УДК 577.152.32

Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, ДО 3680, Украина

ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА α-L-РАМНОЗИДАЗЫ *EUPENICILLIUM ERUBESCENS*

Разработана схема выделения и очистки фермента с α-L-рамнозидазной активностью, которая включает фракционирование сульфатом аммония, хроматографию на TSK-гелях Toyopearl HW-60 и Fractogel DEAE-650-s, а также на Sepharose 6B. Фермент очищен в 60 раз с выходом 0,5 %, не содержал других гликозидазных и протеолитической активностей. Молекулярная масса фермента по данным гель-фильтрации на Sepharose 6B составила 35 кДа. α-L-Рамнозидаза стабильна в течение 2 суток при 20 ºС. pH-Оптимум составил 5,0, термооптимум 60 ºС.

Ключевые слова: α *L-рамнозидазная активность, Eupenicillium erubescens, очистка, pH- и термооптимум, pH- и термостабильность.*

α-L-Рамнозидаза (α-L-рамнозид-рамногидролаза – К.Ф. 3.2.1.40) гидролитически отщепляет концевые невостановленные α-1,2, α-1,4 и α-1,6 связанные остатки L-рамнозы в α-L-рамнозидах. Способность синтезировать этот фермент характерна для представителей различных групп организмов: бактериофагов, бактерий, дрожжей, грибов, высших растений и животных [2]. Однако наиболее технологичными источниками получения ферментов, как известно, являются микроорганизмы и грибы, поскольку они способны очень быстро размножаться и осуществлять синтез в условиях, контролируемых человеком.

Наиболее изученными продуцентами α-L-рамнозидаз являются бактерии (*Sphingomonas* sp., *Bacteroides* JY-6, *Pseudomonas paucimobilis*, *Clostridium stercorarium*, *Bacillus sp*. GL 1), а также микромицеты – представители родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Fusarium* [10,11,12].

В настоящее время разработаны технологии применения α-L-рамнозидаз микромицетов в пищевой промышленности: в производстве соков из цитрусовых, использование этих ферментов приводит к эффективному устранению горечи из грейпфрутовых соков благодаря гидролизу нарингина [14], удалению кристаллов гесперидина из апельсиновых соков [16]. α-L-Рамнозидазы применяют в виноделии для усиления аромата вин в результате ферментативного гидролиза терпеновых гликозидов, содержащихся в винограде [15]. Однако, несмотря на значительный промышленный интерес, в настоящее время только ряд неочищенных препаратов α-L-рамнозидаз *Aspergillus* и *Penicillium* (гесперидиназа и нарингиназа соответственно) выпускаются (“Sigma”, USA). Поскольку α-L-рамнозидазы содержат β-D-глюкозидазу, как сопутствующий компонент, их использование ограничено.

Отсутствие отечественных препаратов α-L-рамнозидазы поставило перед нами задачу поиска продуцентов данного фермента. В результате скрининга, проведенного среди музейных культур отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины, нами ранее [7] был отобран перспективный штамм *Eupenicillium erubescens* 248, изучены его трофические особенности, подобрана оптимальная среда и условия культивирования с использованием математических методов планирования эксперимента.

В настоящей статье представлены результаты исследований по разработке условий выделения, очистки, а также изучению некоторых физико-химических свойств препаратов α-L-рамнозидазы *E. erubescens* 248.

Материалы и методы. В качестве субстратов гликозидаз использовали следующие нитрофенильные производные (*n*-НФ) углеводов («Sigma», USA): *n*-НФ-L-рамнопиранозид, *n*-НФ-β-Д-галактопиранозид, *n*-НФ-2-ацетамидо-2-дезокси-β-Д-галактопиранозид моногидрат, *n*-НФ-β-Д-ксилопиранозид, *n*-НФ-β-Д-глюкопиранозид, *n*-НФ-2-ацетамидо-2-дезокси-α-Д-глюкопиранозид, *n*-НФ-N-ацетил-β-Д-глюкозаминид, *n*-НФ-β-Д-глюкоронид, *n*-НФ-α-Д-маннопиранозид, *n*-НФ-α-Д-фукопиранозид, *n*-НФ-α-Д-ксилопиранозид.

© Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец, 2012

Для определения активности фермента к 0,1 мл его раствора добавляли 0,1 М фосфатно-цитратного буфера (ФЦБ) pH 5,2 и 0,1 мл 0,01 М раствора соответствующего субстрата в ФЦБ. Реакционную смесь инкубировали в стандартных условиях опыта: 10 мин при температуре 37°С. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 1 М раствора бикарбоната натрия. В контроль добавляли те же компоненты, но в обратном порядке. Количество *n*-нитрофенола, отщепившегося от субстрата в результате гидролиза, определяли колориметрическим методом по поглощению при 400 нм [1]. За единицу активности α-L-рамнозидазы, а также ряда других исследуемых гликозидаз (Е) принято количество фермента, которое гидролизирует 1 мкмоль нитрофенильного субстрата в минуту в стандартных условиях опыта. Удельная активность: количество единиц активности, рассчитанное на 1 мг белка.

E. erubescens 248 культивировали глубинным способом при температуре 25°С на качалке со скоростью вращения 220 об/мин в течение 5 сут. По окончании ферментации биомассу отделяли фильтрованием. Для выделения ферментного препарата к культуральной жидкости добавляли сухой сульфат аммония до концентрации 30 % насыщения под контролем pH. Смесь выдерживали в течение 10-12 ч при температуре 4 ºС, центрифугировали при 5000 g, 30 мин. Осадок отбрасывали, к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до 90 % насыщения. Смесь выдерживали в течении 6 ч при 4 ºС, центрифугировали при тех же условиях.

Осадок, полученный в результате фракционирования сульфатом аммония, центрифугировали, растворяли в 1,5 объеме 0,01 М фосфатного буфера pH 7,0. Образец (приблизительно 100-200 мг белка) наносили на колонку (2,5 х 90 см) с TSK-Toyopearl HW-60 «Toyo Soda» (Япония), уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером pH 7,0. Элюцию проводили тем же буфером, скорость 90 мл/час. Фракции, в которых выявляли α-L-рамнозидазную активность, собирали, объединяли, концентрировали (9-10 мл, 10-20 мг белка) упариванием под вакуумом и наносили на колонку (3х35 см) с Fractogel DEAE-TSK-650-s «Merck» (Германия), уравновешенную 0,01 М фосфатным буфером pH 6,0. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0-1 М), скорость 24 мл/час. Рехроматографию проводили на колонке (1,3х52 см) с Sepharose 6B, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, pH 6,0. Элюцию проводили тем же буфером с 0,1 М NaCl со скоростью 60 мл/час. На колонку наносили 2 мл образца (2 мг белка).

Определение гликозидазных активностей проводили, как описано ранее [1], общей протеолитической активности – по методу Ансона в модификации Петровой [5].

Содержание белка на всех этапах исследования регистрировали на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 280 нм, его количество определяли методом Lowry et al. [9]. Содержание нуклеиновых кислот определяли методом Спирина [6], нейтральных сахаров – методом Dubois et al. [8].

Молекулярную массу фермента оценивали методом гель-фильтрации на колонке с Sepharose 6B (1,3х52 см) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 6,0. Калибровочную кривую для расчета молекулярной массы строили с помощью низкомолекулярных белков-маркеров («Pharmacia», Швеция): рибонуклеаза (13,7 кДа), протеиназа К (25 кДа), овальбумин куриный (43 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа).

Исследование влияния на фермент температуры и pH среды проводили в интервале температур от 4 до 100ºС и pH 2,0-12,0, последний создавали с использованием 0,01 М универсального фосфатного буфера (УФБ). Термостабильность препарата определяли при температуре 37 ºС (время экспозиции 90 мин), pH-стабильность – при значениях pH реакционной смеси 4,0; 5,0; 6,0 и 7,0 (время экспозиции 24 часа). После истечения строка действия на фермент определенного фактора отбирали аликвоты по 0,1 мл, добавляли 0,2 мл ФЦБ pH 5,2 и по 0,1 мл раствора соответствующего синтетического субстрата, разведенного в том же буфере.

Результаты всех исследований статистически обрабатывали, используя критерий Стьюдента [4].

Результаты и их обсуждение. Важным и актуальным вопросом инженерной энзимологии и биохимии грибных гликозидаз есть разработка эффективных методов очистки ферментов, поскольку получение препарата фермента в гомогенном состоянии является главным условием для дальнейшего использования фермента в пищевой и фармацевтической промышленности.

Известно [12], что в культуральной жидкости микромицетов присутствуют гликозидазы широкого спектра действия. Это связано с тем, что природной средой обитания микромицетов являются растительные отходы, которые содержат большое количество олиго- и полисахаридов, а также сложных углеводсодержащих соединений. Это свойство грибных культур, к сожалению, значительно затрудняет получение α-L-рамнозидаз в гомогенном состоянии. В культуральной жидкости *E. erubescens* 248, кроме α-L-рамнозидазы, выявлено и другие гликозидазные активности: β-Д-галактозидазы, β-Д-глюкозидазы и β-Д-глюкозаминидазы (табл.1).

Таблица 1

Спектр гликозидазных активностей на разных стадиях очистки ферментного препарата *E. erubescens 248*

Субстрат	Активность, Е/мг белка			
	I	II	III	IV
п-НФ- L-рамнопиранозид	2	18	27	30
п-НФ-β-Д-галактопиранозид	0	0	0	0
п-НФ-2-ацетамидо-2-дезокси-β-Д-галактопиранозид моногидрат	0,2	1,7	0,13	0
п-НФ-β-Д-ксилопиранозид	0	0	0	0
п-НФ-β-Д-глюкопиранозид	0,24	2,2	0,5	0
п-НФ-2-ацетамидо-2-дезокси-α-Д-глюкопиранозид	0	0	0	0
п-НФ-N-ацетил-β-Д-глюкозаминид	0,3	3	0,3	0
п-НФ-β-Д-глюкоронид	0	0	0	0
п-НФ-α-Д-манопиранозид	0	0	0	0
п-НФ-α-Д-фукопиранозид	0	0	0	0
п-НФ-α-Д-ксилопиранозид	0	0	0	0

Примечания: I – культуральная жидкость; II - 90% высол; III – препарат после очистки гель-фильтрацией на TSK-HW-60; IV - препарат после очистки ионообменной хроматографии на Fractogel DEAE-TSK-650-s.

Для выделения и очистки ферментного препарата α-L-рамнозидазы из культуральной жидкости *E. erubescens 248* использовали фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию и рехроматографию на сефарозе 6В.

В результате гель-фильтрации на TSK-HW-60 была получена фракция II (рис. 1, табл. 1, 2), в которой, кроме α-L-рамнозидазы, присутствовали и другие гликозидазы: β-Д-галактозидаза, β-Д-глюкозидаза и β-Д-глюкозаминидаза.

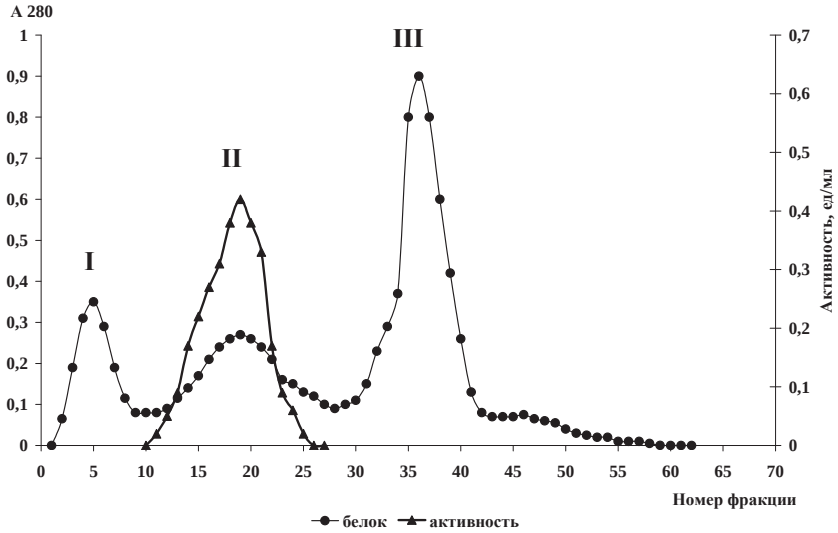

Рис. 1. Профиль элюции на TSK-HW-60 ферментного препарата *E. erubescens 248*

Таблица 2

Очистка препарата α- L-рамнозидазы *E. erubescens* 248

Стадии очистки	Общее содержание белка, мг	Общая активность, ед/мл	Выход, %	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Содержание нуклеиновых кислот, мг	Содержание углеводов, мг
Культуральная жидкость	10,5	22,5	100	2	0	0,36	120
Фракционирование сульфатом аммония	9,2	172	87,6	18	9	0,19	80
Гель-фильтрация на Toyopearl HW-60	5,72	156	54	27	13,5	0	16
Анионообменная хроматография на Fractogel DEAE-650-s	0,3	9,1	2,8	30	15	0	2
Рехроматография на Sepharose 6B	0,05	6	0,5	120	60	0	0,1

В результате ионообменной хроматографии на Fractogel DEAE-TSK-650-s с использованием (0-1 М) градиента NaCl (0-1 М) был получен ферментный препарат, в котором выявлена активность только α-L-рамнозидазы (рис. 2, табл. 1, 2). Рехроматографией на сефарозе 6В, ферментный препарат был очищен от остаточных количеств белка (рис. 3), не проявляющих активностей α-L-рамнозидазы.

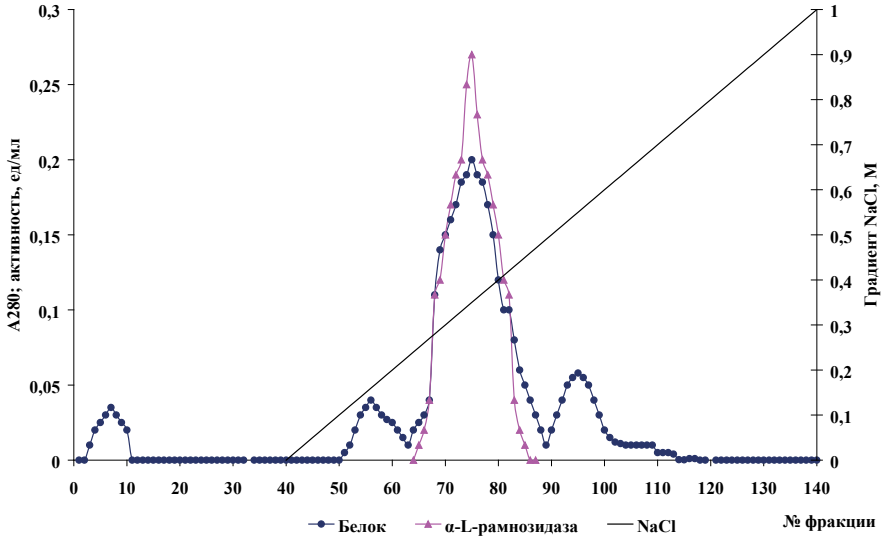

Рис. 2. Профиль элюции на Fractogel DEAE-650-s в градиенте NaCl (0-1 М) ферментного препарата *E. erubescens* 248

Таким образом, в результате проведенных исследований из культуральной жидкости *E. erubescens 248* выделено и очищено препарат, который проявлял активность α-L-рамнозидазы, был свободен от нуклеиновых кислот и содержал приблизительно 0,1 % углеводов. В препарате не выявлено активности других гликозидаз, а также отсутствовала протеолитическая активность.

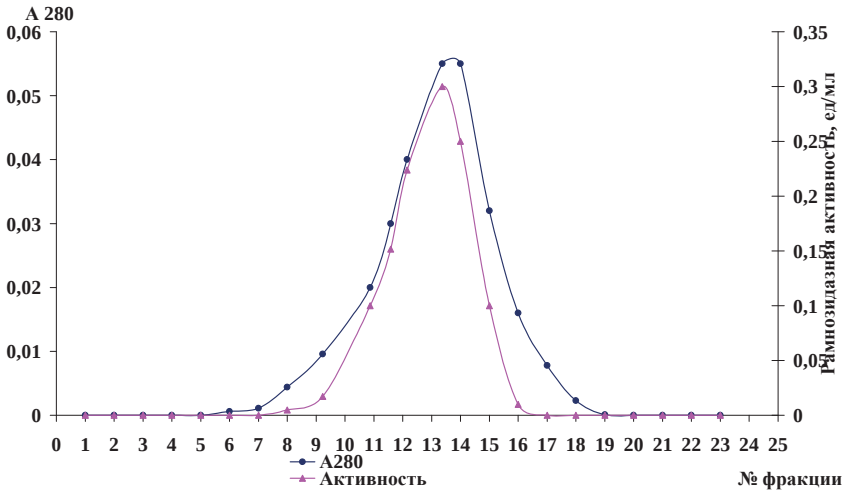

Рис. 3. Профиль элюции на сефарозе 6В ферментного препарата *E. erubescens 248*

Молекулярная масса ферментного препарата, определенная с помощью гель-фильтрации на сефарозе 6В, составила 35 кДа (рис. 4). Согласно данным литературы [12] диапазон молекулярных масс α-L-рамнозидаз различного происхождения очень широкий и разнообразный. Так, молекулярная масса фермента из грибных продуцентов составляла от 70 до 96 кДа, из бактериальных – от 95 до 240 кДа.

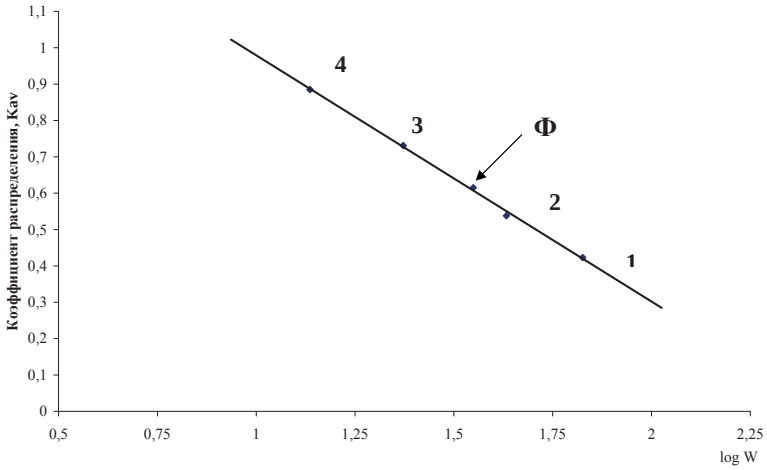

Рис. 4. Определение молекулярной массы ферментного препарата *E. erubescens 248* (Ф). Маркеры молекулярных масс: 1 – рибонуклеаза (13,7 кДа), 2 – протеиназа К (25 кДа), 3 – овальбумин куриный (43 кДа), 4 – бычий сывороточный альбумин (67 кДа)

pH-Оптимум α-L-рамнозидазы *E. erubescens 248* составлял 5,0, а в диапазоне значений pH от 4,0 до 6,0 сохранялось до 70-80 % от максимальной активности (рис. 5). Ферментный препарат характеризовался высокой стабильностью в данном диапазоне значений pH. В течение 6 мес. при pH 5,0 (4 ºС) не только сохранялась исходная активность препарата фермента *E. erubescens 248,* но и наблюдалось увеличение активности α-L-рамнозидазы на 10 % (препарат сохранялся в 3 М растворе сульфата аммония).

По литературным данным [13,14,15,16], показатели pH-оптимумов и pH-стабильностей грибных гликозидаз находятся в интервале значений pH 4,0-6,0. Так, α-L-рамнозидаза *A. niger* стабильна в интервале pH 3,0-5,0 на протяжении 8 ч при 30 °С [13]. Фермент *A. terreus* сохранял более 95 % активности при pH 4,0-6,5. При pH > 6,5 активность фермента прогрессивно снижалась, а при pH 8,5 составляла только 10 % от максимальной [14]. α-L-Рамнозидаза *A. aculeatus* стабильна при pH 3,0-5,0, а *A. nidulans* – при pH 4,5 на протяжении 24 ч [15]. Фермент, выделенный из *P. paucimobilis*, был стабилен при pH 5,5-9,0 [16].

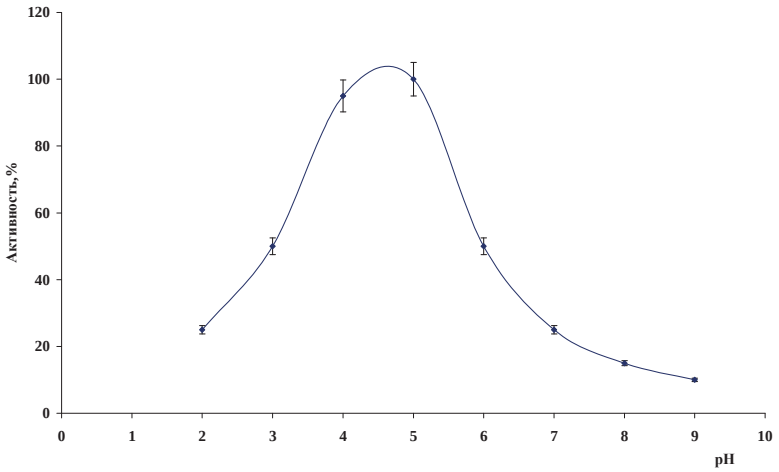

Рис. 5. pH-Оптимум действия α-L-рамнозидазы *E. erubescens* 248 (в процентах от максимальной активности)

Важным показателем для ферментных препаратов есть их термостабильность. α-L-Рамнозидазы различного происхождения отличаются термостабильностью. Грибные и бактериальные α-L-рамнозидазы сохраняют активность на протяжении 4-6 ч при условии хранения их в температурном режиме 20-40 °С [3]. Фермент, выделенный из *A. terreus*, был стабилен после 24 ч инкубации при 20 °С. Известно также, что после замораживания до -20°С α-L-рамнозидаза *P. paucimobilis* оставалась стабильной на протяжении нескольких месяцев при оптимальных значениях pH [2,10,11].

Как правило, скорость реакции, которую катализируют ферменты, увеличивается до оптимального значения при увеличении температуры до точки, в которой фермент инактивируется. Было определено, что термооптимум α-L-рамнозидазной активности *E. erubescens 248* находится при 60 ºС (рис. 6). Известно [13], что температурный оптимум действия большинства грибных α-L-рамнозидаз составляет 60-65 °С, для очищенной α-L-рамнозидазы *A. nidulans* при pH 5,0 – 60 °С; при снижение температуры до 30 °С ее активность составляла 30 %, а до 20-25 °С – только 15 % исходной максимальной активности.

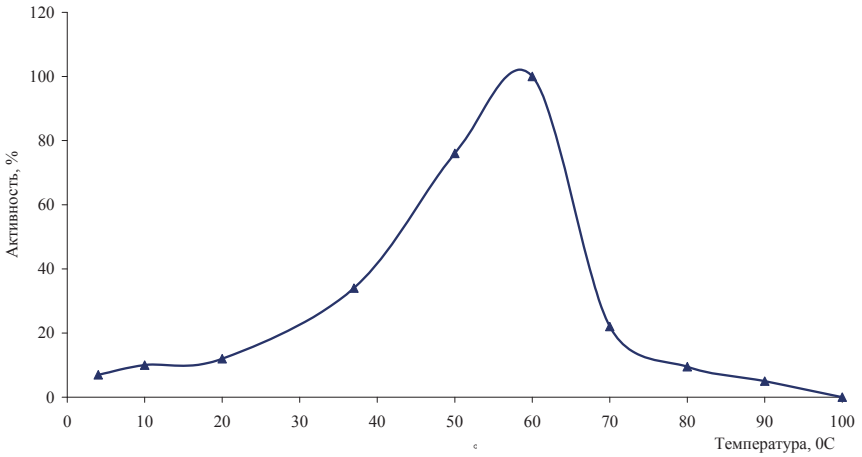

Рис. 6. Термооптимум действия α-L-рамнозидазы *E. erubescens 248* (в процентах от максимальной активности)

Нами показана высокая термостабильность исследованного фермента *E. erubescens 248*. Так, наблюдалось полное сохранение активности препарата при 20 ºС в течение двух суток, а при 37 ºС течение 90 мин. Подтверждена высокая стабильность препарата при сохранении

его в насыщенном растворе сульфата аммония (3М) при 4 ºС в течение 1,5 лет и лиофильно высушенного препарата – в течение 3 мес. Замораживание препарата не снижало его активности.

α-L-Рамнозидазы различного происхождения отличаются термостабильностью. Грибные и бактериальные α-L-рамнозидазы сохраняют активность на протяжении 4-6 ч при условии хранения их в температурном режиме 20-40 °С [3]. Фермент, выделенный из *A. terreus*, был стабилен после 24 ч инкубации при 20 °С. Известно также, что после замораживания до -20°С α-L-рамнозидаза *P. paucimobilis* оставалась стабильной на протяжении нескольких месяцев при оптимальных значениях pH [2,10,11].

Таким образом, из культуральной жидкости *E. erubescens 248* выделен и очищен препарат α-L-рамнозидазы с удельной активностью 120 Е/мг белка (табл. 2), что значительно превышает удельную активность препаратов α-L-рамнозидазы соответствующей степени очистки, выпускаемых зарубежными фирмами. Так, активность коммерческих препаратов («Sigma-Aldrich») нарингиназы из *Penicillium decumbens и Penicillium sp*. составляет не более 10 ед/мг белка, а гесперидиназы из *A. niger* – 0,5 ед/мг белка. Кроме того, указанные препараты в своем составе, кроме α-L-рамнозидазы, содержат и β-Д-глюкозидазу.

Штамм-продуцент любезно предоставлен нам из коллекции микроорганизмов отдела физиологии и систематики микромицетов зав. отделом, канд. биол. наук И.Н. Курченко, за что выражаем ей искреннюю благодарность.

О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ОЧИСТКА ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *α-L-РАМНОЗИДАЗИ EUPENICILLIUM ERUBESCENS*

Резюме

Розроблена схема виділення та очистки ферменту з α-L-рамнозидазною активністю, що включала фракціонування сульфатом амонію, хроматографію на TSK-гелях Toyopearl HW-60 і Fractogel DEAE-650-s та Sepharose 6B. Фермент був очищений у 60 разів із виходом 0,5 %, не містив глікозидазних і протеолітичної активності. Молекулярна маса ферменту за даними гель-фільтрації на Sepharose 6B склала 35 кДа. α-L-рамнозидаза стабільна протягом 2 діб при 20ºС. pH-оптимум склав 5,0, термооптимум при 60ºС .

Ключові слова: α L-рамнозидазна активність, *Eupenicillium erubescens,* очистка, pH- і термооптимум, pH- і термостабільність.

O.V. Gudzenko, L.D. Varbanets

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

PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF *EUPENICILLIUM ERUBESCENS α*-L- RHAMNOSIDASE

Summary

A scheme of isolation and purification of the enzyme with α-L-rhamnosidase activity has been developed. It included fractionation by ammonium sulfate and chromatography on TSK-gels Toyopearl HW-60, Fractogel TSK DEAE-650-s and Sepharose 6B. The enzyme was purified 60 times with the yield of 0.5 %. The enzyme preparation did not contain any glycosidase and proteolytic activity. Molecular mass of the α-L-rhamnosidase enzyme on the data of Sepharose 6B gel-filtration was 35 kDa. The enzyme preparation was stable during 48 hours at 20 °C, its pH- and thermal optimum were 5 and 60°C, correspondingly.

The paper is presented in Russian.

Key words: α-L-rhamnosidase activity, Eupenicillium erubescens, purification, pH- and thermal optimum, pH- and thermal stability.

The author's address: *Varbanets L.D.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680,Ukraine.

1. *Борзова Н.В., Маланчук В.Н.* Скрининг продуцентов α-N-ацетилгалактозаминидазы среди микроорганизмов различных таксономических групп // Микробиол. журн. – 2000. – **62**, №5. – С. 34–41.
2. *Варбанець Л.Д., Борзова Н.В.* Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010. – 437 с.
3. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. – М.: Мир, 1982. – 816 с.
4. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
5. *Петрова И.С., Винцюнайте М.Н.* Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. Биохимия и микробиология. – 1966. – **2**, №1. – С. 322–327.
6. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
7. *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 // Мікробіол. журн. – 2005. – **67**, №5. – С. 19–27.
8. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. et al. Colorimeric method for determination of sugars and related substances // Anal.Chem. – 1956. – **28**, N 3. – P.350-356.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J. Protein measurement with folinphenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 2. – P. 265–275.
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**, N 5. – P. 2230 –2234.
11. 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**, N 5. – P. 2230 –2234.
12. Manzanares P., Orejas M., Ibanez E., Valles S. et al. Purification and characterization of an α-L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans* // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – **31** – P.198–202.
13. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M. α-L-rhamnosidase: old and new insights //Industrial Enzymes. – Springer, 2007. – P. 117–140.
14. 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. Bioengin. – 2004. – **87**, N 6. – P. 765–771.
15. Soares N F., Hotchkiss J.H. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice // J. Food. Sci. – 2002. – **34**. – P. 461–465.
16. Spagna G., Barbagallo R.N., Martino A., Pifferi P.G. A simple method for purifying glycosydases: α-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine // Enzyme Microb. Technol. – 2000. – **27**. – P. 522–530.
17. Terada Y., Kometani T., Nishimura T., Takii H., et al. Prevention of hesperidin crystal formation in canned mandarin orange syrup and clarified orange juice by hesperidin glycosides // Food Sci. Technol. Int. – 1995. – **1**. – P. 29–33.

Отримано 30.03.2011