

**О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець, І.М. Курченко, Л.Т. Наконечна**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

## **СКРИНІНГ ПРОДУЦЕНТІВ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗ СЕРЕД ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *PENICILLIUM***

*Метою роботи було дослідити  $\alpha$ -L-рамнозидазу [КФ 3.2.1.40] – фермент, який гідролітично відщеплює термінальні  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- та  $\alpha$ -1,6-зв'язані залишки L-рамнози.*

*Внаслідок скринінгу, проведеного серед 30 штамів мікроміцетів, встановлено, що в супернатанті культуральних рідин різних видів *Penicillium*: *P. tardum* 60, 39, 2929, 2962, 2963, 2964, 2965, 2966, *P. rugulosum* 2778, 1652, 2766, *P. restrictum* 425, 2756, *P. aculeatum* 202, 217, 329, 2973, 2974, 2975, 2976, 2977, 2979 виявлено  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність, що складала від 0,07 до 0,53 од/мг білка. Найбільш активним виявився *P. aculeatum* 202. З супернатанту культуральної рідини даного мікроміцета осадженням сульфатом амонію (90 % насичення) отримано комплексний ензимний препарат та вивчено деякі фізико-хімічні властивості. Показано, що ензим має рН оптимум 3,0, а термооптимум – 60 °С. Встановлено, що досліджуваний препарат  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202 був стабільним у діапазоні рН від 2,0 до 4,0 упродовж 90 хв. При значенні рН 5,0 активність комплексного ензимного препарату децю зменшувалась і складала до 40 % від вихідної. За оптимальних значень рН 3,0 та температури 15 °С, досліджувана  $\alpha$ -L-рамнозидаза була стабільна протягом трьох діб. Поряд з  $\alpha$ -L-рамнозидазою, препарат *P. aculeatum* 202 виявляв лише  $\beta$ -D-глюкозидазну активність.*

*К л ю ч о в і с л о в а: *Penicillium aculeatum* 202,  $\alpha$ -L-рамнозидаза, мікроміцети, фізико-хімічні властивості, спектр глікозидазних активностей.*

$\alpha$ -L-Рамнозидаза [КФ 3.2.1.40] – фермент, що гідролітично відщеплює термінальні  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- та  $\alpha$ -1,6-зв'язані залишки L-рамнози, що присутні як у синтетичних, так і природних глікозидах, оліго-, полісахаридах, гліколіпідах і різних глікокон'югатах: похідних флавоноїдів (рутин, неогесперидин, гесперидин, нарингін, кверцитрин), а також сапонінах; терпенових глікозидах.

В останні роки цей ензим привертає особливу увагу дослідників, які на основі глікозидів рослинного походження створюють засоби для лікування серцево-судинних захворювань, а також препарати з противірусною та імуотропною дією. Для прояву біологічної дії деяких з цих препаратів необхідна наявність рамнози, інших – її відщеплення. Проте, головне використання  $\alpha$ -L-рамнозидаз спрямоване на покращення якості напоїв (зменшення гіркоти, підсилення аромату вин) і виробництво харчових добавок.

Незважаючи на те, що  $\alpha$ -L-рамнозидази знаходять в тканинах тварин (морських моллюсків *Turbo cornutus*, свиней), рослин (*Rhamnus daurica* і *Fagopyrum esculentum*) [1, 2], найбільш технологічними джерелами їх одержання є мікроорганізми, оскільки вони здатні надзвичайно швидко розмножуватись та здійснювати синтез в умовах, контрольованих людиною.

На сьогодні накопичено чимало відомостей щодо бактеріальних, грибних та дріжджових культур мікроорганізмів, що здатні синтезувати  $\alpha$ -L-рамнозидазу. Однак найактивнішими біосинтетиками цього ензиму є мікроміцети.

Більшість відомих на сьогодні  $\alpha$ -L-рамнозидаз мікробного походження характеризуються рядом серйозних недоліків [11, 12], тому пошук нових, ефективних синтетиків  $\alpha$ -L-рамнозидаз продовжує залишатися актуальним питанням, враховуючи те, що в Україні їх продуценти взагалі відсутні, а висока вартість комерційних ензимних препаратів іноземного виробництва суттєво гальмує їх використання в промислових технологіях нашої держави.

Тому метою роботи був пошук ефективного продуцента  $\alpha$ -L-рамнозидази, а також дослідження деяких фізико-хімічних властивостей: рН та термооптимум, рН- та термостабільність.

**Матеріали і методи.** Об'єктами досліджень слугували 30 штамів мікроміцетів, представників роду *Penicillium*: *P. tardum* 60, 39, 40, 1295, 2929, 2962, 2963, 2964, 2965, 2966, 2777, *P. rugulosum* 2778, 993, 1652, 2766, 2776, *P. aculeatum* 202, 100, 217, 329, 2746, 2973, 2974, 2975, 2976, 2977, 2978, 2979, *P. restrictum* 425, 2756, що були виділені з різних екологічних ніш (табл. 1). Мікроміцети вирощували у пробірках зі скошеним середовищем сусло-агару протягом 14 діб за температури 25 °С, а потім пересівали у колби Ерленмейера (750 мл), що містили 100 мл рідкого середовища Чапека такого складу, г/л: рамноза – 5; NaNO<sub>3</sub> – 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5; KCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,015; рН 5,0. Культивування проводили протягом 5 діб в умовах качалок при 220 об/хв та температурі 25 °С.

Комплексні препарати  $\alpha$ -L-рамнозидаз одержували із супернатанту культуральних рідин після відокремлення біомаси фільтруванням через 4 шари марлі, а також осадженням сульфатом амонію до 90 % насичення. Суміші витримували 12–16 год. за температури 4 °С і центрифугували при 5000 г упродовж 30 хв. Осад збирали, розчиняли у трикратному об'ємі 3 М сульфату амонію, додавали 0,01 М азид натрію для зберігання.

Для визначення активності глікозидаз до 0,1 мл розчину ензиму додавали 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буферу (ФЦБ) рН 5,2 та 0,1 мл 0,01 М розчину субстрату у ФЦБ. Реакційну суміш інкубували протягом 10 хв за температури 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 1 М розчину бікарбонату натрію. До контролю додавали ті ж компоненти, але у зворотному порядку. Кількість *n*-нітрофенолу, що було відщеплено у результаті гідролізу, визначали колориметричним методом на спектрофотометрі СФ-26 за поглинанням при 400 нм [13]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, що гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах досліду.

Визначення глікозидазних активностей проводили, використовуючи відповідні синтетичні субстрати: *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -D-глюкопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -D-галактопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -D-ксилопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-манопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-фукопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкозамінід (“Sigma-Aldrich”, США).

При визначенні  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності з застосуванням при-

Таблиця 1

Джерело виділення продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидаз

№	Роди мікроорганізмів	Джерело виділення	№	Роди мікроорганізмів	Джерело виділення
1	<i>Penicillium tardum</i> 60	Київська область, світло-сірий лісовий ґрунт, 1994 р.	16	<i>P. rugulosum</i> 2766	Новоград-Волинський, ґрунт, 1996 р.
2	<i>P. tardum</i> 39	Крим, мармур давніх споруд, 1997 р.	17	<i>P. rugulosum</i> 2776	
3	<i>P. tardum</i> 40	Миколаївська область, мармур, 1997 р.	18	<i>P. aculeatum</i> 100	Запорізька область, ґрунт, 2003 р.
4	<i>P. tardum</i> 1295	Чистоголівка, 30 км, дерево-підзолистий ґрунт, 1999 р.	19	<i>P. aculeatum</i> 217	Київ, кіноплівка, 2003 р.
5	<i>P. tardum</i> 2929	Київ, ґрунт Києво-Печерської лаври, дальні печери, 1998 р.	20	<i>P. aculeatum</i> 329	Саки, промислові відходи, 1987 р.
6	<i>P. tardum</i> 2962	Київ, квартирний кахель, 2006 р.	21	<i>P. aculeatum</i> 2746	Київ, дзеркало, 2001 р.
7	<i>P. tardum</i> 2963	Київ, повітря музею медіцини, 2014 р.	22	<i>P. aculeatum</i> 2973	Київ, холодильник, емальована поверхня, 2001 р.
8	<i>P. tardum</i> 2964	Шостка, ґрунт, 2014 р.	23	<i>P. aculeatum</i> 2974	Київ, ущільнювальна гума на холодильнику, 2001 р.
9	<i>P. tardum</i> 2965	Лелев, ґрунт Чорнобильської зони 2005 р.	24	<i>P. aculeatum</i> 2975	Київ, зіпсовані плоди персика, 2006 р.
10	<i>P. tardum</i> 2966	Підстилка Чорнобильської зони, 2005 р.	25	<i>P. aculeatum</i> 2976	
11	<i>P. tardum</i> 2777	Новоград-Волинський, підзолистий ґрунт, 1997 р.	26	<i>P. aculeatum</i> 2977	
12	<i>P. rugulosum</i> 2778	Обухів, ґрунт, 1997 р.	27	<i>P. aculeatum</i> 2978	Шостка, Сумської обл., відходи комбінату кіноплівки, 2012 р.
13	<i>P. aculeatum</i> 202	Крим, ґрунт з гори Карагач, 1997 р.	28	<i>P. aculeatum</i> 2979	Кацавелі, пісок, 2003 р.
14	<i>P. rugulosum</i> 993	Житомирська область, ґрунт, 1999 р.	29	<i>P. restrictum</i> 425	Київ, дзеркало, 2001 р.
15	<i>P. rugulosum</i> 1652		30	<i>P. restrictum</i> 2756	

родних субстратів нарингіну та неогесперидину використовували метод Davis [7].

Вміст білка на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм, його кількість визначали за методом Lowry et al. [9]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали при довжині хвилі

750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін (“Sigma-Aldrich”, США).

Дослідження впливу температури та рН середовища проводили в інтервалі температур від 0 до 90 °С та рН від 1,0 до 9,0, останній створювали 0,01 М універсальним фосфатним буфером (УФБ).

Термостабільність препаратів визначали за температури 15–70°С (час експозиції 90 хв), рН-стабільність – при показниках рН середовища 2,0; 3,0; 4,0 та 5,0 (час експозиції 90 хв). Після вичерпання часу дії на ензимний препарат відповідного фактору відбирали аліквоти по 0,1 мл і визначали активність як описано вище.

Усі досліди здійснювали у 5–7 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводили 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, обробляли за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

**Результати та обговорення.** На сьогодні відомі штами-продуценти  $\alpha$ -L-рамнозидаз серед представників різних таксономічних груп [1, 2, 11, 12, 15, 16]. З технологічної точки зору найбільш вигідними є дріжджі, які характеризуються високою швидкістю росту, стійкістю до сторонньої мікробіоти, здатністю засвоювати різноманітніші джерела живлення. Але їх недоліком, як і більшості бактеріальних продуцентів, є те, що вони внутрішньоклітинні ферменти, виділення яких потребує залучення складних методів очистки, що призводить до значних втрат активності. Крім того,  $\alpha$ -L-рамнозидази, синтезовані дріжджовими продуцентами, неспроможні працювати у фізіологічних умовах, що значно обмежує область їх практичного застосування. Тому найбільш ефективними біосинтетиками  $\alpha$ -L-рамнозидаз вважаються мікроміцети, які проявляють різноманітні фізико-хімічні властивості та характеризуються високою стабільністю.

Скринінг продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази проводили серед 30 штамів мікроміцетів на середовищі, яке містило потенційний індуктор ензиму – L-рамнозу. Встановлено, що в супернатанті культуральних рідин *P. tardum* 60, 39, 2929, 2962, 2963, 2964, 2965, 2966, *P. rugulosum* 2778, 1652, 2766, *P. restrictum* 425, 2756, *P. aculeatum* 202, 217, 329, 2973, 2974, 2975, 2976, 2977, 2979 виявлено  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність, що складала від 0,07 до 0,53 од/мг білка (табл. 2). Цікавим виявилось те, що джерело виділення штамів не впливало на максимальний прояв активності. Найбільш активними виявилися *P. tardum* 60, *P. tardum* 39, *P. aculeatum* 202, які виділено з світло-сірого лісового ґрунту Київської області, мармуру давніх споруд Криму та ґрунту з гори Карагач (Крим) відповідно.

Оскільки для можливого практичного використання велике значення має вихід ензиму, з супернатанту культуральної рідини трьох найбільш активних продуцентів (*P. tardum* 60, *P. tardum* 39, *P. aculeatum* 202) осадженням сульфатом амонію (90 % насичення) були одержані частково очищені ензимні препарати. Встановлено, що вихід препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202 у декілька разів перевищував вихід препаратів ферментів з *P. tardum* 60 і *P. tardum* 39, тому подальші дослідження проводили на комплексному ферментному препараті *P. aculeatum* 202. Дослідження фізико-хімічних властивостей показало, що рН оптимум отриманого ен-

Активність  $\alpha$ -L-рамнозидаз різних видів *Penicillium*

№	Роди мікроорганізмів	Активність, од/мг	№	Роди мікроорганізмів	Активність, од/мг
1	<i>Penicillium tardum</i> 60	0,48±0,01	16	<i>P. rugulosum</i> 2766	0,25
2	<i>P. tardum</i> 39	0,48±0,03	17	<i>P. rugulosum</i> 2776	0
3	<i>P. tardum</i> 40	0	18	<i>P. aculeatum</i> 100	0
4	<i>P. tardum</i> 1295	0	19	<i>P. aculeatum</i> 217	0,28±0,05
5	<i>P. tardum</i> 2929	0,07±0,02	20	<i>P. aculeatum</i> 329	0,42±0,01
6	<i>P. tardum</i> 2962	0,44±0,03	21	<i>P. aculeatum</i> 2746	0
7	<i>P. tardum</i> 2963	0,23±0,01	22	<i>P. aculeatum</i> 2973	0,4±0,03
8	<i>P. tardum</i> 2964	0,45±0,03	23	<i>P. aculeatum</i> 2974	0,3±0,01
9	<i>P. tardum</i> 2965	0,24±0,01	24	<i>P. aculeatum</i> 2975	0,35±0,01
10	<i>P. tardum</i> 2966	0,3±0,05	25	<i>P. aculeatum</i> 2976	0,37±0,01
11	<i>P. tardum</i> 2777	0	26	<i>P. aculeatum</i> 2977	0,41±0,01
12	<i>P. rugulosum</i> 2778	0,39±0,01	27	<i>P. aculeatum</i> 2978	0
13	<i>P. aculeatum</i> 202	0,53±0,04	28	<i>P. aculeatum</i> 2979	0,42±0,01
14	<i>P. rugulosum</i> 993	0	29	<i>P. restrictum</i> 425	0,25±0,01
15	<i>P. rugulosum</i> 1652	0,13±0,01	30	<i>P. restrictum</i> 2756	0,32±0,02

зимного препарату складає 3,0, хоча при рН 2,0 та 6,0  $\alpha$ -L-рамнозидаза *P. aculeatum* 202 зберігала 90–96 %, а при рН 6,0, та 7,0 – лише 18 і 2 % відповідно, від початкової активності ензиму (рис. 1). При значеннях рН 8,0 та 9,0 активність була відсутня.

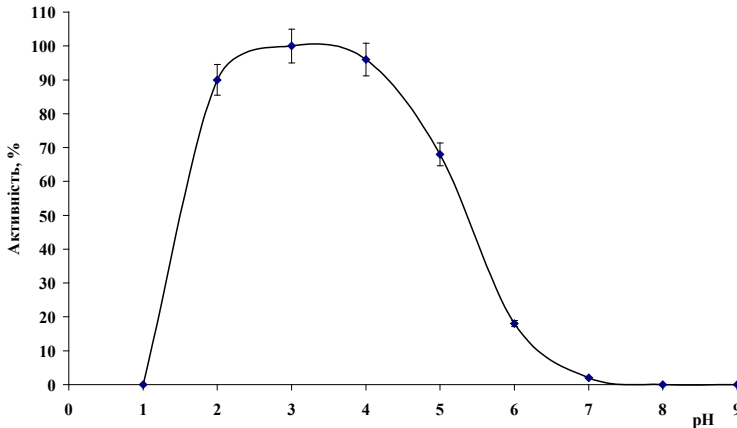


Рис. 1. рН-оптимум препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202

Отримані результати узгоджуються з даними літератури, згідно яких показники рН-оптимумів грибних глікозидаз знаходяться в інтервалі рН 4,0–6,0. Так, для  $\alpha$ -L-рамнозидази *Aspergillus nidulans* оптимальними значеннями рН були 4,5–6,0, а для ензиму *A. terreus* – 5,5, тоді як  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Aspergillus flavus* проявляла оптимальну активність при рН 6,5 [8].

Важливими характеристиками ензимних препаратів, суттєвими для практичного використання, є стабільність при певних значеннях рН і температури. Встановлено, що досліджуваний препарат  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202 був стабільним у діапазоні рН від 2,0 до 4,0 впродовж 90 хв (рис. 2). При значенні рН 5,0 активність комплексного ензимно-

го препарату дещо зменшувалась і складала до 40 % від вихідної. При оптимальному значенні рН 3,0 та температурі 15 °С досліджувана  $\alpha$ -L-рамнозидаза була стабільна протягом трьох діб.

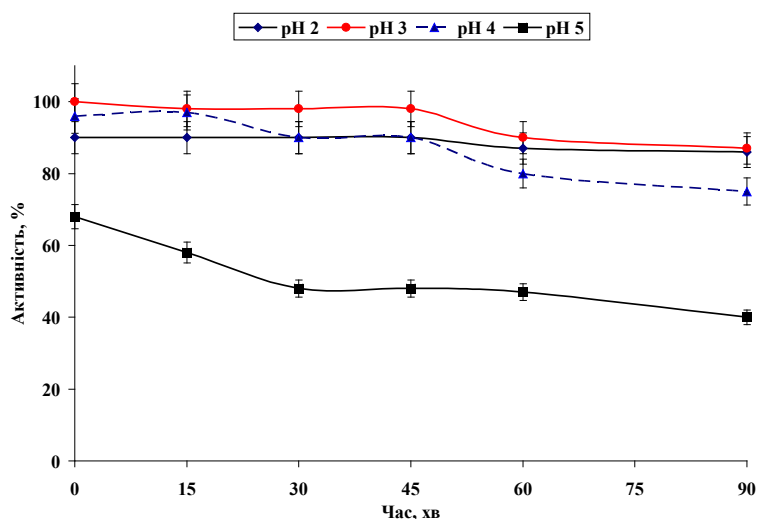


Рис. 2. рН- стабільність препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202

За даними літератури [16]  $\alpha$ -L-рамнозидази з *Penicillium sp.* та *Aspergillus niger* стійкі в інтервалі рН 3,0–5,0. Ензим *A. terreus* зберігав понад 95 % активності за рН 4,0–6,5, в той час як при рН > 6,5 активність  $\alpha$ -L-рамнозидази прогресивно знижувалася, а при рН 8,5 становила лише 10 % від максимальної [8].  $\alpha$ -L-Рамнозидаза *Aspergillus aculeatus* стабільна за рН 3,0–5,0 [10], а *A. nidulans* – за рН 4,5 [14].

Відомо, що температурний оптимум дії більшості  $\alpha$ -L-рамнозидаз становить 40–80 °С [12, 13]. Термооптимум раніше вивчених нами  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* і *Eurpenicillium erubescens* становив 60 °С, у таких умовах ензими зберігали 90 % від максимальної активності протягом 3 год [3, 4].

Що стосується досліджуваної  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202, то її температурний оптимум знаходився за 60 °С, а при 70 °С вона проявляла до 50 % ензимної активності від максимальної (рис. 3).

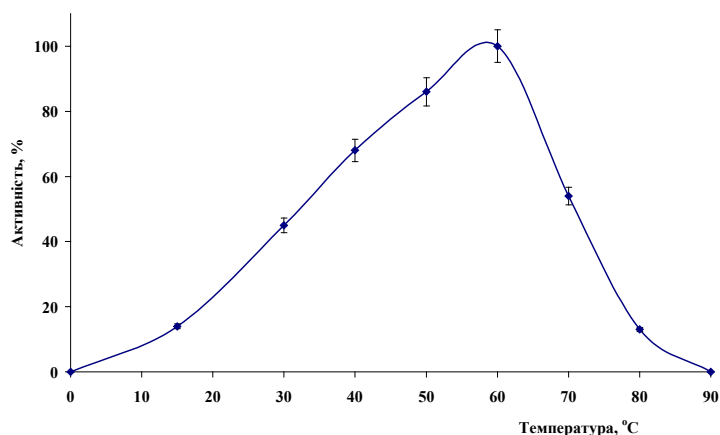


Рис. 3. Термооптимум препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202

Дослідження термостабільності комплексного ензимного препарату *P. aculeatum* 202 показало, що у діапазоні температур 15–60 °С та рН 3,0 він є стабільним протягом 90 хв (рис. 4). При збільшенні температури до 70 °С ензим втрачав активність до 15 % від вихідної. Аналогічні дані були отримані нами для  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* [3, 4], які теж при підвищенні температурного оптимуму втрачали активність.

Вивчення спектру глікозидазних активностей супернатанту культуральної рідини *P. aculeatum* 202 (рис. 5) показало, що він гідролізує такі синтетичні субстрати, як *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид та *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид.

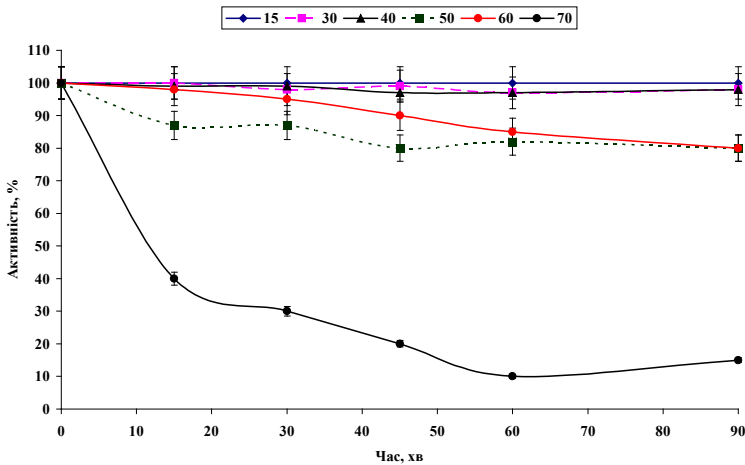


Рис. 4. Термостабільність препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202 при рН 3,0

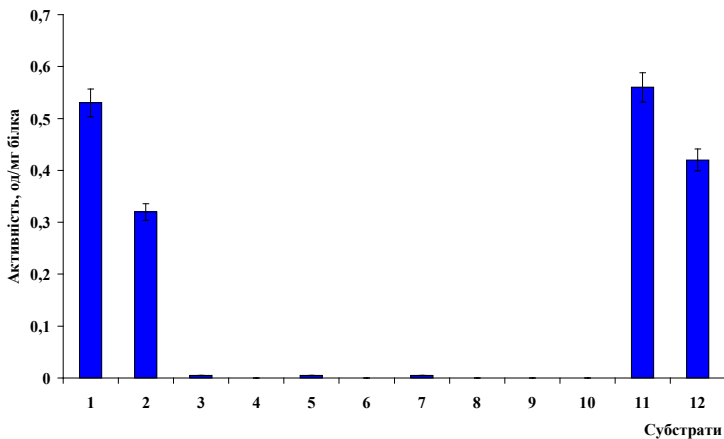


Рис. 5. Спектр глікозидазних активностей супернатанту культуральної рідини *P. aculeatum* 202

Субстрати: 1 – *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид, 2 – *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид, 3 – *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-глюкопіранозид, 4 – *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-галактопіранозид, 5 – *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозид, 6 – *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-ксилопіранозид, 7 – *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-ксилопіранозид, 8 – *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-манопіранозид, 9 – *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-фукопіранозид, 10 – *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкозамінід, 11 – нарингін, 12 – неогесперидин.

Широкий спектр глікозидазних активностей виявлено також у супернатанті культуральної рідини раніше вивченого нами продуцента *E. erubescens* [3], який, крім *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду, гідролізував *n*-нітрофеніл- $\beta$ -N-ацетилгалактозамінід, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -N-ацетилглюкозамінід і *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид. Але на відміну від  $\alpha$ -L-рамнозидази *E. erubescens* [3], досліджуваний ензимний препарат *P. aculeatum* 202 проявляв високу активність щодо природних субстратів – нарингину і неогесперидину (рис. 5).

Вивчення субстратної специфічності  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Penicillium commune* [6] показало, що ензим 1 проявляє широку субстратну специфічність і здатний відщеплювати  $\beta$ -D-глюкозу,  $\beta$ -D-ксилозу,  $\alpha$ -D-манозу,  $\alpha$ -D-галактозу, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамін від відповідних *n*-нітрофенільних субстратів, у той час як  $\alpha$ -L-рамнозидаза 2 характеризувалась вузькою субстратною специфічністю, гідролізуючи тільки *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид. Обидва ензими проявляли високу спорідненість до природних субстратів: нарингину і неогесперидину.

Таким чином, за результатами скринінгу, проведеного серед 30 штамів мікроміцетів, відібрано продуцент  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. aculeatum* 202. Показано, що комплексний ензимний препарат *P. aculeatum* є стабільним і має рН оптимум 3,0, а термооптимум 60 °С. Препарат *P. aculeatum*, поряд з  $\alpha$ -L-рамнозидазною, проявляє лише  $\beta$ -D-глюкозидазну активність, а також ефективно гідролізує нарингін і неогесперидин. Отже, цей продуцент  $\alpha$ -L-рамнозидази може бути використаний для подальших досліджень з метою його застосування в різних біотехнологічних процесах.

**Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец, И.Н. Курченко, Л.Т. Наконечная**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

#### **СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗ СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PENICILLIUM***

##### **Резюме**

Целью работы было исследовать  $\alpha$ -L-рамнозидазу [КФ 3.2.1.40] – фермент, который гидролитически отщепляет концевые невосстановленные  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6- связанные остатки L-рамнозы.

В результате скрининга, проведенного среди 30 штаммов микромицетов, установлено, что в супернатанте культуральных жидкостей разных видов *Penicillium*: *P. tardum* 60, 39, 2929, 2962, 2963, 2964, 2965, 2966; *P. rugulosum* 2778, 1652, 2766, 425; *P. restrictum* 2756; *P. aculeatum* 202, 217, 329, 2973, 2974, 2975, 2976, 2977, 2979 выявлено  $\alpha$ -L-рамнозидазную активность, которая составляла от 0,07 до 0,53 ед/мг белка. Наиболее активным оказался *P. aculeatum* 202. Из супернатанта культуральной жидкости данного микромицета осаждением сульфатом аммония (90 % насыщения) получено комплексный энзимный препарат и изучены некоторые физико-химические свойства. Показано, что энзим имеет рН оптимум 3,0, а термооптимум – 60 °С. Установлено, что исследуемый препарат  $\alpha$ -L-рамнозидазы *P. aculeatum* 202 был стабильным в диапазоне рН от 2,0 до 4,0 в течение 90 мин. При значении рН 5,0 активность комплексного энзимного препарата несколько уменьшалась и составля-



ла до 40 % от исходной. При оптимальном значении pH 3,0 и температуре 15 °C, исследованная  $\alpha$ -L-рамнозидаза была стабильной в течение трех суток. Наряду с  $\alpha$ -L-рамнозидазой, препарат *P. aculeatum* 202 проявляет только  $\beta$ -D-глюкозидазную активность.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Penicillium aculeatum* 202,  $\alpha$ -L-рамнозидаза, микромицеты, физико-химические свойства, спектр гликозидазных активностей.

***E.V. Gudzenko, L.D. Varbanets, I.M. Kurchenko, L.T. Naconechnaya***

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

## **SCREENING OF THE PRODUCENTS OF $\alpha$ -L-RHAMNOSIDASES AMONGST REPRESENTATIVES OF *PENICILLIUM***

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

The aim of this work was to study  $\alpha$ -L-rhamnosidase [КФ 3.2.1.40] – enzyme, which hydrolyse the terminal non-reduced  $\alpha$ -1.2-,  $\alpha$ -1.4- and  $\alpha$ -1.6-linked L-rhamnose.

As a result of screening conducted among 30 strains of micromycetes ability to synthesize  $\alpha$ -L-rhamnosidase revealed in *Penicillium tardum* 60, 39, 2929, 2962, 2963, 2964, 2965, 2966, *P. rugulosum* 2778, 1652, 2766, *P. restrictum* 425, 2756, *P. aculeatum* 202, 217, 329, 2973, 2974, 2975, 2976, 2977, 2979 activity, which ranged from 0.07 to 0.53 OD/mg protein. The most active is brought out *P. aculeatum* 202. From culture supernatant of this micromycete by fractionation with ammonium sulfate (90 % saturation) complex enzyme preparation was obtained and its physico-chemical properties were studied. It was shown that enzyme has pH optimum 3.0, thermo optimum – 60 °C and displayed stability in pH values from 2.0 to 4.0 during 90 min. At pH 5.0 the activity of complex enzyme preparation insignificantly decreased and appears to be up 40 % from initial one. At optimal pH value 3.0 and temperature 15 °C  $\alpha$ -L-rhamnosidase tested was stable during 3 days. In addition to  $\alpha$ -L-rhamnosidase enzyme preparation of *P. aculeatum* 202 exerted also  $\beta$ -D-glucosidase activity.

К е у w o r d s : *Penicillium aculeatum* 202,  $\alpha$ -L-rhamnosidase, micromycetes, physical and chemical properties, substrate specificity.

1. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010. – 437 с.
2. Гудзенко О.В., Варбанець Л.Д. Мікробні  $\alpha$ -L-рамнозидази: продуценти, властивості, практичне використання // Біотехнол. – 2012. – 5, № 6. – С. 9–26.
3. Гудзенко Е.В., Варбанець Л.Д. Очистка и физико-химические свойства  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Eurpenicillium erubescens* // Мікробіол. журн. – 2012. – 74, № 2. – С. 14–21.
4. Гудзенко Е.В., Варбанець Л.Д. Очистка и физико-химические свойства  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Cryptococcus albidus* // Мікробіол. журн. – 2012. – 74, № 6. – С. 16–23.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 325 с.
6. Рзаева О.М.  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Penicillium commune* 266: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: 03.00.07. / Рзаева Ольга Миколаївна; Інститут мі-

- кробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. – К.: [б. в.], 2007. – 21 с.
7. *Davis D.W.* Determination of flavonones in citrus juice // *Anal. Biochemistry*. – 1947. – **19**, N 1. – P. 46–48.
  8. *Gerstorfenova D., Fliedrova B., Halada P. et al.* Recombinant  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin // *Process Biochemistry*. – 2012. – **47**, N 5. – P. 828–835.
  9. *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.
  10. *Manzanares P., Orejas M., Gil J. V. et al.* Construction of a Genetically Modified Wine Yasts Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus rhaA* Gene, Encoding and  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of Enological Interest // *Appl. Envir. Microbiol.* – 2003. – **69**, N 12. – P. 7558–7562.
  11. *Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M.*  $\alpha$ -L-rhamnosidase: old and new insights // *Industrial Enzymes*, Springer. – 2007. – P. 117–140.
  12. *Puri M.* Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – **93**, N 1. – P. 49–60.
  13. *Romero C., Manjon A., Bastida J.* A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase // *Anal. Biochem.* – 1985. – **149**, N 2. – P. 566–571.
  14. *Tamayo-Ramos J., Flipphi M., Pardo E. et al.* L-Rhamnose induction of *Aspergillus nidulans*  $\alpha$ -L-rhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA-independent mechanism acting at the level of inducer uptake // *Microbial. Cell. Factories*. – 2012. – **11**. – P. 11–26.
  15. *Yadav V., Yadav P.K., Yadav S., Yadav K.D.S.*  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: A review // *Process Biochemistry*. – 2010. – **45**, N 8. – P. 1226–1235.
  16. *Yadav V., Yadav K.D.S.* New fungal for  $\alpha$ -L-rhamnosidase an important enzyme used in the synthesis of drugs and drug precursors // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2010. – **48**, N 3. – P. 295–301.
  17. *Yadav S., Yadav R.S.S., Yadav K.D.S.*  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Aspergillus awamori* MTCC-2879 and its role in debittering of orange juice // *Int. J. Food Science & Technol.* – 2013. – **48**, N 5. – P. 927–923.

Отримано 07.09.2015