ароматичних сполук, які сприяють підсиленню аромату виноградних соків, вин та отриманих із них напоїв, для отримання з біофлавоноїдів активних інгредієнтів із вираженими антибактеріальними властивостями, які можуть бути використані в косметології та фармацевтичній промисловості тощо.

α -L-Рамнозидазу виявляють у різних груп організмів: бактеріофагів, бактерій, грибів, вищих рослин і тварин. Однак найбільш технологічними джерелами одержання ферментів, як відомо [2, 6] є мікроорганізми і гриби, оскільки вони мають велику швидкість розмноження та здатні здійснювати синтез біологічно активних речовин в контрольованих умовах.

У літературі зустрічаються відомості щодо продуцентів α -L-рамнозидази бактеріального та грибного походження. Проте більшості таких продуцентів властивий ряд серйозних недоліків: синтезований ними фермент є економічно і технологічно не вигідним для використання у виробництві. Тим не менш відомо, що застосування таких мікроорганізмів як дріжджі, що не містять токсичних та пірогенних факторів, вигідно відрізняють їх від продуцентів бактеріального та грибного походження.

Раніше [3] внаслідок скринінгу було виявлено два найбільш перспективних продуценти α -L-рамнозидази – *Cryptococcus albidus* 1001 та 1003. У зв'язку з перспективністю застосування даного ферменту в різних галузях промисловості і медицини, з'явилась нагальна потреба у розробці засобів підвищення синтезу α -L-рамнозидази досліджуваними продуцентами, що і було метою даної роботи.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були штами *C. albidus* 1001 та 1003, люб'язно надані нам з колекції культур відділу промислових мікроорганізмів ІМВ НАН України.

Оптимізацію здійснювали з використанням, як базового, середовища наступного складу, г/л: рамноза – 1, пептон – 0,5, дріжджовий автолізат – 0,3, мальтоза – 0,3.

Культури вирощували у глибинних умовах в пробірках та колбах Ерленмейера (500 мл) за температури 30 °C. Як джерело вуглецю використовували різні моносахариди: арабінозу, ксилозу, галактозу, глюкозу, рамнозу; дисахариди: лактозу, мальтозу, сахарозу; сахароспирти: дульцит, інозит, маніт і сорбіт, а також соєве борошно (яке є також і джерелом азоту). Як джерело азоту в середовище додавали пептон.

Як джерела азоту використовували (0,5 г/л) нітрат натрію, нітрит натрію, сечовину, гліцин, пептон, соєве борошно, сульфат амонію.

Умови культивування оптимізували на середовищі, адаптованому за джерелом вуглецю і азоту. Вплив рН на синтез ферменту вивчали, вирощуючи продуцент за вихідних значень рН середовища: 3,0–8,0.

Для встановлення оптимальних умов синтезу ферменту *C. albidus* 1001 та 1003 вирощували у колбах Ерленмейера (500 мл) об'ємом 50, 100, 150, 200 мл живильного середовища за швидкості обертання качалки 160, 220 та 240 об/хв і температури 25, 30 та 37 °С. Посівний матеріал у колби вносили в кількостях 5, 10, 15, 20, 25 % об'єму живильного середовища.

Результати дослідів оцінювали за α -L-рамнозидазною активністю у культуральній рідині, яку вимірювали з використанням у ролі субстрату нарингіну за методом Davis [4]. За одиницю активності ферменту приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за хв в умовах досліді.

Білок визначали за методом Лоурі [5].

Вихід біомаси визначали ваговим методом після висушування її до постійного значення при 105 °С [1].

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента для малих вибірок на 5%-му рівні значущості. Досліди проводили в трьох повторностях.

Результати та їх обговорення. Рівень активності позаклітинного ферменту при періодичному режимі культивування значною мірою залежить від тривалості вирощування продуцента. Проведені дослідження динаміки росту та синтезу ферментів штамами *C. albidus* 1001 та 1003 залежно від доби культивування показали, що максимальну активність α -L-рамнозидази було досягнуто на 6-ту добу культивування (рис. 1).

Одним із шляхів інтенсифікації синтезу ферментів є оптимізація живильного середовища за джерелами вуглецевого та азотного живлення, а також відпрацювання умов культивування продуцента. Відомо, що вибірковість відносно джерел вуглецю та азоту в живильному середовищі є характерною видовою особливістю мікроорганізмів. Тому важливим етапом роботи було дослідження умов культивування продуцентів *C. albidus* 1001 та 1003 для підвищення виходу α -L-рамнозидази.

Більшість мікроорганізмів здатні синтезувати широкий спектр гідролітичних ферментів, які різняться за своїми властивостями та специфічністю дії. Ці глікозидази дозволяють штамам використовувати широке коло субстратів. У зв'язку з цим для знаходження найбільш ефективного джерела вуглецю було досліджено вплив деяких вуглецевмісних сполук (у концентрації 1 %) на синтез α -L-рамнозидази штамами *C. albidus* 1001 та 1003 (рис. 2). Було виявлено, що найкращим джерелом вуглецю є L-рамноза (0,3 та 0,46 од/мг білка для 1001 та 1003 штамів відповідно). Ці результати дозволяють припустити, що синтез α -L-рамнозидази цими штамами носить індукований характер. Незначний вплив таких вуглецевмісних сполук як інозит та сахароза, а також сахарози та сорбіту на синтез ферменту *C. albidus* 1001 і *C. albidus* 1003 відповідно можливо носить неспецифічний характер, і тому потребує подальших досліджень.

Вивчення впливу концентрації L-рамнози на синтез α -L-рамнозидази показало, що найвищий рівень α -L-рамнозидазної активності в культуральній рідині *C. albidus* 1001 та 1003 спостерігали в разі використання як джерела вуглецю L-рамнози при концентрації 2-3 г/л, в результаті чого активність ферменту підвищувалась приблизно у 2 рази порівняно з контролем (1 г/л) (рис. 3).

При використанні арабінози, галактози, глюкози, дульциту, лактози, мальтози, синтез ферменту в обох штамів взагалі був відсутній.

Дані щодо впливу джерел азоту на ріст і α -L-рамнозидазну активність продуцентів *C. albidus* 1001 та 1003 наведено на рис. 4. Для вирощування продуцентів як джерела азоту (концентрація азоту 0,5 г/л) використовували NaNO_3 , NaNO_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, пептон, соєве борошно, гліцин, сечовину. З отриманих даних видно, що при вирощуванні продуцентів на середовищі з соєвим борошном та NaNO_2 синтез ферменту або взагалі не відбувається (*C. albidus* 1001), або був на надзвичайно низькому рівні (*C. albidus* 1003). На середовищі з сечовиною, гліцином та пептоном – рівень ферментативної активності досягає середніх значень порівняно з найбільш ефективними в обох випадках NaNO_3 та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (за рахунок ефективного підбору джерела азотного живлення у *C. albidus* 1001 питома активність зросла в 1,5 разів, у *C. albidus* 1003 – в 1,3 рази).

Проведено дослідження регуляції синтезу α -L-рамнозидази за рахунок зміни значень рН. Так, при вихідних значеннях рН 3,0-4,0 α -L-рамнозидазну активність не було виявлено в обох штамів. Найбільш ефективними початковими значеннями рН середовища були від 5,0 до 8,0, з максимальним виходом ферменту при рН 6,0 (рис. 5).

Дослідження впливу температури в діапазоні від 25 до 37 °С показало, що найбільш оптимальною для синтезу ферменту культурами обох штамів є температура 25 °С (рис. 6).

При оптимальній температурі здійснювали вивчення оптимальної кількості посівного матеріалу. Максимальний рівень активності ферменту досягався при додаванні 10 % інокулюма (рис. 7). Внесення ж більшої або меншої кількості посівного матеріалу не призводило до зростання виходу α -L-рамнозидази в обох штамів.

Вік інокулюму відіграє також важливу роль [1]. Так, трьох- та чотирьохдобовий інокулюм дає набагато кращі результати, ніж застосування одно-, дво- та п'ятидобового інокулюма (рис. 8).

Дослідження оптимальних технологічних параметрів культивування продуцентів: інтенсивності аерації та перемішування середовища показало, що великі об'єми живильного середовища, які знижують розчинення O_2 , спричиняють незначне зменшення активності ферменту в *C. albidus* 1001 та значне зменшення активності в *C. albidus* 1003 (рис. 9). Встановлено, що максимальний рівень α -L-рамнозидазної активності в культуральній рідині обох штамів спостерігався при оптимальному об'ємі 50 мл середовища (сульфітне число 16,76 мг O_2 /л ч) в колбі, за швидкості обертання качалки 220 об/хв, температури 25 °С (рис. 10).

Таким чином, встановлено склад середовища для максимального синтезу α -L-рамнозидази, г/л: рамноза – 2, $NaNO_3$ – 0,5, дріжджовий автолізат – 0,3, мальтоза – 0,3, при культивуванні на якому впродовж 6 діб в 50 мл середовища за швидкості обертання 220 об/хв і внесенні 10 % посівного матеріалу при температурі 25 °С та рН 6,0 синтез ферменту був підвищений у 2,5 рази.

Висловлюємо подяку канд. біол. наук, ст. наук. співроб. С.С. Нагорній за люб'язно надані для досліджень штами *C. albidus* 1001 та 1003.

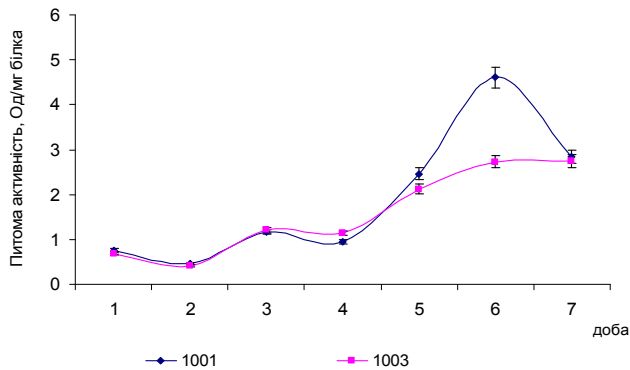


Рис. 1. Динаміка синтезу α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003

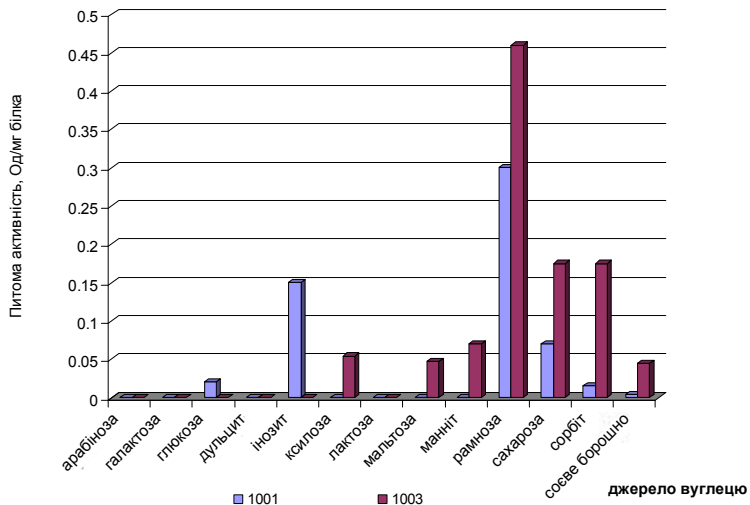


Рис. 2. Вплив деяких джерел вуглецю на біосинтез α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003.

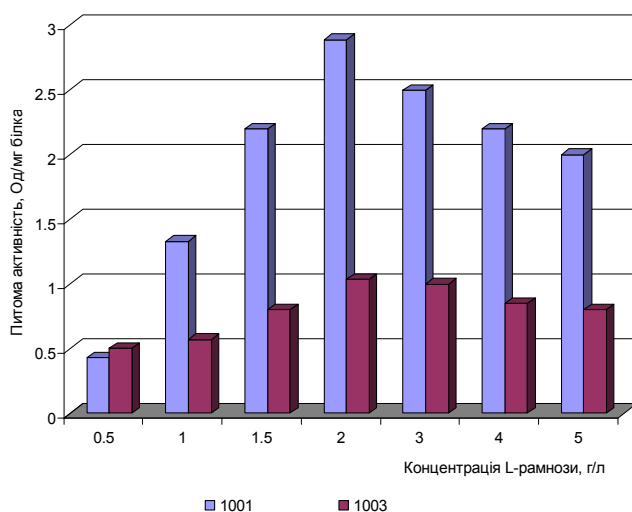


Рис. 3. Вплив концентрації L-рамнози на синтез α -L-рамнозидази штамми *C. albidus* 1001 та 1003

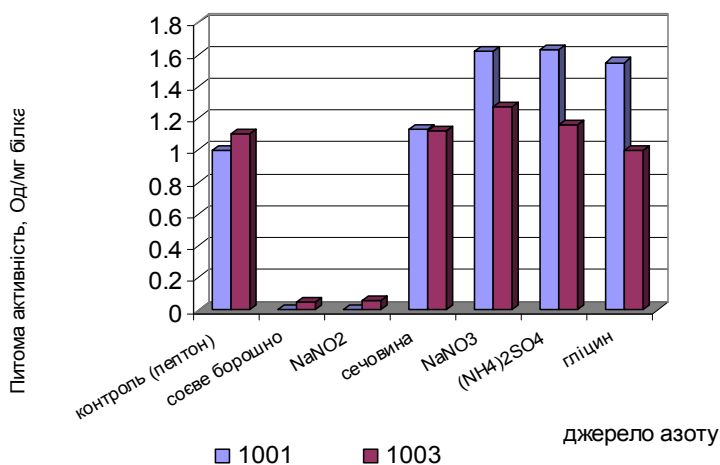


Рис. 4. Вплив деяких джерел азоту на синтез α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003

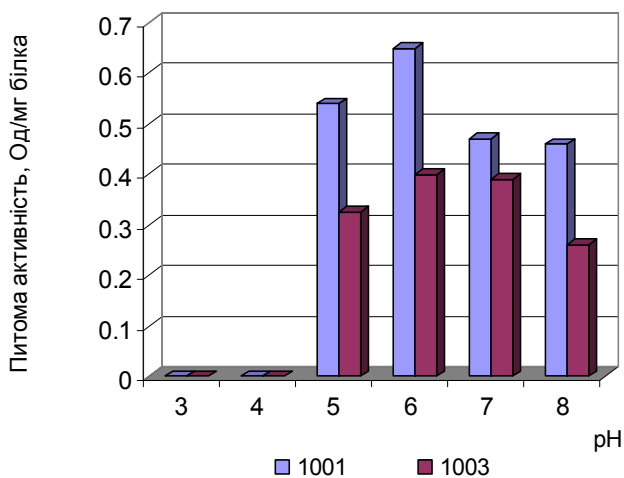


Рис. 5. Вплив початкового значення pH на синтез α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003

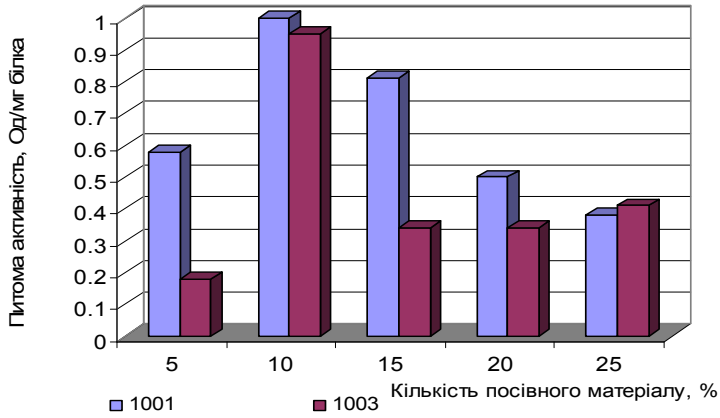


Рис. 6. Вплив температури на синтез α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003

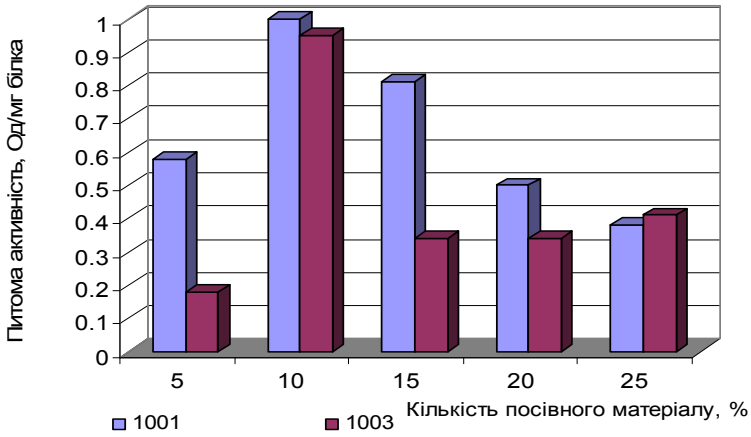


Рис. 7. Вплив кількості посівного матеріалу на біосинтез α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003

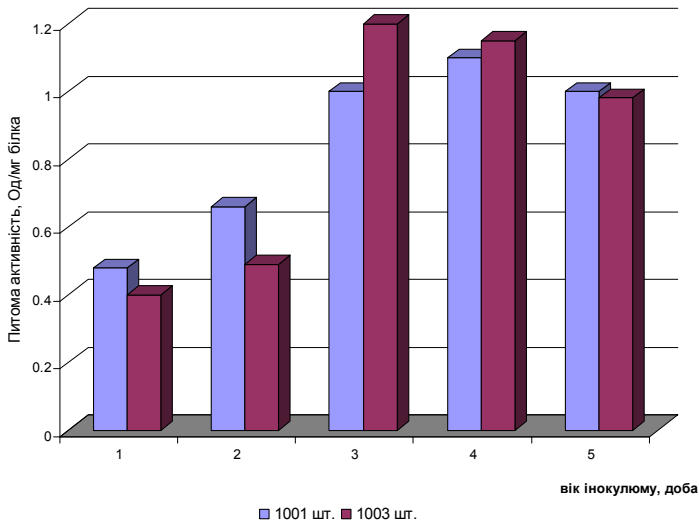


Рис. 8. Вплив віку посівного матеріалу на біосинтез α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003

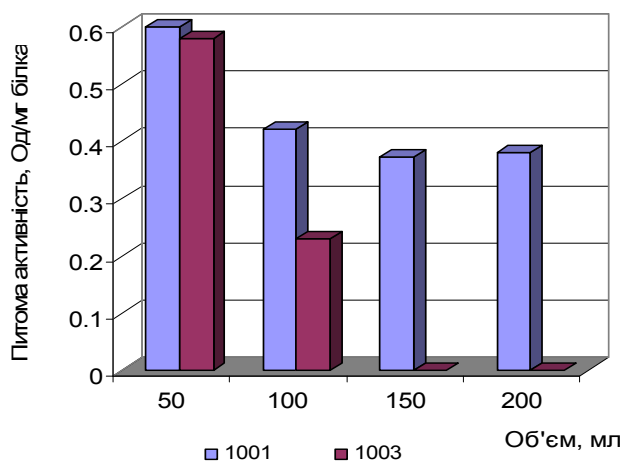


Рис. 9. Вплив рівня аерації на синтез α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003

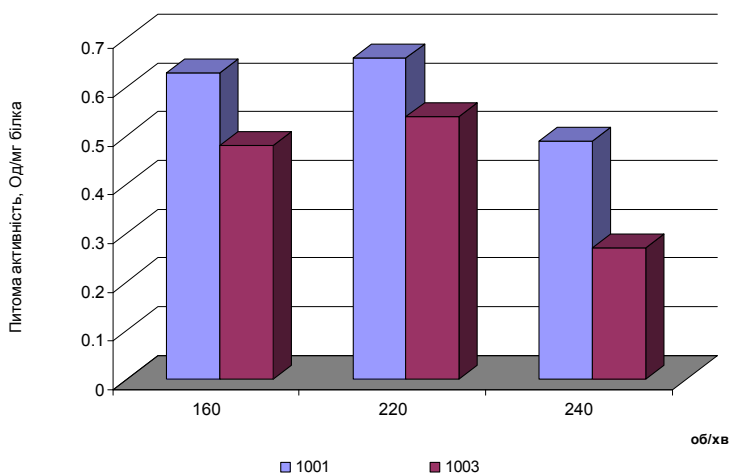


Рис. 10. Вплив інтенсивності перемішування на синтез α -L-рамнозидази *C. albidus* 1001 та 1003.

О.Н. Рзаева, Л.Д. Варбанец, О.В. Гудзенко

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

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* – ПРОДУЦЕНТОВ α -L-РАМНОЗИДАЗИ

Резюме

Изучено влияние состава питательной среды и режима ферментации на процесс синтеза фермента α -L-рамнозидазы штаммами *Cryptococcus albidus* 1001 и 1003 в условиях глубинного культивирования. Подобраны оптимальные источники углерода (L-рамноза) и азота (NaNO_3) для максимального образования α -L-рамнозидазы. Установлено, что температура 25 °С, рН 6,0 и выращивание в течение 6 суток в 50 мл среды при скорости вращения 220 об/мин и внесении 10 % посевного материала являются оптимальными параметрами культивирования для обоих штаммов.

Ключевые слова: α -L-рамнозидаза, оптимизация условий культивирования, дрожжи, *Cryptococcus albidus*.

O.M. Rzaeva, L.D. Varbanets, O.V. Gudzenko

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

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS OF *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* – PRODUCERS OF α -L-RHAMNOSIDASE

S u m m a r y

The influence of content of cultivation media and fermentation conditions on synthesis of α -L-rhamnosidase by *Cryptococcus albidus* 1001 and 1003 were studied. It was shown that L-rhamnose and NaNO₃ are the optimum sources of carbon and nitrogen, respectively. The temperature of 25 °C, pH 6.0, growing in 50 ml of the medium at rotation rate 220 rev/min during 6 days are optimum parameters for both strains.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: α -L-rhamnosidase, optimization parameters of cultivation, yeasts, *Cryptococcus albidus*

T h e 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. Методы экспериментальной микологии // Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1973. – 242 с.
2. *Рзаева О.М.* α -L-рамнозидаза *Penicillium commune* 266 : Автореф. дис... канд. біол. наук. – Київ, 2007. – 21 с.
3. *Рзаева О.М., Варбанець Л.Д., Нагорна С.С.* Скринінг продуцентів α -L-рамнозидази серед дріжджів // Мікробіол. журн. – 2010. – **72**, № 6. - С.11–17.
4. *Davis W.B.* Determination of flavonones in citrus fruits // *Anal. Chem.* – 1947. – **19**, № 7. – P. 476 – 478.
5. *Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, № 1. – P. 265–275.
6. *Yanai T., Sato M.* Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X 349 // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2000. – **64**, №10. – P. 2179–2185.

Отримано 27.02.2010