

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТІВ α-L-РАМНОЗИДАЗ – ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ТАКСОНОМІЧНИХ ГРУП МІКРООРГАНІЗМІВ

Вивчення впливу деяких технологічних параметрів культивування на процес синтезу позаклітинного ферменту α-L-рамнозидази *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Bacillus* sp. показало, що для її максимального продукування оптимальними джерелами вуглецю і азоту (у співвідношенні 1:2) були рамноза (0,2–0,3 %), 0,2 % нітрат натрію (для *C. albidus* і *E. erubescens*) або сульфат амонію (для *Bacillus* sp.), температура вирошування 28 °С, 25 °С і 42 °С відповідно. Для всіх досліджуваних штамів найбільш ефективним було використання середовища з початковим значенням рН від 4 до 8. Встановлено, що максимальний рівень α-L-рамнозидазної активності для *E. erubescens* і *Bacillus* sp. був при значенні сульфатного числа 0,44, тоді як для *C. albidus* 0,56. Максимальна α-L-рамнозидазна активність *C. albidus*, *E. erubescens* і *Bacillus* sp. досягається на 4-ту, 8-му, та 2-гу добу культивування відповідно. При вирошуванні культур *C. albidus*, *E. erubescens* і *Bacillus* sp. в підібраних умовах синтез α-L-рамнозидази підвищується на 30, 50 і 20 % відповідно.

Ключові слова: α-L-рамнозидази, оптимізація умов культивування, *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus* sp., джерела вуглецю та азоту.

На сьогодні однією з важливих проблем сучасної біотехнології є використання ферментів мікробного походження. Це обумовлено тим, що клітини мікроорганізмів можна використовувати в значній кількості на дешевих поживних середовищах, що дає можливість впливати на продукцію біологічно активних речовин шляхом зміни умов вирошування мікроорганізмів. Такі дослідження дозволяють в декілька разів підвищити вихід цільового продукту. Найбільш перспективними для широкого використання виявляються гідролітичні ферменти, зокрема α-L-рамнозидаза (α-L-рамнозид-рамногідролаза – КФ 3.2.1.40), яка характеризується специфічністю щодо термінальних залишків рамнози, що присутні в природних глікокон'югатах та синтетичних глікозидах. α-L-Рамнозидази знаходять використання у харчовій промисловості для підвищення засвоєння флавоноїдів при гідролізі нарингину, гесперидину та інших ароматичних сполук, що покращує якість продуктів, що їх містять. У фармацевтичній промисловості α-L-рамнозидази використовують у процесах ензиматичного гідролізу рамнозидів та для отримання нових глікопептидних антибіотиків; в хімічній промисловості – як попередники для хімічного синтезу [9].

Раніше внаслідок скринінгу серед різних таксономічних груп мікроорганізмів було виділено 3 продуценти α-L-рамнозидази: *Cryptococcus albidus*, *Bacillus* sp. та *Eupenicillium erubescens* з високою активністю (0,4; 0,2 та 0,3 од/мл відповідно) [3, 4].

Метою представлених досліджень була оптимізація умов культивування продуцентів *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus* sp. для підвищення синтезу позаклітинної α-L-рамнозидази.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень були штами *C. albidus* 1001, *E. erubescens* 248, *Bacillus* sp. 149, люб'язно надані нам з Української колекції культур відділу фізіології промислових мікроорганізмів, відділу фізіології і систематики мікробіотів ІМВ НАНУ та Одеського Національного Університету ім. І.І. Мечнікова відповідно.

Оптимізацію середовища росту *Bacillus* sp. і *E. erubescens* здійснювали з використанням як базового – середовища Чапека такого складу, г/л: NaNO₃-2; KH₂PO₄-1; KCl-0,5; MgSO₄·7H₂O; FeSO₄·7H₂O – 0,015; рамноза – 1, рН -5,5. Культивування *C. albidus* здійснювали з використанням, як базового, середовища такого складу, г/л: рамноза – 1, пептон – 5, дріжджовий екстракт – 3, мальтекстракт – 3, рН- 6.

Культури *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus* sp. вирошували у глибинних умовах за температури 28 °С, 25 °С, 42 °С відповідно в колбах Ерленмейера (500 мл). Як джерело вуглецю використовували: глюкозу, галактозу, лактозу, мальтозу, ксилозу, арабінозу, рамнозу, манозу, сахарозу, маніт, кукурудзяне і соєве борошно (концентрацією 10 г/л). У цьому випадку як джерело азоту в середовище додавали нітрат натрію.

Як джерело азоту використовували (концентрацією 2 г/л) нітрат натрію, нітрит натрію, сульфат амонію, суміш сульфату амонію з сечовиною (у співвідношенні 3:2), хлорид амонію, ацетат амонію і карбонат амонію, пептон, сечовину, гліцин.

Вплив рН на синтез ферменту вивчали, вирощуючи культури мікроорганізмів за вихідних значень рН середовища: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0. Для вивчення впливу аерації на синтез ферменту культури *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus* sp. вирощували у колбах Ерленмейера (500 мл) об'ємом 50, 100, 150, 200 мл живильного середовища за швидкості обертання качалки 160 і 220 об/хв і за температури 25, 28 і 42 °С.

Посівний матеріал у колби вносили концентрацією 2, 3, 5, 10 і 15 % від об'єму живильного середовища.

α -L-рамнозидазну активність у культуральній рідині визначали за методом Davis [6] з використанням як субстрат нарингін. Активність ферменту виражали в умовних одиницях (показник оптичної густини). Питому активність виражали в од/мг білку.

Білок визначали за методом Лоурі [8]. Калібрувальну криву будували з використанням як стандарту бичачого сироваткового альбуміну.

Усі експерименти проводили у трьох повторностях. У таблиці наведено середні арифметичні значення величин; відхилення від середнього значення не перевищувало 5%.

Результати та їх обговорення. Рівень активності позаклітинного ферменту при періодичному режимі культивування продуцента значною мірою залежить від тривалості його вирощування. Проведені дослідження динаміки росту та синтезу ферментів штамми *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus* sp., залежно від тривалості культивування показали, що максимальна активність α -L-рамнозидази досягається на 3-ю, 8-му добу та 27-гу год культивування відповідно (рис. 1).

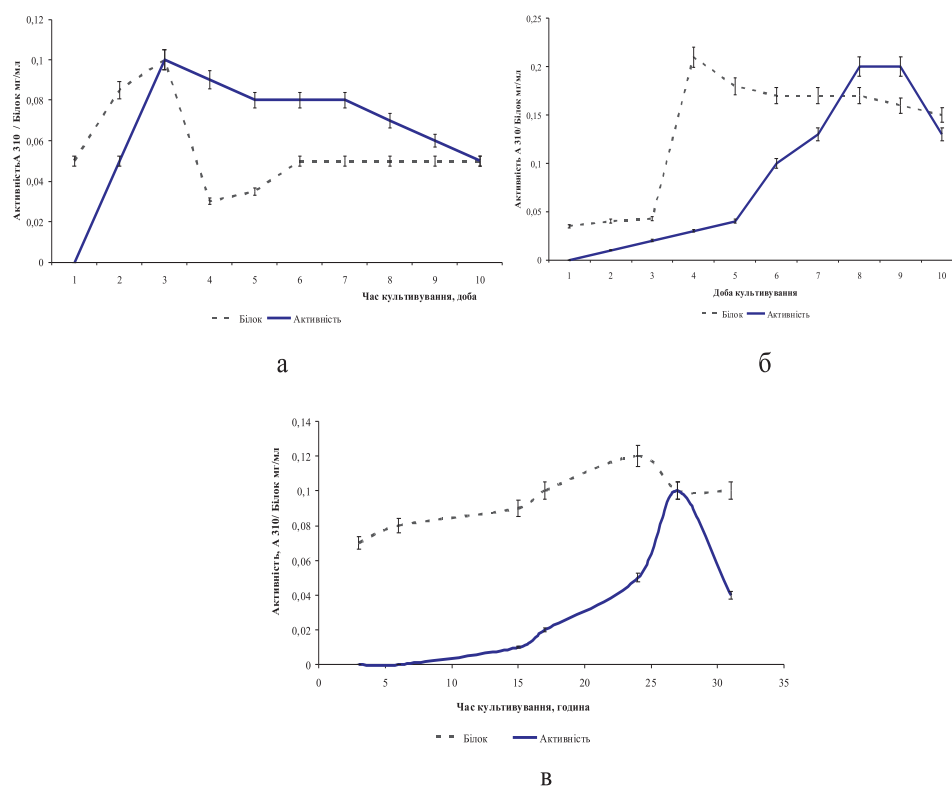


Рис.1. Динаміка росту та синтезу α -L-рамнозидази *C. albidus* (а), *E. erubescens* (б) та *Bacillus* sp. (в)

Результати дослідження впливу вихідного рН середовища на здатність культури до синтезу α -L-рамнозидази свідчать, що для всіх досліджуваних штамів найбільш ефективним було використання середовища з початковим значенням рН від 4 до 8, причому для *C. albidus* і

E. erubescens рН складало 6,0, а для *Bacillus sp.* – 5,0. Відомо [9], що показники рН-оптимумів грибних глікозидаз знаходяться в кислій області (рН 4,0-6,0), а значення бактеріальних – в лужній або близькій до нейтральних (рН 6,5-8,0).

Таким чином, одержані нами значення рН для *C. albidus* і *E. erubescens* близькі до літературних, в той час як для α -L-рамнозидази *Bacillus sp.* оптимальним було кисле значення рН (5,0).

Істотним показником для ферментних препаратів є також їх температура вирощування. Дослідження впливу температури показало, що оптимальною для синтезу ферменту культурами *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus sp.* є 28, 25 і 42°C відповідно.

При оптимальній температурі здійснювали підбір оптимальної кількості посівного матеріалу. Максимальний рівень активності ферменту досягався при додаванні 10 % інокулюма. Внесення ж більшої або меншої кількості посівного матеріалу не призводило до зростання виходу α -L-рамнозидази у всіх штамів (табл. 1).

Таблиця 1

Оптимальні параметри глибинного культивування продуцентів α -L-рамнозидаз

Параметри культивування	Мікроорганізми		
	<i>C. albidus</i> 1001	<i>E. erubescens</i> 248	<i>Bacillus sp.</i>
Вік інокулюму, діб	3-4	3-4	1
Кількість посівного матеріалу, %	10	10	10
рН	6,0	6,0	5,0
Температура, °С	28	25	42
Час, доба	3	8-9	2
Сульфітне число, г O ₂ /(л/год)	0,56	0,44	0,44

Важливу роль в прояві ферментативної активності також відіграє вік інокулюму. Так, засів трьох- та чотирьох добовим інокулюмом дає найкращі результати для *C. albidus* і *E. erubescens*, відповідно, тоді як для *Bacillus sp.* найкращим є однодобовий.

Наступним етапом досліджень було встановлення оптимальних технологічних параметрів культивування продуцента: інтенсивності аерації та перемішування середовища. Так, при вивченні впливу інтенсивності аерації на продукцію α -L-рамнозидази показано, що великі об'єми живильного середовища, які знижують швидкість розчинення кисню, спричиняють незначне зменшення активності α -L-рамнозидази. Встановлено, що максимальний рівень α -L-рамнозидазної активності для *E. erubescens* і *Bacillus sp.* був за значень сульфітного числа 0,44, тоді як для *C. albidus* 0,56. Тобто, для культури *C. albidus* потрібна більш ефективна аерація, щоб досягнути максимального накопичення ферменту.

Більшість мікроорганізмів здатні синтезувати велику кількість ферментів, різноманітних за своїми властивостями та специфічністю дії. Наявність глікозидаз у мікроорганізмів дозволяє їм використовувати широке коло природних субстратів. Одним із шляхів інтенсифікації синтезу ферментів є оптимізація живильного середовища за джерелами вуглецевого та азотного живлення. Вибірковість відносно джерел вуглецю і азоту в живильному середовищі є характерною видовою особливістю мікроорганізмів.

Для вирощування культур *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus sp.*, як джерела азоту (концентрацією 2 г/л) використовували наступні азотовмісні сполуки: нітрат натрію, нітрит натрію, сульфат амонію, хлорид амонію, ацетат амонію, карбонат амонію і суміш сульфату амонію з сечовиною (у співвідношенні 3:2), пептон, сечовину, гліцин. Встановлено (рис. 2), що 0,2 % нітрат натрію є оптимальним джерелом азоту для *C. albidus* і *E. erubescens*, в той час як для *Bacillus sp.* – сульфат амонію.

З літературних джерел відомо [1], що нарингін, рутин і рамноза індують синтез α -L-рамнозидази у *A. terreus*, разом із тим арабіноза, ксиліоза, арабіногалактан, фруктоза, пектин, целюлоза, ксилан та арабани не впливають на синтез ферменту.

Для знаходження найбільш ефективного джерела вуглецю було досліджено вплив деяких вуглецевмісних сполук (у концентрації 1 %) на синтез α -L-рамнозидази *E. erubescens*, *C. albidus*, *Bacillus sp.* (рис. 3). Встановлено, що арабіноза, ксиліоза, маноза, маніт, мальтоза, глюкоза, лактоза, сахароза, галактоза не забезпечували синтез ферменту, а найкращими джерелами вуглецю виявилась рамноза.

За літературними даними [10], субстратами для α -L-рамнозидази можуть бути також α -L-рамнозовмісні дисахариди, що містять α -D-ксилозу, β -D-фукозу, α -D-галактозу і α -N-ацетил-D-глюкозамін в редукованих терміналях: O- α -рамнопіранозил- α -1,3- α -D-ксилоза; O- α -L-рамнопіранозил- α -1,2- β -D-фукоза, O- α -L-рамнопіранозил- α -1,2- α -D-галактоза, O- α -L-рамнопіранозил- α -1,4- α -D-галактоза, O- α -L-рамнопіранозил- α -1,3-N-ацетил-D-глюкозамін, O- α -L-рамнопіранозил- α -1,6-N-ацетил-D-глюкозамін, O- α -L-рамнопіранозил- α -1,4-N-ацетил-D-глюкозамін. Оскільки α -L-рамнозидаза, як і більшість глікозидаз, є індукцибельним ферментом, для збільшення виходу ферменту найчастіше застосовують L-рамнозу.

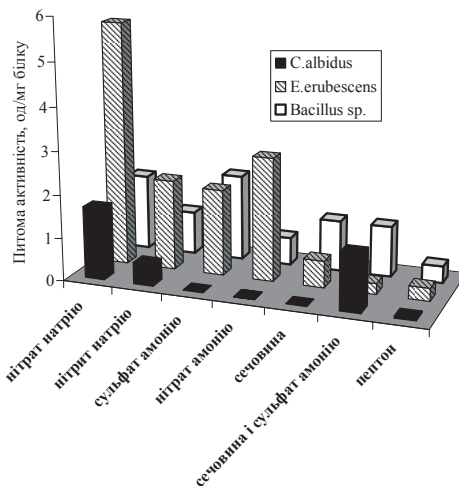


Рис. 2. Вплив різних джерел азоту на α -L-рамнозидазну активність досліджуваних культур

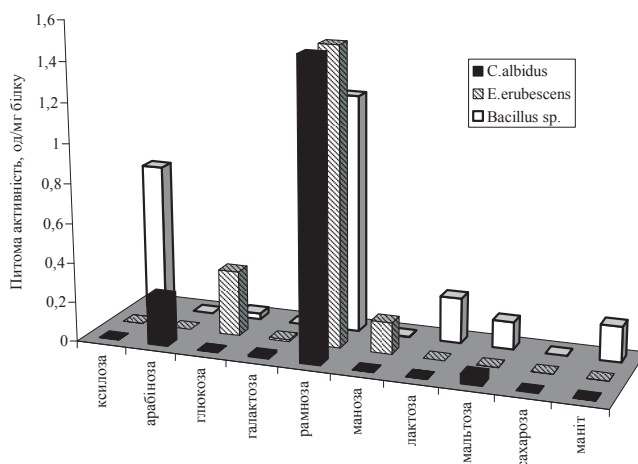


Рис.3. Вплив різних джерел вуглецю на α -L-рамнозидазну активність культур

Дослідження впливу концентрації рамнози (рис. 4) на синтез α -L-рамнозидази свідчать, що найвищий рівень α -L-рамнозидазної активності в культуральних рідинах *C. albidus* і *Bacillus sp.* спостерігали в разі використання L-рамнози в концентрації 2 г/л, в той час як для *E. erubescens* – 3 г/л. Проте використання інших потенційних індукторів на рівень синтезу цього ферменту ще не досить досліджено. В результаті скринінгу, проведеного дослідниками [11], були відібрані штами грибів (*Acremonium persicinum*, *Circinella muscae*, *Emericella nidulans*, *Eurotium amstelodami*, *Mortierella alpina*, *Rhizopus arrhizus*, *Talaromyces flavus*, та *Trichoderma harzianum*), які демонстрували здатність продукувати α -L-рамнозидазу в присутності різних індукторів: рамнози, рутину, гесперидину та нарингіню. Жоден із використаних штамів не був здатний синтезувати α -L-рамнозидазу у відсутності індукторів. Синтез α -L-рамнозидази у деяких грибів не індуквався α -L-рамнозою. Вони могли бути визначені як

потенційні продуценти α -L-рамнозидази тільки при використанні як індукторів гесперидину (для *A. aculeatus* CCF 3134) або рутину (для *F. oxysporum*) [1].

Дослідники раніше [9] відмітили, що додавання 1 % глюкози до середовища призводило до гальмування синтезу α -L-рамнозидази. Виявлений «глюкозний ефект» дає підставу для дослідження ролі глюкози і її метаболітів в регуляції біосинтезу рамнозидаз у досліджуваних культур. На середовищах, в яких підвищується концентрація глюкози, збільшуються процеси первинного метаболізму – зростає накопичення біомаси, незважаючи на те, що розвиток продуценту відбувається при значному зниженні рН. Тому було вивчено вплив глюкози (рис. 5) на синтез α -L-рамнозидази культурами *C. albidus*, *E. erubescens* і *Bacillus* sp.

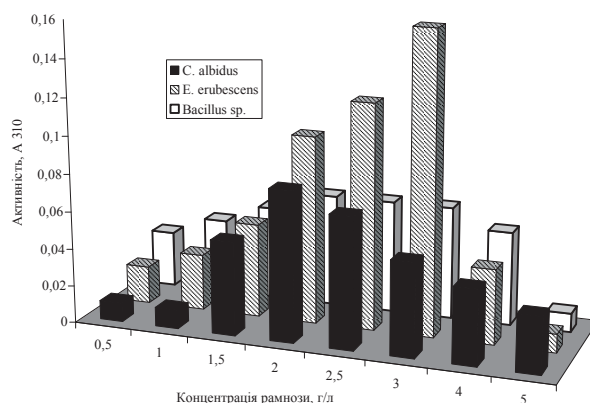


Рис. 4. Вплив різних концентрацій рамнози на α -L-рамнозидазну активність культур

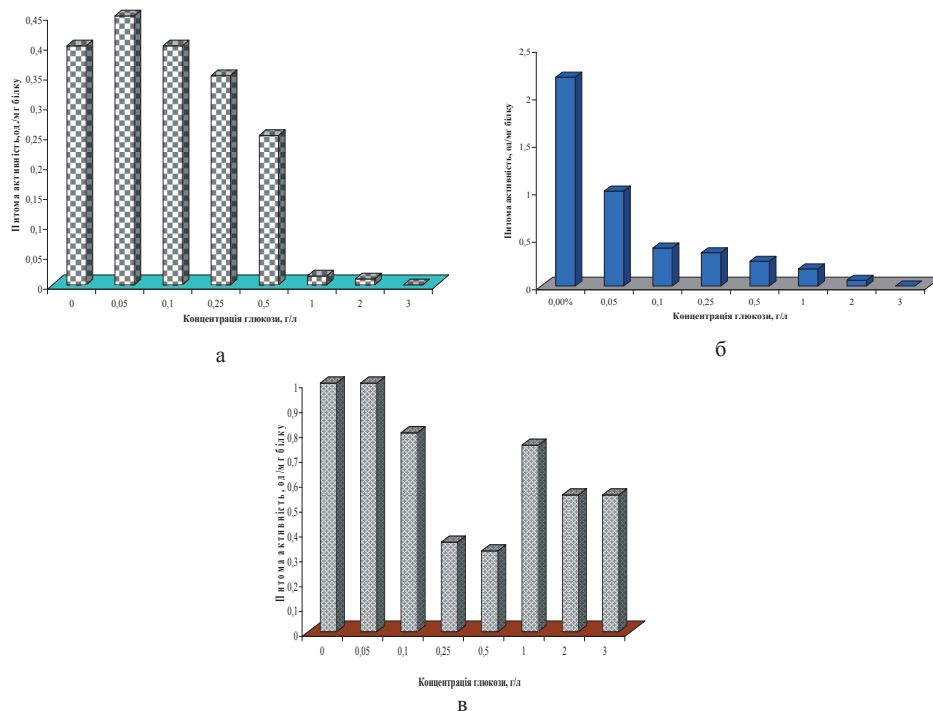


Рис. 5. Вплив глюкози на α -L-рамнозидазну активність *C. albidus* (а), *E. erubescens* (б) *Bacillus* sp. (в)

Вивчення рамнозидазної активності на середовищах з різним вмістом глюкози дозволило виявити відмінності в чутливості регуляторних механізмів різних груп мікроорганізмів до репресуючої дії глюкози. Так, біосинтез α -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* інгібувався

вже при концентрації глюкози в середовищі 3 г/л, в той час як для *Bacillus* sp. не було відмічено такого впливу навіть при більших концентраціях глюкози. Тобто, синтез α -L-рамнозидази *Bacillus* sp. не піддається катаболітній регуляції.

Репресуючий ефект глюкози проявляється при її внесенні в середовище в процесі культивування продуцентів. Чутливість до глюкози не залежить від віку культури. При внесенні глюкози в перші 12 год вирощування, а також при додаванні її в більш пізні строки – α -L-рамнозидазна активність продуцентів знижується.

Здатність інгібувати синтез рамнозидази виявлена нами не лише у глюкози, а і у її метаболітів (ацетату, цитрату, сукцинату натрію, гліцерину), причому за активністю дії вони в різній мірі переважають глюкозу. Ефект інгібування метаболітами залежить від їх концентрації в середовищі, а також від різної чутливості механізмів регуляції синтезу ферментів у продуцентів (рис. 6).

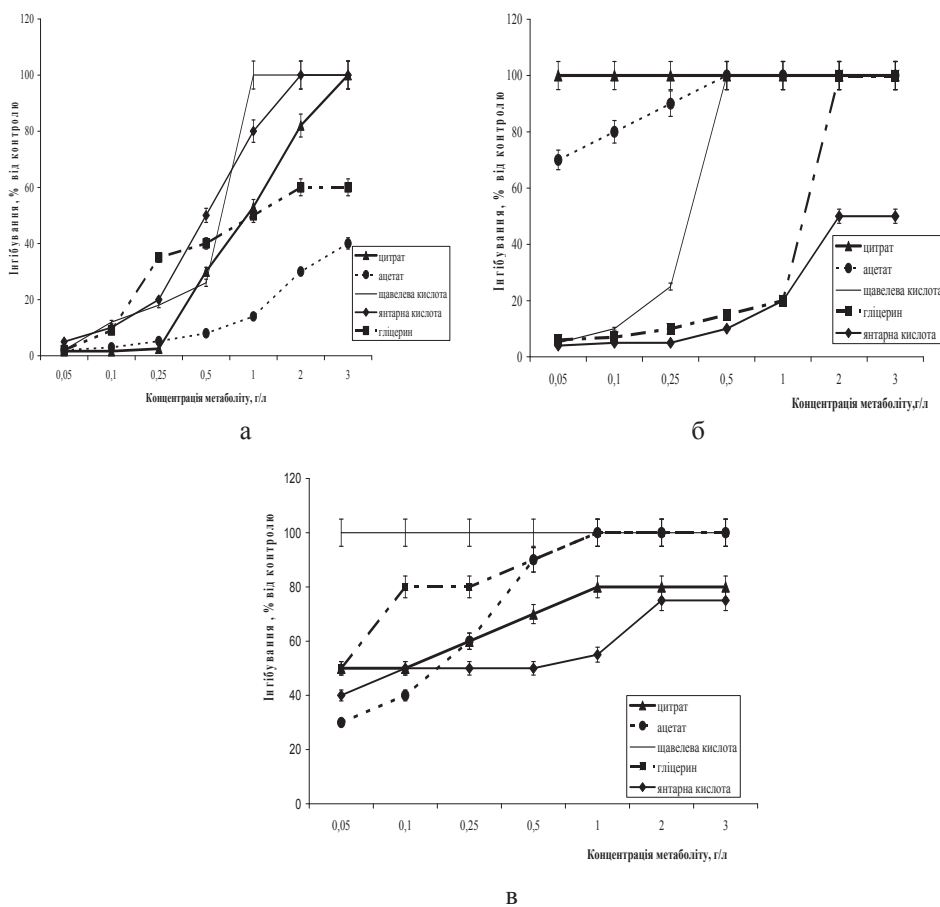


Рис. 6. Вплив метаболітів глюкози на α -L рамнозидазну активність *C. albidus* (а) *Bacillus* sp. (б), *E. erubescens* (в)

Таким чином встановлено, що синтез α -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* регулюється катаболітною репресією, тоді, як у *Bacillus* sp. синтез α -L-рамнозидази контролюється за змішаним типом.

Отже, в ході наших досліджень були встановлені оптимальні умови культивування продуцентів α -L-рамнозидаз *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus* sp., що дозволило підвищити вихід ферменту на 50, 30 і 20 % відповідно.

Висловлюємо подяку співробітникам ІМВ НАН України: канд. біол. наук, ст. наук. співроб. С.С. Нагорній, канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Курченко І.М., д-р біол. наук., проф. Ждановій Н.М., д-р біол. наук, проф. Іваниці В.О. за надані для досліджень штами мікроорганізмів.

Е.В. Гудзенко, Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанец

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

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ α -L-РАМНОЗИДАЗ - ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУП МИКРООРГАНИЗМОВ

Резюме

Изучено влияние некоторых технологических параметров культивирования продуцентов *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Bacillus* sp. на процесс синтеза внеклеточного фермента α -L-рамнозидазы. Определены оптимальные источники углерода (0,2-0,3% рамноза) и азота (0,2%-й нитрат натрия для *C. albidus* и *E. erubescens* и сульфат аммония для *Bacillus* sp.) (в соотношении 1:2), температуры выращивания (28°C, 25°C, 42°C соответственно) для максимального синтеза α -L-рамнозидазы. Для всех исследованных штаммов наиболее эффективным было использование среды с начальным значением pH от 4 до 8. Установлено, что максимальный уровень α -L-рамнозидазной активности для *E. erubescens* и *Bacillus* sp был при значении сульфитного числа 0,44, тогда как для *C. albidus* – 0,56. Максимальная α -L-рамнозидазная активность *C. albidus*, *E. erubescens*, *Bacillus* sp. достигается при 4-х, 8-ми сутках и 27 ч культивирования соответственно. При выращивании культур в подобранных условиях синтез α -L-рамнозидазы повысился на 30, 50 и 20 % соответственно.

Ключевые слова: α -L-рамнозидазы, оптимизация условий культивирования, *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Bacillus* sp., источники углерода и азота.

E.V.Gudzenko, N.V.Borzova, L.D.Varbanets

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

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS OF α -L-RHAMNOSIDASES PRODUCERS – REPRESENTATIVES OF DIFFERENT TAXONOMIC GROUPS OF MICROORGANISMS

S u m m a r y

Influence of some technological parameters of cultivation of producers *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Bacillus* sp. on the process of synthesis of extracellular enzyme α -L-rhamnosidase has been studied. The authors have determined optimal sources of carbon (0.2-0.3 % rhamnose) and nitrogen (0.2 % sodium nitrate for *C.albidus* and *E.erubescens* and ammonium sulphate for *Bacillus* sp.) (the ratio 1:2), cultivation temperature (28 °C, 25 °C, 42 °C, respectively) for maximum synthesis of α -L-rhamnosidase. Use of the medium with initial pH value from 4 to 8 was most efficient for all the studied strains. The maximum level of α -L-rhamnosidase activity of *E.erubescens* and *Bacillus* sp. was established at the value of sulphite number of 0.44, while for *C. albidus* – it was 0.56. Maximum α -L-rhamnosidase activity of *C.albidus*, *E.erubescens*, *Bacillus* sp. is achieved at 4, 8 days and 27 hours of cultivation, respectively. The cultures being grown in selected conditions, the α -L-rhamnosidase synthesis has increased by 30, 50 and 20 %, respectively.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: α -L-rhamnosidase, optimization of cultivation conditions, *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Bacillus* sp., carbon and nitrogen sources.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Gudzenko E.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – К.: Наук. думка, 2010. – С. 7–10.
2. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M. α -L-rhamnosidase : old and new insights // *Industrial Enzymes*. – Springer, 2007. – P. 117–140.
3. Рзаєва О.М., Варбанець Л.Д., Нагорна С.С. Скринінг продуцентів α -L-рамнозидази серед дріжджів // *Мікроб. журн.* – 2010. – **72**, № 6. – С. 11–17.
4. Рзаєва О.М., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д., Соколова О.В., Харкевич О.С., Жданова Н.М., Сафронова Л.А. Скринінг мікроорганізмів продуцентів α -L-рамнозидази // *Мікроб. журн.* – 2005. – **67**, № 5. – С. 19–27.
5. Davis W.B. Determination of flavonones in citrus fruits // *Anal. Chem.* – 1947. – **19**, № 7. – P. 476–478.
6. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.

7. Килочек Т.П. Биосинтез литических ферментов штаммом *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 и некоторые аспекты его регуляции : Автореф. дис. канд. биол. наук. – Киев, 1988. – 16с
8. Рзасва О.М., Варбанець Л.Д., Гудзенко О.В. Оптимізація умов культивування дріжджів *Cryptococcus albidus* продуцентів α -L-рамнозидази // Мікроб. журн. – 2010. – 72, № 1. – С. 11–16.
9. Kurosawa Y., Ikeda K., Egami F. α -L-rhamnosidases of the liver of *Turbo cornutus* and *Aspergillus niger* // J. Biochem. – 1973. – 73. – P.31–37.
10. Manzanares P, van den Broeck H.C., de Graff L.H., Visser J. Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, Rha A and Rha B, from *Aspergillus aculeatus* // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – 67, №5. – P. 2230–2234.
11. Monti D., Pisvejcova A., Kren V., Lama M., Riva S. Generation of an α -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products // Biotechnol. Bioeng. – 2004. – 87, № 6. – P. 765–771.

Отримано 27.09.2010