

7. De Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E. Medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – 23. – P. 130–135.
8. Elizete D.F., Carlos R.S. Biochemical characterization and identification of probiotic Lactobacillus for swine // B.CEPPA, Curitiba. – 2005. – 23. – P. 299–310.
9. Guizani N., Kasapis S., Al-Ruzeiki M. Microbial, chemical and rheological properties of laban (cultured milk) // Int. J. Food Sci. Technol. – 2001. – 36. – P. 199–205.
10. Holzappel W.H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries // Int J Food Microbiol. – 2002. – 75. – P.197–212.
11. Onal A. review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods // Food Chem. – 2007. – 103. – N 4. – P. 1475–1486.
12. Ott A., Fay L.B., Chaintreau A. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor // J. Agr. Food Chem. – 1997. – 45. – P. 850–858.
13. Panagou E.Z., Katsaboxakis K.Z. Effect of different brining treatments on the fermentation of Conservolea green olives processed by the Spanish-method // Food Microbiol. – 2006. – 23. – P.199–204.
14. Sanchez I., Palop L., Ballesteros C. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of “Alamgro Eggplants” // Int J Food Microbiol. – 2000. – 59. –P.9–17.
15. Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. Identification and susceptibility of bacterial isolates probiotic products // Int J Food Microbiol. – 2003. – 81. – P.1–10.
16. Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K., Gill H.S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains // Int J Food Microbiol. – 2005. – 98. – P.211–217.
17. William P.C., Phillip M.K., Lorenzo M. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Lactobacillus Species // J. of Food Protection.- 1998. – 61. – N 12. – P.1636-1643.

Отримано 30.10.2013

УДК 577.15:577.152.3

**О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, ДОЗ680, Україна*

## **КОМПОНЕНТНИЙ СКЛАД $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* І *EUPENICILLIUM ERUBESCENS***

*Досліджено компонентний склад  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* і *Eupenicillium erubescens*. Показано, що ензими мають мономерну структуру. Молекулярні маси  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* склали 50 і 40 кДа, відповідно. Ферментні препарати *C. albidus* та *E. erubescens* схожі за якісним, проте відрізняються за кількісним амінокислотним складом. У складі  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* більший вміст гістидину, проліну, цистеїну, метіоніну порівняно з  $\alpha$ -L-рамнозидазою *E. erubescens*.  $\alpha$ -L-Рамнозидаза *E. erubescens*, на відміну від  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus*, містить більше лізину, аргініну, треоніну, аланіну, ізолейцину, лейцину, тирозину, фенілаланіну. Показано, що в очищених препаратах  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* та *E. erubescens* присутні вуглеводи, вміст яких складає 5 та 1 % від маси препаратів, відповідно. Ферментні препарати відрізнялись за кількісним вмістом і якісним моносахаридним складом. Обидва препарати містили рамнозу, ксилозу, манозу, галактозу і глюкозу. Поряд із цим, в  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* виявлена фукоза, в той час як в  $\alpha$ -L-рамнозидази *E. erubescens* - рибоза і арабіноза. Значний відсоток гідрофобних амінокислот, який складає 31 та 34 % від загального вмісту, а також наявність вуглеводного компоненту сприяє стабілізації структури ферментів.*

*Ключові слова:*  $\alpha$ -L-рамнозидази *Cryptococcus albidus* і *Eupenicillium erubescens*, молекулярна маса, амінокислотний та моносахаридний склад.

$\alpha$ -L-Рамнозидаза ( $\alpha$ -L-рамнозид-рамногідролаза – К.Ф. 3.2.1.40) –гідролітично відщеплює кінцеві невідновлені  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- та  $\alpha$ -1,6-зв'язані залишки L-рамнози в  $\alpha$ -L-рамнозидах. Їх найпростішими природними субстратами є  $\alpha$ -L-рамнозовмісні полімери: похідні флавоноїдів – рутин, неогесперидин, гесперидин, нарингін, кверцитрин; сапоніни – гінзенозиди; терпенові глікозиди – авенакозиди.

© О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець, 2014

Ці властивості  $\alpha$ -L-рамнозидаз дозволяють використовувати їх в різних напрямках досліджень. Так, на основі глікозидів рослинного походження, таких як рутин, кверцитрин, гесперидин дослідники створюють засоби для лікування серцево-судинних захворювань, препаратів із противірусною та імунотропною дією.  $\alpha$ -L-Рамнозидази використовуються також в харчовій промисловості. Гідролізуючи терпенові глікозиди – рутинозиди, фермент сприяє вивільненню ароматичних сполук, які підсилюють аромат виноградних соків і вин. Відщеплення рамнози від біофлавоноїду нарингіну приводить до підсилення їх аромату. Використання  $\alpha$ -L-рамнозидаз в хімічній промисловості пов'язано зі здешевленням виробництва рамнози.

Здатність продукувати  $\alpha$ -L-рамнозидази зустрічається серед різних таксономічних груп мікроорганізмів, в першу чергу це мікроміцети, серед яких найбільша кількість продуцентів, а також бактерії, в той час як серед дріжджів вони визначаються надзвичайно рідко.

Раніше [6, 7] в результаті скринінгу були відібрані перспективні штами *Cryptococcus albidus* і *Eupenicillium erubescens*, вивчені їх трофічні особливості та підібрані оптимальні умови культивування [2]. З супернатанту культуральних рідин *C. albidus* і *E. erubescens* виділено і очищено препарати  $\alpha$ -L-рамнозидаз, вивчено їх фізико-хімічні властивості [3, 4]. Разом із тим, для створення високоефективної технології отримання ензимних препаратів необхідна характеристика їх хімічного складу. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідження амінокислотного, моносахаридного складу та молекулярної маси  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens*.

**Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження були штами *Cryptococcus albidus* і *Eupenicillium erubescens*, одержані з колекцій музейних культур відділів фізіології промислових мікроорганізмів та фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Продуценти  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* вирощували глибинним способом впродовж чотирьох або восьми діб (відповідно) при температурі 26° і 28°C, на качалках при 220 об/хв. *C. albidus* культивували на оптимізованому раніше [2] середовищі наступного складу, г/л: рамноза – 2, пептон – 5, дріжджовий екстракт – 3, мальтекстракт – 3, рН – 6, а *E. erubescens* на середовищі Чапека [2], г/л: NaNO<sub>3</sub> – 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1; KCl – 0,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,015; рамноза – 3, рН – 6,0.

Ензимні препарати  $\alpha$ -L-рамнозидаз виділяли з культуральних рідин продуцентів шляхом осадження сульфатом амонію (до 90 % насичення) з наступною хроматографією на заряджених і нейтральних TSK-гелях (DEAE-Toyorearl 650-s і Toyorearl HW-60 «Toya Soda» Японія, відповідно), як описано раніше [3, 4].

$\alpha$ -L-Рамнозидазну активність визначали методом Davis [11]. Для визначення активності ензиму до 1 мл розчину ензиму (вміст білка – 0,01 мг/мл), додавали 1 мл 0,05 % розчину нарингін у 0,1 М фосфатно-цитратному буфері (ФЦБ) рН 5,2. Реакційну суміш інкубували протягом 60 хв при температурі 37°C. Відбирали аліквоти по 0,2 мл, додавали по 10 мл діетиленгліколю та по 0,2 мл 4М розчину NaOH. Суміш витримували за кімнатної температури 10 хв, інтенсивність жовтого забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-16 при 420 нм.

За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах досліду.

Специфічна  $\alpha$ -L-рамнозидазна активність препарату складала 12 од/мг білка і 120 од/мг для *C. albidus* та *E. erubescens*, відповідно.

Визначення молекулярної маси ферментів у нативній системі проводили за допомогою гель-фільтрації [10] на колонці (1,3×50 см) з Sepharose 6В. Вільний об'єм колонки, який був встановлений із застосуванням блакитного декстрану 2000, становив 20 мл. Колонку було урівноважено 0,01 М фосфатним буфером рН 6,0. На колонку наносили 1 мл розчину ферменту (10 мг), збільшивши попередньо густину розчину додаванням сахарози в кінцевій концентрації 0,5 М. Елюцію проводили тим же буфером з 0,1 М NaCl. Швидкість елюції — 0,3 мл/хв. Калібрувальну криву для розрахунку молекулярної маси будували за допомогою високомолекулярних білків-маркерів фірми “Pharmacia” (Швеція): рибонуклеази (13,7 кДа), протеїнази К (25 кДа), овальбуміну курячого (43 кДа), бичачого сивороточного альбуміну (67 кДа).

Денатуруючий електрофорез в присутності додецилсульфату натрію (ДСН) проводили згідно з методом Laemmli [13]. Препарати ферментів розчиняли в буфері для зразків (0,5 М

Трис-НСІ з  $\beta$ -меркаптоетанолом, рН 8,8, який містив 10 % ДСН, 20 % розчину гліцерину та 0,001 % розчину бром-фенолового синього), кип'ятили протягом 5 хв, після чого наносили на гель (50–100 мкг на лунку). Електрофорез проводили у 5%-му концентруючому та 12 %-му розділяючому акриламідних гелях при постійній силі струму 30 мА. Досліджувані препарати визначали в гелі після фарбування кумасі R-250 та інтенсивного відмивання надлишку барвника 7 % оцтовою кислотою. Молекулярну масу ферментів визначали, використовуючи білки-маркери "Pharmacia" (Швеція), до яких входили: рибонуклеаза (13,7 кДа), протеїназа К (25 кДа), овалбумін курячий (43 кДа), бичачий сивороточний альбумін (67 кДа).

Для визначення амінокислотного складу ферментні препарати гідролізували в 6 н НСІ при 105°С у вакуумованих ампулах протягом 24 год. Кількісний і якісний склад гідролізатів амінокислот досліджували на автоматичному аналізаторі амінокислот Т 339, (Чехія, Прага).

Кількість вуглеводів визначали за Dubois et al. [12]: реакційна суміш містила 0,5 мл досліджуваного розчину ферменту, 0,5 мл 5 % фенолу і 2,5 мл сірчаної кислоти (концентрованої). Витримували суміш при кімнатній температурі протягом 40 хв, вимірювали оптичну густина на спектрофотометрі СФ-16 при довжині хвилі 490 нм. Кількість вуглеводів визначали відповідно до стандартної кривої, побудованої за глюкозою.

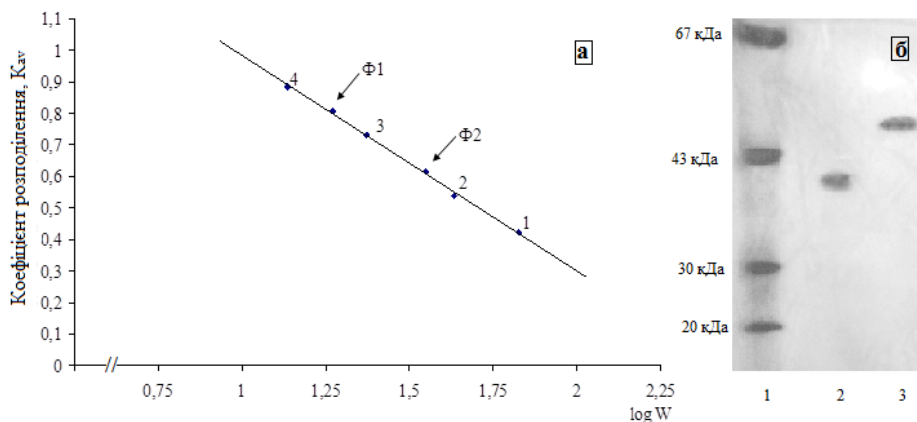
Ідентифікацію нейтральних моносахаридів здійснювали методом хромато-мас-спектрометрії у вигляді ацетатів поліолів. Обробку препаратів проводили згідно з методом Albersheim et al. [9]: 1 мг препарату гідролізували протягом 5 год при температурі 100°С у 0,2 мл 2 н НСІ, після чого випарювали до сухого стану та тричі промивали дистильованою водою; до проби вносили 10-15 мг натрію боргїдриду, після чого витримували її при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом ночі. Нейтралізували смолою КУ-2 в Н<sup>+</sup> формі, фільтрували, випарювали до сухого стану і промивали тричі метанолом. Додавали 0,5 мл піридину та 0,5 мл оцтового ангїдриду і ацетилували протягом 15 хв при 100°С. Після висушування додавали 2-3 мл хлороформу, центрифугували в скляних пробірках 20 хв при 2500 g. Супернатант містив суміш нейтральних моносахаридів у вигляді ацетатів поліолів. Далі розділяли на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert, колонка DB-225 mS 30m  $\times$  0,25mm  $\times$  0,25mkm, газ носій – гелій, потік через колонку 1 мл/хв. Температура випаровування – 250 °С, інтерфейса – 280 °С, термостата – 220 °С (режим ізотермічний). Пробу вводили з діленням потоку 1:100. Ідентифікацію моносахаридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів стандартних і досліджуваних зразків, а також із використанням комп'ютерної бази даних ChemStation. Кількісне співвідношення окремих моносахаридів визначали у відсотках від загальної суми площ всіх піків моносахаридів [9].

Усі досліді проводили у 5-8 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводився шляхом їх статистичної обробки методами варіаційної та кореляційної статистики з використанням *t*- критерію Стьюдента [5]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ( $M \pm m$ ). Значення при  $P < 0,05$  розглядали як достовірні. Результати, що подані графічно, отримувалися за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

**Результати та їх обговорення.** Діапазон молекулярних мас  $\alpha$ -L-рамнозидаз різного походження надзвичайно широкий, відрізняється різноманітністю і для більшості досліджених  $\alpha$ -L-рамнозидаз становить від 40 до 240 кДа [1, 14]. На відміну від рослинних глікозидаз, які звичайно представлені двома формами (високо- та низькомолекулярними), для глікозидаз грибною і тваринною походження характерним є наявність лише однієї високомолекулярної форми, хоча у *A. aculeatus* вона мала два мономери з  $\alpha$ -L-рамнозидазною активністю (92 і 85 кДа відповідно) [1]. Бактеріальні та дріжджові ензими нерідко складаються з двох, трьох, чотирьох мономерних одиниць і мають відповідно більшу молекулярну масу від 120 до 240 кДа [14].

Порівняльний аналіз молекулярних мас  $\alpha$ -L-рамнозидаз з різних продуцентів ускладнюється тим, що різні автори дані про молекулярну масу ензиму приводять на основі результатів лише одного методу, найчастіше гель-фільтрації у нативній системі, або денатуруючого електрофорезу, що не дає змоги повно охарактеризувати молекулу ензиму.

Визначення молекулярної маси ферментів проводили в нативній та денатуруючій системах. Гель-фільтрацією на Sepharose 6B було показано, що молекулярні маси  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* (рис. 1) становлять близько 50 та 40 кДа відповідно.



**Рис. 1. Молекулярна маса  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* у нативній (а) та денатуруючій (б) SDS-PAGE системі.**

**Примітка:** Маркери молекулярних мас на рис. а: рибонуклеаза (13,7 кДа) (1), протеїназа К (25 кДа) (2), овальбумін курячий (43 кДа) (3), бичачий сироватковий альбумін (67 кДа) (4),  $\Phi$  1,  $\Phi$  2 –  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* та *E. erubescens* відповідно; на рис. б: 1 – білки маркери, 2 –  $\alpha$ -L-рамнозидаза *E. erubescens*, 3 –  $\alpha$ -L-рамнозидаза *C. albidus*.

Електрофорез в поліакриламідному гелі в системі додецилсульфату натрію показав (рис.1 б), що препарати *C. albidus* і *E. erubescens* були гомогенні і мали молекулярну масу  $\sim 49$  та  $39 - 40$  кДа відповідно. Такі значення молекулярних мас показані для ферментів *Aspergillus terreus* і *Aspergillus flavus* MTCC-9606 (40 та 41 кДа відповідно) [1, 13], а також *Absidia* sp. (53 кДа) [1].

Таким чином, визначені молекулярні маси  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* як в нативних, так і денатуруючих умовах, були приблизно однаковими і складали  $\sim 50$  та  $40$  кДа відповідно.

Дослідження амінокислотного складу (табл. 1)  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* засвідчує ідентичність їх якісного складу, але відмінність за кількісним вмістом.

**Таблиця 1**

**Амінокислотний склад  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* та *E. erubescens*  
(% до сухої маси препарату)**

Амінокислота	$\alpha$ -L-Рамнозидаза <i>C. albidus</i>	$\alpha$ -L-Рамнозидаза <i>E. erubescens</i>
Лізин	2,91 $\pm$ 0,04	4,43 $\pm$ 0,01
Гістидин	2,59 $\pm$ 0,03	1,53 $\pm$ 0,020
Аргінін	2,12 $\pm$ 0,03	4,28 $\pm$ 0,03
Аспарагінова кислота	14,84 $\pm$ 0,20	16,44 $\pm$ 0,10
Треонін	5,28 $\pm$ 0,07	7,80 $\pm$ 0,06
Серин	5,65 $\pm$ 0,08	9,46 $\pm$ 0,06
Глутамінова кислота	17,50 $\pm$ 0,20	9,05 $\pm$ 0,07
Пролін	4,01 $\pm$ 0,05	3,26 $\pm$ 0,025
Гліцин	15,48 $\pm$ 0,20	9,45 $\pm$ 0,07
Аланін	8,99 $\pm$ 0,10	9,82 $\pm$ 0,07
Цистеїн	1,15 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,006
Валін	4,51 $\pm$ 0,06	4,44 $\pm$ 0,03
Метіонін	2,40 $\pm$ 0,03	1,78 $\pm$ 0,01
Ізолейцин	2,81 $\pm$ 0,04	4,25 $\pm$ 0,03
Лейцин	6,26 $\pm$ 0,08	8,21 $\pm$ 0,06
Тирозин	1,88 $\pm$ 0,02	2,43 $\pm$ 0,01
Фенілаланін	1,61 $\pm$ 0,02	2,58 $\pm$ 0,01
Сума	100,00	100,00

Для обох ферментних препаратів був характерним високий вміст аспарагінової, глютамінової кислот та гліцину. Препарат  $\alpha$ -L-рамнозидази *E. erubescens* містив більше аспарагіно-

вої кислоти (16,44 %), порівняно з глютаміною (9,05 %), а на відміну від  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* – більше глютамінової кислоти (17,5 %) порівняно з аспарагіною (14,84 %). Вміст гліцину був вищим в  $\alpha$ -L-рамнозидазі *C. albidus* (15,48%), порівняно з  $\alpha$ -L-рамнозидазою *E. erubescens* (9,45 %).

У складі  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* більший вміст гістидину, проліну, цистеїну, метіоніну порівняно з  $\alpha$ -L-рамнозидазою *E. erubescens*.  $\alpha$ -L-Рамнозидаза *E. erubescens*, на відміну від  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus*, містить більше лізину, аргініну, треоніну, аланіну, ізолейцину, лейцину, тирозину, фенілаланіну.

Показано, що відсоток гідрофобних амінокислот, які відповідають за стабільність молекули ферменту, складає 31 та 34 % від загального вмісту (відповідно для ферментних препаратів *C. albidus* та *E. erubescens*). Ферментні препарати містили також близько 32 та 25 % кислих амінокислот відповідно. Близький розподіл кислих і основних амінокислот був виявлений раніше [8] в  $\alpha$ -L-рамнозидазах 1 і 2 *Penicillium commune*.

В складі  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* виявлено вуглеводи, вміст яких складав 5 та 1 % від сухої маси препаратів, відповідно.

Моносахаридний склад обох досліджених  $\alpha$ -L-рамнозидаз (табл. 2, рис. 2) представлений рамнозою, ксилозою, манозою, галактозою, глюкозою. Поряд із цим  $\alpha$ -L-рамнозидаза *C. albidus* містила рибозу і арабінозу, в той час як  $\alpha$ -L-рамнозидаза *E. erubescens* - фукозу.

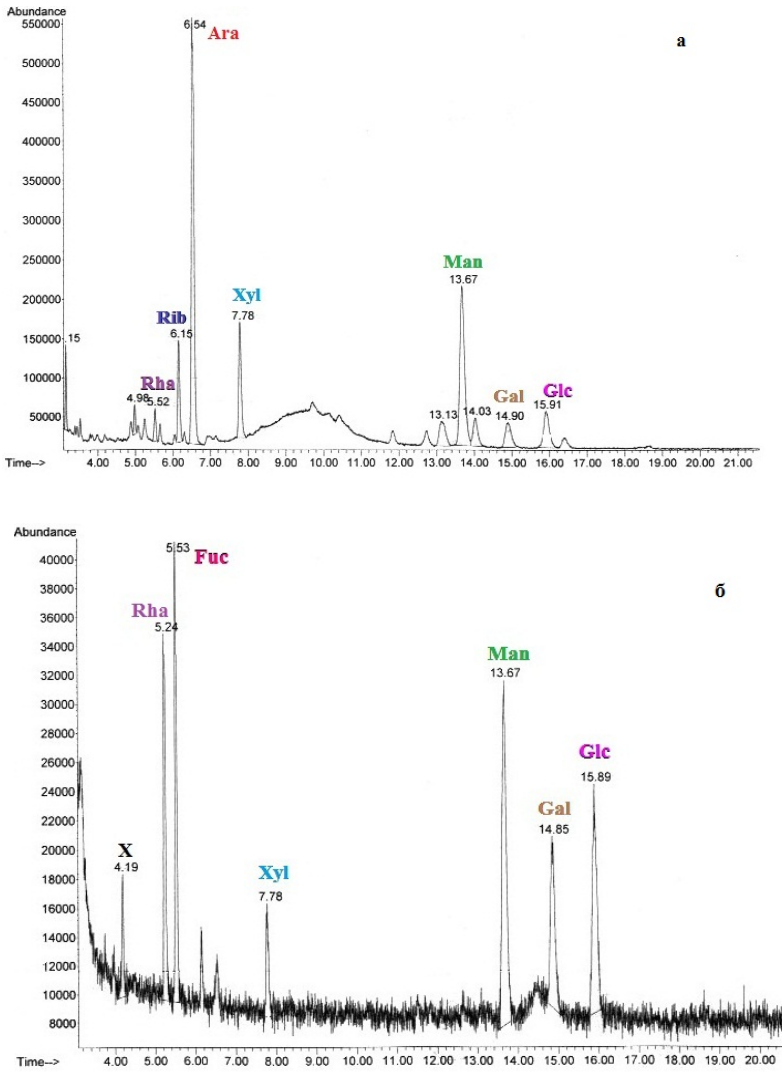


Рис. 2. Моносахаридний склад препаратів  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* (а) і *E. erubescens* (б)

Досліджені  $\alpha$ -L-рамнозидази різнились за кількісним вмістом моносахаридів (табл. 2). Так, домінуючими моносахаридами  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* були арабіноза (43±0,06 %), маноза (25,1±0,1%) і ксилоза (10,4±0,09 %), в той час як  $\alpha$ -L-рамнозидази *E. erubescens* – маноза (27,83±0,2 %), фукоза (18,67±0,09), глюкоза (17,86±0,2), рамноза (16,38±0,07 %).

Таблиця 2

**Моносахаридний склад препаратів  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens***

Моносахарид	<i>C. albidus</i>	<i>E. erubescens</i>
	% до загальної суми площ піків	
Рамноза	2,0±0,01	16,38±0,07
Рибоза	7,2±0,02	-
Арабіноза	43,0±0,06	-
Фукоза	-	18,67±0,09
Ксилоза	10,4±0,09	5,51±0,01
Маноза	25,1±0,10	27,83±0,2
Галактоза	5,5±0,07	13,75±0,05
Глюкоза	6,8±0,80	17,86±0,02

**Примітка.** «-» моносахарид не виявлений

Таким чином, в результаті проведеної роботи був досліджений компонентний склад  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* та *E. erubescens*. Встановлено, що ензими мають мономерну структуру. Молекулярні маси  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* склали 50 і 40 кДа, відповідно. Ферментні препарати *C. albidus* та *E. erubescens* схожі за якісним, проте відрізняються за кількісним амінокислотним складом. В очищених ферментних препаратах виявлено вуглеводи, вміст яких складав 5 та 1 % від маси препаратів, відповідно для  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens*.  $\alpha$ -L-Рамнозидази відрізнялись за кількісним моносахаридним складом, який представлений рамнозою, ксилозою, манозою, галактозою, глюкозою. Поряд з цим  $\alpha$ -L-рамнозидаза *C. albidus* містила фукозу, в той час як  $\alpha$ -L-рамнозидаза *E. erubescens* – рибозу і арабінозу. Значний відсоток гідрофобних амінокислот, який складає 31 та 34 % від загального вмісту, а також наявність вуглеводного компоненту сприяє стабілізації структури ферментів.

Автори висловлюють подяку співробітникам ІМВ НАН України: канд. біол. наук, старш. наук. співроб. С.С. Нагорній, канд. біол. наук., старш. наук. співроб. Курченко І.М., д-р біол. наук., проф. Ждановій Н.М. за надані для досліджень штами мікроорганізмів.

*Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец*

*Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна*

**КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ  $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗ  
*CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* И *EUPENICILLIUM ERUBESCENS***

Резюме

Исследовано компонентный состав  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* и *Eupenicillium erubescens*. Показано, что энзимы имеют мономерную структуру. Молекулярные массы  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* и *E. erubescens* составляли 50 и 40 кДа, соответственно. Ферментные препараты *C. albidus* и *E. erubescens* подобны по качественному, но отличаются по количественному аминокислотному составу. В состав  $\alpha$ -L-рамнозидазы *C. albidus* входит больше гистидина, пролина, цистеина, метионина, по сравнению с  $\alpha$ -L-рамнозидазой *E. erubescens*.  $\alpha$ -L-рамнозидаза *E. erubescens*, в отличие от  $\alpha$ -L-рамнозидазы *C. albidus*, содержит больше лизина, аргинина, треонина, аланина, изолейцина, лейцина, тирозина, фенилаланина. Показано, что в очищенных препаратах  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* и *E. erubescens* присутствуют углеводы, которые составляют 5 и 1 % от массы препаратов, соответственно. Ферментные препараты отличаются по количественному содержанию и качественному моносахаридному составу. Оба препарата содержали рамнозу, ксилозу, маннозу, галактозу и глюкозу. Наряду с этим, в  $\alpha$ -L-рамнозидазе *C. albidus* выявлена фукоза, тогда как в  $\alpha$ -L-рамнозидазе *E. erubescens* - рибоза и арабиноза. Значительный процент гидрофобных аминокислот, который составляет 31 и 34 % от общего состава, а также наличие углеводного компонента способствует стабилизации структуры ферментов.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Cryptococcus albidus* и *Eupenicillium erubescens*, молекулярная масса, аминокислотный и моносахаридный состав.

**COMPONENT COMPOSITION OF *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS*  
AND *EUPENICILLIUM ERUBESCENS*  $\alpha$ -L-RHAMNOSIDASES**

Summary

The component composition of *Cryptococcus albidus* and *Eupenicillium erubescens*  $\alpha$ -L-rhamnosidases have studied. It was shown that enzymes have a monomeric structure. Enzyme preparations of *C. albidus* and *E. erubescens* have similar qualitative but differ in quantitative amino acid composition.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of *C. albidus* characterised by high amount of histidine, proline, cysteine, methionine in compared with  $\alpha$ -L-rhamnosidase of *E. erubescens*.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of *E. erubescens*, in contrast to the  $\alpha$ -L-rhamnosidase of *C. albidus*, contained higher levels of lysine, arginine, threonine, alanine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine. It is shown that purified preparations of  $\alpha$ -L-rhamnosidase *C. albidus* and *E. erubescens* contained 5 and 1% carbohydrates respectively. Enzyme preparations differ in quantitative monosaccharide composition, which represented by rhamnose, xylose, mannose, galactose and glucose. Furthermore,  $\alpha$ -L-rhamnosidase *C. albidus* contained fucose, whereas  $\alpha$ -L-rhamnosidase *E. erubescens* - ribose and arabinose. A significant percentage of hydrophobic amino acids, which is 31 and 34% of the total content, and the presence of the carbohydrate component are essential in stabilization of enzymes molecule.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*,  $\alpha$ -L-rhamnosidases, molecular weight, amino acid and monosaccharide composition.

The authors address: Gudsenko O.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny St., Kiev, MSP, DO3680, Ukraine.

1. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010. – 437 с.
2. Гудзенко О.В., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація умов культивування  $\alpha$ -L-рамнозидаз – представників різних таксономічних груп мікроорганізмів // Мікробіол. журн. – 2011. – 73, №3. – С. 46–53.
3. Гудзенко О.В., Варбанець Л.Д. Очистка та фізико-хімічні властивості  $\alpha$ -L-рамнозидази *Eupenicillium erubescens* // Мікробіол. журн. – 2012. – 73, №1. – С. 14–21.
4. Гудзенко О.В., Варбанець Л.Д. Очистка та фізико-хімічні властивості  $\alpha$ -L-рамнозидази *Cryptococcus albidus* // Мікробіол. журн. – 2012. – 73, №6. – С. 16–23.
5. Лакін Г.Ф. Биометрия.-М.: Высш.шк. – 1990. – 352с.
6. Рзаєва О.М., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д., Соколова О.В., Харкевич О.С., Жданова Н.М., Сафронова Л.А. Скринінг мікроорганізмів продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази // Мікробіол. журн. – 2005. – 67, №5. – С. 19–27.
7. Рзаєва О.М., Варбанець Л.Д., Нагорна С.С. Скринінг продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази серед дріжджів // Мікробіол. журнал. – 2010. – 72, №6. – С. 11–17.
8. Рзаєва О. М.  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Penicillium commune* 266: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : 03.00.07. / Рзаєва Ольга Миколаївна; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного. – К.: [б. в.], 2007. – 21 с.
9. Albershein P., Nevis D. J., English P. D., Karr A. A method of analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography // Carbohydrate Research. – 1976. – 5, № 3. – P. 340–345.
10. Andrews P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration // Biochemical Journal. – 1964. – 91, № 2. – P. 222–233.
11. Davis W.B. Determination of flavonones in citrus fruits // Anal. Chem. – 1947. – 19, № 7. – P. 476–478.
12. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. – 1956. – 28, № 3 – P. 350–356.
13. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M.  $\alpha$ -L-rhamnosidase: old and new insights // Industrial Enzymes, Springer, 2007. P. 117–140.
14. Yadav V., Yadav P. K., Yadav S., Yadav K. D. S.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: A review // Process Biochemistry. – 2010. – 45, № 8. – P. 1226–1235.

Отримано 25.10.2013