

## **β-МАННАНАЗНАЯ И α-ГАЛАКТОЗИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ**

**Н.В. Борзова, О.С. Броварская, Л.Д. Варбанец,  
Л.Т. Наконечная, И.Н. Курченко**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного 154, Киев, 03143, Украина  
e-mail: nv\_borzova@bigmir.net*

**Цель работы** — изучить маннан-деградирующую активность свежесыведенных культур микромицетов. **Методы.** Идентификацию культур проводили по комплексу культуральных и морфологических признаков. β-Маннаназную активность определяли динитросалициловым методом, для определения других гликозидазных активностей использовали синтетические нитрофенильные субстраты. **Результаты.** Из растительных субстратов и тел пчел были выделены 9 штаммов микромицетов. В результате идентификации культуры были отнесены к видам *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl (3 штамма), *Penicillium cyclospium* Westling (2 штамма), *Aspergillus* sp. (1 штамм), *Penicillium expansum* Lk (3 штамма). Впервые показана β-маннаназная и α-галактозидазная активность у представителей видов *R. oryzae*, *P. cyclospium*, *P. expansum*. Установлено, что галактоманнан гуара (0,5 %) обеспечивает высокие показатели β-маннаназной (1,5 – 8,5 ед./мл) и α-галактозидазной (1,1 – 2,4 ед./мл) активности в культуральной жидкости изученных микромицетов. Наилучшими источниками азота для роста культур и синтеза энзимов были пептон, дрожжевой автолизат и сульфат аммония (в концентрации 5,0; 1,0 и 1,0 г/л соответственно). Максимальная маннан-деградирующая активность микромицетов наблюдалась при 25 °С на 5 сутки культивирования. **Выводы.** Выделены новые штаммы с высокой β-маннаназной и α-галактозидазной активностью, перспективные для использования в биотехнологических процессах деградации растительного сырья с высоким содержанием маннанов.

*Ключевые слова:* *Rhizopus oryzae*, *Penicillium cyclospium*, *Penicillium expansum*, β-маннаназная активность, α-галактозидазная активность, галактоманнан гуара.

Широко известным фактом на сегодняшний день является способность микроорганизмов деградировать самые разнообразные природные и синтетические субстраты. Для обеспечения своих физиологических потребностей ими выделяется в окружающую среду огромное количество метаболитов, в том числе и энзимов. Благодаря этим их свойствам, а также относительной простоте культивирования и контролируемым условиям биосинтеза микроорганизмы уже долгие годы остаются наиболее используемыми источниками для широкомасштабного получения энзимов.

Интересной и перспективной для биотехнологического производства группой энзимов являются гликозидазы, гидролизующие полимерные субстраты. К ним относятся и маннан-деградирующие энзимы, способные гидролизовать гемицеллюлозы различного происхождения, маннаны водорослей и бобовых, являющиеся структурными и запасными полисахаридами растений [1, 2]. В связи с этим они находят свое применение в

различных перерабатывающих технологиях: производстве кофе, сахара и масел, улучшении качества продуктов питания и кормов для животных, в процессах переработки древесины и отбеливания бумаги [3-5].

К группе маннан-деградирующих энзимов относят эндо- $\beta$ -маннаназу (КФ 3.2.1.78), гидролизующую основную цепь маннанов, экзо- $\beta$ -маннозидазу (КФ 3.2.1.25), отщепляющую концевые остатки маннозы с невозстановливающего конца,  $\alpha$ -галактозидазу (КФ 3.2.1.22) и  $\beta$ -глюкозидазу (КФ 3.2.1.21), атакующие маннан в разных точках и обеспечивающие полную деградацию галакто- и глюкоманнанов. Присутствие в среде нескольких энзимов, участвующих в деградации маннана, может сопровождаться как увеличением скорости гидролиза субстрата в результате синергизма действия энзимов различной специфичности, так и характеризоваться снижением способности деградировать субстрат из-за эффекта конкуренции [6-8].

Микроорганизмы не часто характеризуются высокими уровнями активности нескольких энзимов, атакующих один субстрат. Некоторые авторы связывают это с антисинергизмом действия [9]. Чаще в экосистеме для деградации сложных субстратов объединяются энзиматические системы различных микроорганизмов, таким образом обеспечивая питанием и энергией все элементы экосистемы.

Различные микроорганизмы, такие как микромицеты, дрожжи и бактерии, продуцируют в окружающую среду энзимы маннан-деградирующего комплекса с различной специфичностью по отношению к структуре полисахарида и к типу расщепляемой связи [1-3]. Микромицеты, как правило, выгодно отличаются от других микроорганизмов спектром и вариабельностью экскретируемых метаболитов. Что касается энзимов, деградирующих различные гемицеллюлозы и маннаны, их высокая активность была показана для представителей многих родов грибов, в том числе *Penicillium* и *Aspergillus* [10-15].

Представленная работа посвящена изучению спектра гликозидазных активностей микромицетов, выделенных из различных субстратов, их видовой идентификации, а также исследованию влияния некоторых параметров культивирования на маннан-деградирующую активность грибов.

**Материалы и методы.** Смешанные культуры микромицетов были получены нами с деревянных поверхностей погреба, веника, из кожицы баклажана и картофеля (г. Нежин, Черниговская обл.), из тел погибших пчел (г. Киев). Также объектом исследования были штаммы *Penicillium citreonigrum* Dierckx, *Penicillium expansum* Lk, *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling и *Penicillium viridicatum* Westling из коллекции культур отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, выделенные из почвы (Киевская обл.).

Колонии чистых культур грибов были выделены путем посева на чашки с картофельно-глюкозным агаром и средой Чапека согласно методам экспериментальной микологии. Идентификацию микромицетов проводили на основании морфологических и культуральных характеристик [16, 17].

Культивирование накопительных культур микромицетов проводили на жидкой среде Чапека (в качестве источника углерода использовали 5 г гуаровой камеди) в глубинных условиях в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл питательной среды, при 20 °С и скорости вращения качалки 257 об/мин на протяжении 7 дней. По окончании культивирования биомассу отделяли фильтрованием, в супернатанте определяли энзиматические активности.

Для исследования влияния различных источников азота и углерода на маннан-деградирующую активность микромицетов использовали среду следующего состава (в г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,6;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,75;  $\text{CaCl}_2$  – 0,3 г/л; рН 5,0. В качестве источников углерода использовали галактоманнан гуара – 0,5 %, мальтозу, рамнозу, маннозу, галактозу – 1 %. В качестве источников азота использовали мочевины,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , дрожжевой автолизат в концентрации 1,0 г/л, а также пептон – 5,0 г/л. Культивирование проводили в глубинных условиях в колбах Эрленмейера на качалке (скорость вращения 241 об/мин, 100 мл среды, уровень аэрации 16,76 мг  $\text{O}_2$ /л х ч) при 25 °С в течение 7 суток. Засев питательной среды проводили 5 % (v/v) двухсуточным инокулюмом.

Определение оптимальной температуры культивирования для проявления  $\beta$ -маннаназной активности проводили в глубинных условиях на среде, адаптированной по источникам азота и углерода (галактоманнан – 5 г/л, пептон – 5 г/л), выращивание проводили при 15, 20, 25 и 30 °С. Влияние начального значения рН среды на энзиматическую активность культуры исследовали в диапазоне 4,0 – 7,0 при температуре 25 °С.

$\beta$ -Маннаназную активность оценивали по количеству образовавшейся в результате гидролиза субстрата маннозы, которое определяли динитросалициловым методом, в качестве субстрата использовали галактоманнан гуара [18]. Реакционную смесь, содержащую 0,5 мл культуральной жидкости (КЖ) и 0,5 мл 1 % галактоманнана в 0,1 М фосфатно-цитратном буфере рН 5,2, инкубировали 20 мин при 37 °С, затем добавляли 1 мл динитросалицилового реактива и кипятили 10 мин. Окраску оценивали спектрофотометрически при 540 нм. В качестве стандарта использовали маннозу. За единицу активности принимали такое количество энзима, которое способствует образованию 1 мкмоль маннозы за 1 мин в условиях опыта.

Исследование гликозидазных активностей культур проводили при помощи синтетических нитрофенильных субстратов: *n*-нитрофенил- $\alpha$ -L-рамнопиранозид, *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкопиранозид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-галактопиранозид; *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкозаминид; *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-галактозаминид; *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкуроид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-ксилопиранозид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-маннопиранозид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-фукопиранозид (“Sigma-Aldrich”, США) [19]. За единицу активности энзимов принимали такое их количество, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин в условиях опыта.

Протеолитическую активность определяли методом Ансона в модификации Петровой [20].

Концентрацию протеина в супернатанте культуральной жидкости определяли методом Лоури [21].

Все эксперименты проводили не менее чем в 3–5 повторностях. Статистическую обработку результатов экспериментальных серий осуществляли стандартными методами с использованием t-критерия Стьюдента при 5 % уровне значимости.

**Результаты.** Исследование энзиматической активности культурального фильтрата накопительных культур микромицетов, выделенных с деревянных поверхностей погреба и овощей, показало наличие у них  $\beta$ -маннаназной и  $\alpha$ -галактозидазной активности (рис. 1). Отмечено (рис. 2), что максимумы  $\beta$ -маннаназной и  $\alpha$ -галактозидазной активности не совпадают по времени.

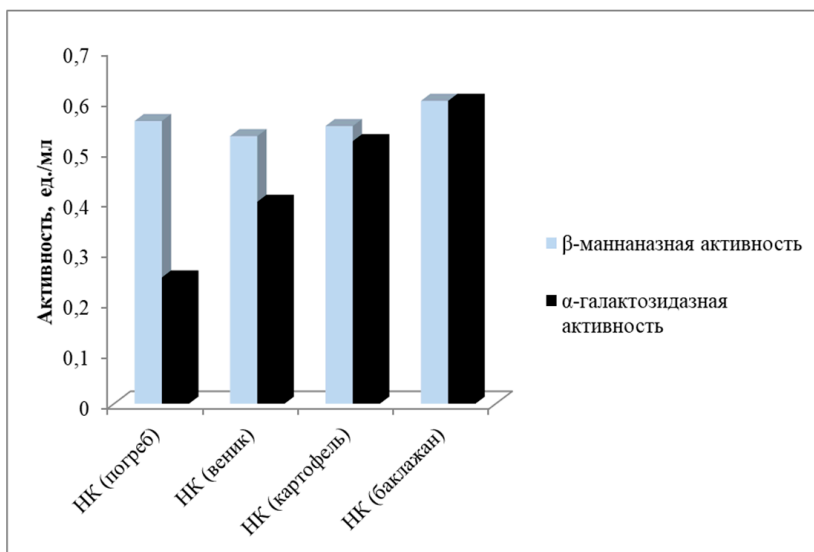


Рис.1. Энзиматическая активность накопительных культур (НК) микромицетов (20 °С)

Из смешанных популяций путем рассева на чашках были выделены чистые культуры микромицетов. В результате оценки уровня их  $\beta$ -маннаназной и  $\alpha$ -галактозидазной активности в супернатанте культуральной жидкости были отобраны наиболее активные штаммы и проведена их идентификация на основании морфолого-культуральных и физиологических признаков (данные не приводятся). Активные штаммы, выделенные с поверхности деревянных субстратов и овощей, были отнесены к видам *Rhizopus oryzae* (3 штамма), *Penicillium cyclopium* (2 штамма) и *Aspergillus* sp. (1штамм), штаммы, выделенные из погибших пчел – к виду *Penicillium expansum* (3 штамма).

Был изучен спектр гликозидазных активностей свежевыделенных штаммов микромицетов и 4 штаммов из коллекции живых культур, относящихся к видам *P. citreonigrum*, *P. expansum*, *P. glubrum* и *P. viridicatum*. Отмечено, что все свежевыделенные штаммы отличались более широким спектром и более высокими показателями изученных гликозидазных активностей (рис. 3).  $\beta$ -Маннаназная активность в супернатанте культуральной жидкости чистых культур микромицетов была несколько ниже

(от 0,29 – до 0,8 ед./мл), чем при выращивании смешанной культуры в тех же условиях. Причин может быть несколько. Во-первых, высокая активность смешанной культуры могла быть связана с синергизмом действия энзимов разных микроорганизмов, во-вторых, при определении активности мы получали результаты суммарной активности энзимов, в-третьих, нам не удалось выделить в чистом виде наиболее активную культуру. При этом  $\alpha$ -галактозидазная активность штамма *P. cyclopium* 5, наоборот, превосходила исходную активность почти в 4 раза и составляла 2,4 ед./мл. Все свежевыделенные культуры проявляли протеолитическую активность, хотя ее уровень был невысок (0,02-0,19 ед./мл).

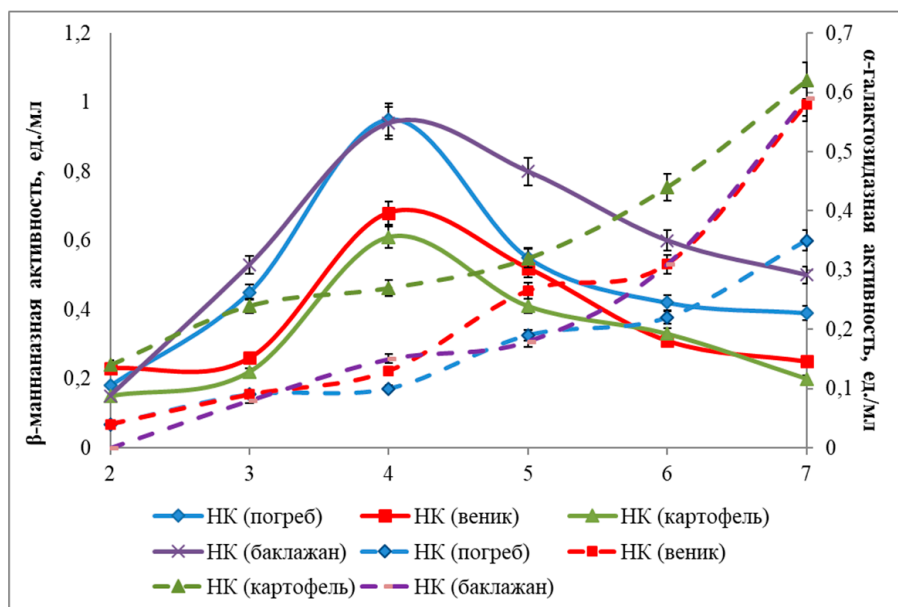


Рис. 2.  $\beta$ -Маннаназная (сплошная линия) и  $\alpha$ -галактозидазная (пунктирная линия) активность в культуральной жидкости НК микромицетов в зависимости от времени выращивания (25 °С)

Было исследовано влияние некоторых источников питания на рост и активность отобранных культур микромицетов. Показано, что все изученные углеводы обеспечивали активный рост культур грибов (содержание протеина в супернатанте колебалось от 0,95 до 1,62 мг/мл), однако только использование галактоманна гуара в одинаковой степени обеспечивало высокие показатели внеклеточной  $\alpha$ -галактозидазной и  $\beta$ -маннаназной активности культур *R. oryzae* 2, 3 и *P. cyclopium* 5 (Рис. 4).

Потребности культур микромицетов в источниках азота были менее избирательны. Высокую активность маннан-деградирующих энзимов обеспечивало использование сульфата аммония, пептона и дрожжевого автолизата. Варьирование источников азота позволяет изменять соотношение и уровень  $\beta$ -маннаназной и  $\alpha$ -галактозидазной активности в культуральной жидкости продуцента. Так, при использовании дрожжевого автолизата можно получать максимальную активность  $\alpha$ -галактозидазы при незначительной  $\beta$ -маннаназной активности у культуры *P. cyclopium*

5 и *R. oryzae* 3. А при использовании пептона и сульфата аммония для *R. oryzae* 2, наоборот, наблюдается снижение  $\alpha$ -галактозидазной активности при высоких уровнях  $\beta$ -маннаназной активности.

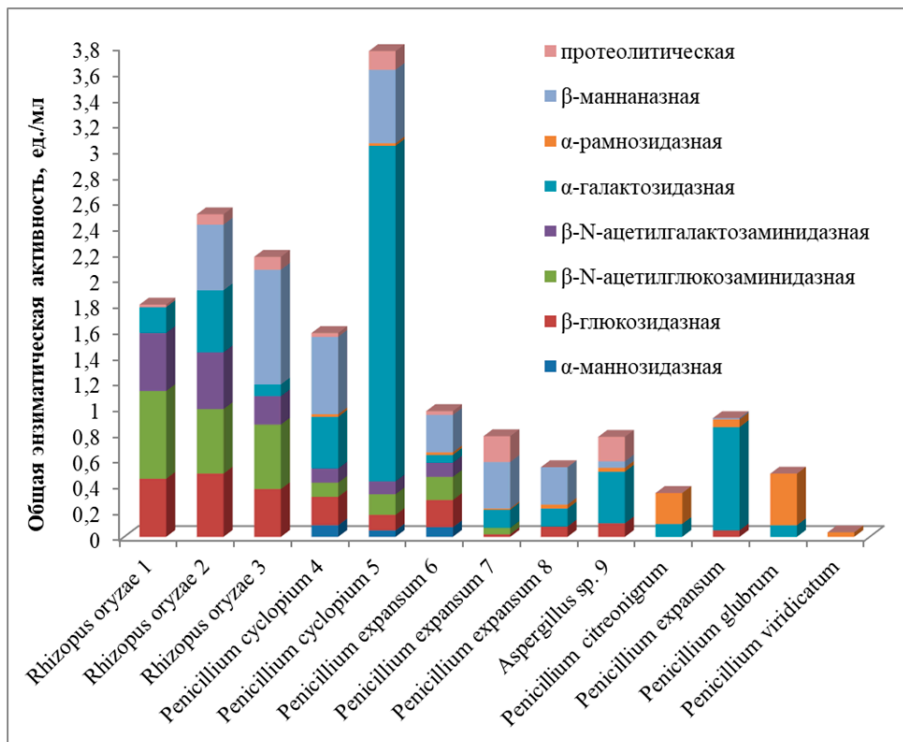


Рис. 3. Спектр энзиматической активности микромицетов при глубинном культивировании (источник углерода – галактоманнан гуара)

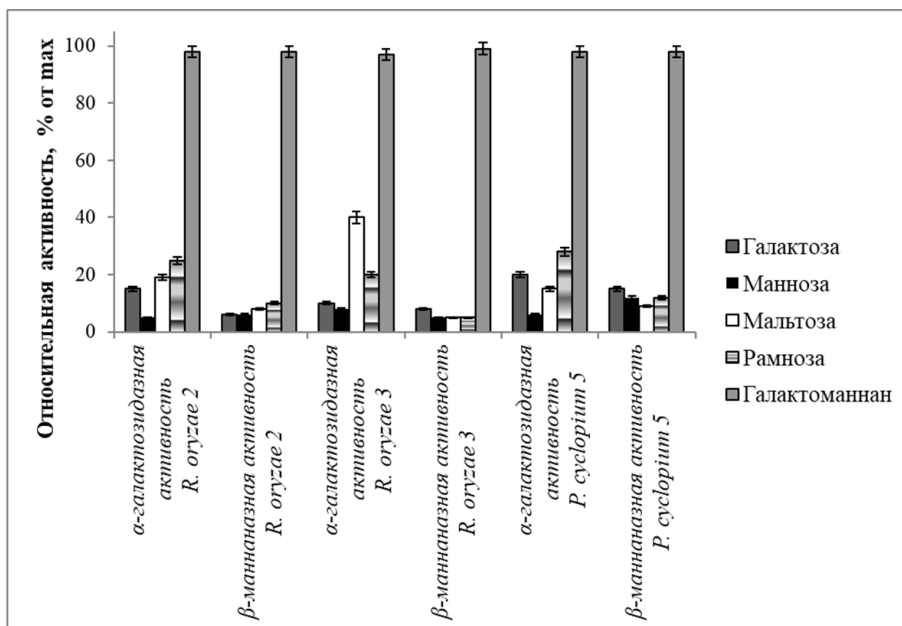


Рис. 4. Влияние различных источников углерода на энзиматическую активность культур микромицетов

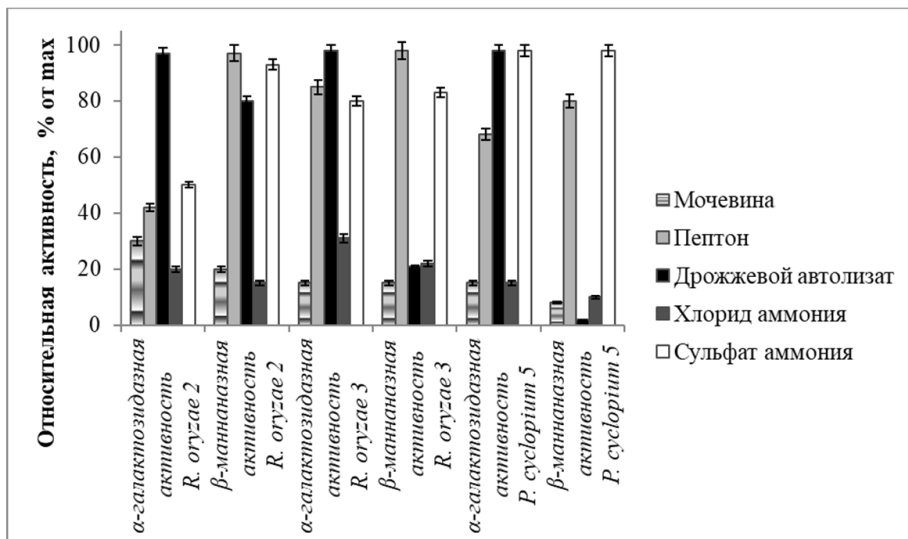


Рис. 5. Влияние различных источников азота на энзиматическую активность культур микромицетов

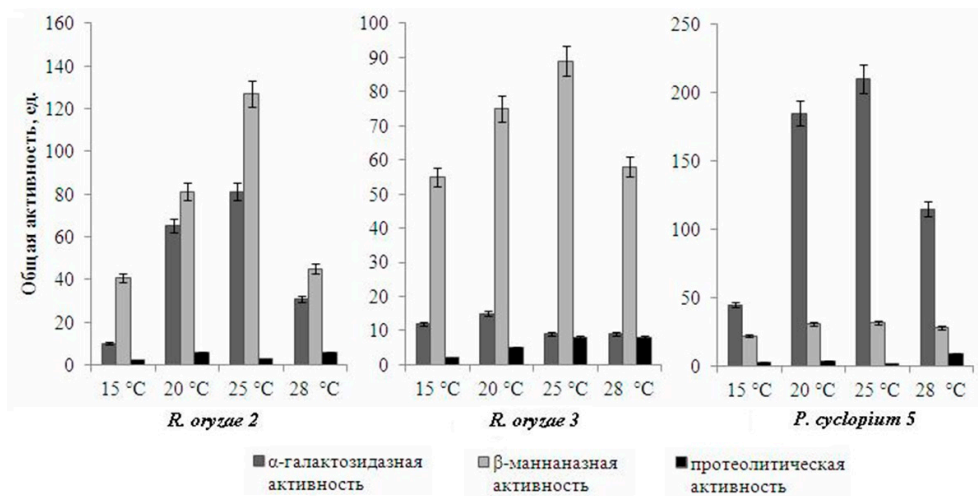


Рис. 6. Влияние температуры выращивания на энзиматическую активность *R. oryzae 2*, *R. oryzae 3* (96 ч культивирования) и *P. cyclospium 5* (120 ч культивирования)

Были изучены некоторые параметры культивирования штаммов микромицетов *R. oryzae 2, 3*, выделенных из погреха и баклажана соответственно, и *P. cyclospium 5*, выделенного из баклажана. Показано, что оптимальной для синтеза энзимов была температура 25 °C (рис. 6). Исходное значение pH питательной среды в диапазоне 4,5 – 6,0 не оказывало статистически достоверного влияния на энзиматическую активность всех трех культур. В процессе культивирования отмечали снижение pH среды до 4,0 – 5,0 на 5–7 сутки. Также надо отметить, что максимумы  $\alpha$ -галактозидазной и  $\beta$ -маннаназной активностей чистых культур приходились на 4-е сутки культивирования для *R. oryzae 2* и 3, на 5-е — для

*P. cyclopium* 5. Протеолитическая активность всех трех культур в условиях эксперимента была невысокой.

В результате подбора источников питания и условий культивирования  $\beta$ -маннаназная и  $\alpha$ -галактозидазная активности отобранных штаммов составили: для *R. oryzae* 2 — 2,5 и 1,4 ед./мл; *R. oryzae* 3 — 8,5 и 1,1 ед./мл; для *P. cyclopium* 5 — 1,5 и 2,4 ед./мл соответственно.

**Обсуждение.** Использование энзимов различной специфичности позволяет оптимизировать многие процессы переработки сырья и значительно увеличить выход целевого продукта. Маннан-деградирующие системы микроорганизмов, участвующие в разложении сложных растительных субстратов, представляют большой практический интерес для современных производств [1-5, 8, 14]. Высокий биотехнологический потенциал микроорганизмов объясняет интерес исследователей к поиску новых высокопродуктивных бактерий и грибов с  $\beta$ -маннаназной и (или)  $\alpha$ -галактозидазной активностью. Кроме того, изучение функционирования микробных энзиматических систем имеет и безусловный научный интерес.

Первоначально нами была обнаружена высокая  $\alpha$ -галактозидазная активность и способность гидролизовать галактоманнан гуара у накопительных свежeweделенных культур микромицетов. Впоследствии из них были выделены наиболее активные чистые грибные культуры, которые на основании морфологических характеристик были отнесены к видам *R. oryzae*, *P. cyclopium* и *P. expansum*. Для всех трех видов впервые была показана как  $\beta$ -маннаназная, так и  $\alpha$ -галактозидазная активности, однако в литературе описано множество активных продуцентов других видов микромицетов *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus usamii*, *Bispora sp.*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium freii*, *Penicillium pinophilum*, *Bispora sp.* [5, 7, 10-15, 22]. Исследование спектра гликозидазных активностей позволило выделить несколько штаммов с высокой маннан-деградирующей активностью (*R. oryzae* 2, 3 и *P. cyclopium* 5), штаммы, выделенные из тел мертвых пчел, были менее активными, хотя также характеризовались наличием  $\beta$ -маннаназной и  $\alpha$ -галактозидазной активностью. Несмотря на высокую скорость гидролиза галактоманнана у трех штаммов, следует отметить, что соотношение  $\beta$ -маннаназной и  $\alpha$ -галактозидазной активности в каждом случае различалось (для *R. oryzae* 2 — 12:8; *R. oryzae* 3 — 9:1; *P. cyclopium* 5 — 1:7 соответственно). Учитывая наши данные по влиянию источников питания на проявление культурой той или иной активности, можно предложить стратегию получения преимущественно того или другого энзима из культуральной жидкости продуцентов путем варьирования условий культивирования. Также интересным представляется в будущем исследовать общую маннан-деградирующую активность культур в зависимости от соотношения различных энзимов, поскольку, как показано на примере маннаназа из *Clostridium cellulovorans* и *Aspergillus niger*, этот фактор может иметь решающее значение для степени деструкции сырья [9]. Для энзимов из этих продуцентов было показано, что использование 75 %  $\beta$ -маннаназы и 25 %  $\alpha$ -галактозидазы (по активности и протеину) позволяло достичь максимальных показателей выхода моносахаридов при гидролизе галактоманнана гуара. В литературе есть данные о том, что



комплексы энзимов, атакующих один субстрат, могут находиться в состоянии конкурентного взаимодействия (синергизма и антисинергизма) [6, 7]. Часто присутствие  $\beta$ -маннаназ и  $\beta$ -маннозидаз сопровождается эффектом антисинергизма вследствие конкуренции энзимов за точки связывания на основной цепи маннана [6]. Вклад  $\alpha$ -галактозидаз в деструкцию галактоманнанов и галактоглокоманнанов во многом зависит от специфичности действия энзима, поскольку  $\alpha$ -галактозидазы из разных источников и относящиеся к различным семействам могут отличаться степенью сродства к субстрату и способностью расщеплять  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -1,4- или  $\alpha$ -1,6-связи между терминальной галактозой и полисахаридной цепью [6, 7, 22, 23]. Таким образом, в зависимости от специфичности действия  $\alpha$ -галактозидаза может способствовать ускорению или замедлению деструкции субстрата. Понимание механизмов взаимодействия различных энзимов, участвующих в гидролизе маннанов, позволит оптимизировать процессы разложения сложных природных субстратов и повысить выход углеводов. Также все отобранные культуры проявляли протеолитическую,  $\beta$ -глюкозидазную и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазную активности. Данные активности в случае использования энзимных препаратов грубой очистки могут быть весьма полезными при обработке кормов для животных и сырья, богатого гемицеллюлозами.

Внеклеточная маннан-деградирующая активность трех культур микроорганизмов достигала максимума в позднюю стационарную фазу роста при температуре 20-25 °С. Галактоманнан гуара (0,5 %) в качестве источника углерода удовлетворял как физиологические потребности изученных штаммов, так и обеспечивал высокие показатели активности маннан-деградирующих энзимов. Наилучшими источниками азота были сульфат аммония, пептон и дрожжевой автолизат.

Таким образом, нами выделены новые штаммы микроорганизмов *R. oryzae* и *P. cyclopium* с высокой  $\beta$ -маннаназной и  $\alpha$ -галактозидазной активностью. Высокая энзиматическая активность изученных культур позволяет рассматривать их в качестве потенциальных продуцентов маннаназ для использования в биотехнологических процессах переработки растительного сырья в различных областях: бумажной, пищевой, кормовой промышленности, производстве биотоплива.

## **$\beta$ -МАННАЗНА Й $\alpha$ -ГАЛАКТОЗИДАЗНА АКТИВНІСТЬ МІКРОМІЦЕТІВ**

***Н.В. Борзова, О.С. Броварська, Л.Д. Варбанець,  
Л.Т. Наконечна, І.М. Курченко***

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

### **Резюме**

**Мета роботи** – дослідити маннан-деградувальну активність свіжовиділених культур мікроміцетів. **Методи.** Ідентифікацію культур проводили за комплексом культуральних та морфологічних ознак.  $\beta$ -Маннаназну активність визначали динітросаліциловим методом, для визначення інших глікозидазних активностей використовували

синтетичні нітрофенільні субстрати. **Результати.** Були виділені з рослинних субстратів та тіл бджіл 9 штамів мікроміцетів. В результаті ідентифікації культури були віднесені до видів *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. (3 штами), *Penicillium cyclopium* Westling (2 штами), *Aspergillus* sp. (1штам), *Penicillium expansum* Lk (3 штами). Вперше показана  $\beta$ -мананазна й  $\alpha$ -галактозидазна активність у представників видів *R. oryzae*, *P. cyclopium*, *P. expansum*. Показано, що галактоманан гуару (0,5 %) забезпечує високі показники  $\beta$ -мананазної (1,5 – 8,5 од./мл) та  $\alpha$ -галактозидазної (1,1 – 2,4 од./мл) активності в культуральній рідині досліджених мікроміцетів. Найкращими джерелами азоту для росту культур та синтезу ензимів були пептон, дріжджовий автолізат та сульфат амонію (у концентрації 5,0; 1,0 і 1,0 г/л відповідно). Максимальна манан-деградувальна активність мікроміцетів спостерігалася за 25°C на 5 добу культивування. **Висновки.** Виділені нові штами з високою  $\beta$ -мананазною та  $\alpha$ -галактозидазною активністю, перспективні для використання у біотехнологічних процесах деградації рослинної сировини з високим вмістом мананів.

*Ключові слова:* *Rhizopus oryzae*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*,  $\beta$ -мананазна активність,  $\alpha$ -галактозидазна активність, галактоманан гуару.

## **$\beta$ -MANNANASE AND $\alpha$ -GALACTOSIDASE ACTIVITY OF MICROMYCETES**

*N.V. Borzova, O.S. Brovanskaya, L.D. Varbanets,  
L.T. Nakonechna, I.N. Kurchenko*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

### Summary

**The aim** of research was to study the mannan-degrading activity of isolated micromycete cultures. **Methods.** The identification of cultures was carried out on a complex of cultural and morphological characteristics.  $\beta$ -Mannanase activity was determined by the dinitrosalicylic method, synthetic nitrophenyl substrates were used to assay other glycosidase activities. **Results.** From the plant substrates and bodies of bees nine strains of micromycetes were isolated. As a result the identification of the culture was attributed to the species *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. (3 strains), *Penicillium cyclopium* Westling (2 strains), *Aspergillus* sp. (1 strain), *Penicillium expansum* Lk (3 strains). For the first time  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase activity have been demonstrated in representatives of the species *R. oryzae*, *P. cyclopium*, *P. expansum*. It was found that galactomannan guar (0.5 %) provides high  $\beta$ -mannanase (1.5 – 8.5 U/ml) and  $\alpha$ -galactosidase (1.1 – 2.4 U/ml) activity in the culture fluid of the micromycetes. The best sources of nitrogen for culture growth and enzyme synthesis were peptone, yeast autolysate and ammonium sulfate (at a concentration of 5.0, 1.0, and 1.0 g/l respectively). The maximum mannan-degrading activity of micromycetes was observed at 25 °C on the 5th day of cultivation. **Conclusions.** New strains with high  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase activity were obtained, promising for use in biotechnological processes of degradation of plant raw materials with a high content of mannans.

*Keywords:* *Rhizopus oryzae*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*,  $\beta$ -mannanase activity,  $\alpha$ -galactosidase activity, guar galactomannan.

1. Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2007; 27(4):197–216.
2. Srivastava PK, Kapoor M. Production, properties, and applications of endo- $\beta$ -mannanases. *Biotechnol Adv.* 2017; 35(1):1–19.
3. Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N. Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(5):1817–1830.
4. You S, Ding J, Dai Y, Xing R, Qi W, Wang M, Su R, He Z. A simply enzymatic hydrolysis pretreatment for  $\beta$ -mannanase production from konjac powder. *Bioresour Technol.* 2018; 249:1052–1057.
5. Cai H, Shi P, Luo H, Bai Y, Huang H, Yang P, Yao B. Acidic  $\beta$ -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. *J Biosci Bioeng.* 2011; 112(6):551–557.
6. Malgas S, van Dyk JS, Pletschke BI. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015; 31(8):1167–1175.
7. Wang H, Luo H, Li J, Bai Y, Huang H, Shi P, Fan Y, Yao B. An alpha-galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with beta-mannanase. *Bioresour Technol.* 2010; 101(21):8376–8382.
8. Várnai A, Huikko L, Pere J, Siika-aho M, Viikari LA. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresource technology.* 2011; 102(19):9096–9104.
9. Malgas S, van Dyk SJ, Pletschke BI.  $\beta$ -Mannanase (Man26A) and  $\alpha$ -galactosidase (Aga27A) synergism — a key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates. *Enzyme Microb Technol.* 2015; 70:1–8.
10. Liao H, Li S, Zheng H, Wei Z, Liu D, Raza W, Shen Q, Xu Y. A new acidophilic thermostable endo-1,4- $\beta$ -mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2: cloning, characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol.* 2014; 14:90.
11. Sakai K, Mochizuki M, Yamada M, Shinzawa Y, Minezawa M, Kimoto S, Murata S, Kaneko Y, Ishihara S, Jindou S, Kobayashi T, Kato M, Shimizu M. Biochemical characterization of thermostable  $\beta$ -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017; 101(8):3237–3245.
12. Li J, Wang C, Hu D, Yuan F, Li X, Tang S, Wu M. Engineering a family 27 carbohydrate-binding module into an *Aspergillus usamii*  $\beta$ -mannanase to perfect its enzymatic properties. *J Biosci Bioeng.* 2017; 123(3):294–299.
13. Shimizu M, Kaneko Y, Ishihara S, Mochizuki M, Sakai K, Yamada M, Murata S, Itoh E, Yamamoto T, Sugimura Y, Hirano T, Takaya N, Kobayashi T, Kato M. Novel  $\beta$ -1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.* 2015; 290(46):27914–27927.
14. Cameron H, Champion SH, Singh T, Vaidya AA. Improved saccharification of steam-exploded *Pinus radiata* on supplementing crude extract of *Penicillium* sp. *3 Biotech.* 2015; 5(2):221–225.
15. Wang Y, Shi P, Luo H, Bai Y, Huang H, Yang P, Xiong H, Yao B. Cloning, over-expression and characterization of an alkali-tolerant endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Penicillium freii* F63. *J Biosci Bioeng.* 2012; 113(6):710–714.

16. Pitt JI. A laboratory guide to common *Penicillia* species. North Ryde, N.S.W:SCIRO Division of Food Processing, 1988. 187 p.
17. Domsch KH, Gams W, Anderson T. Compendium of soil fungi. 2nd. Ed. Eching:IHW-Verlag, 2007. 672 p.
18. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem. 1959; 31:426–428.
19. Chaplin ME, Kennedy JE. Carbohydrate analysis. Oxford: IRL Press, 1986. 228 p.
20. Petrova IS, Vintsyunayte MN. [Determination proteolytic activity enzyme preparations of microbial origin]. Prikl Biokhim Mikrobiol. 1966; 2(1):322–327. Russian.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(2):265–275.
22. Luonteri E, Tenkanen M, Viikari L. Substrate specificities of *Penicillium simplicissimum* alpha-galactosidases. Enzyme Microb Technol. 1998; 22(3):192–198.
23. Talbot G, Sygusch J. Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl Environ Microbiol. 1990; 56(11):3505–3510.

Отримано 04.07.2018