

## ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ АНТАРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

*Н. В. Борзова, Е. В. Гудзенко, Г. В. Гладка,  
Л. Д. Варбанец, А. Б. Таширев*

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

Уникальное биоразнообразие и биотехнологический потенциал микроорганизмов антарктического региона способствуют интенсивным поискам среди них продуцентов энзимов с новыми свойствами и широким диапазоном стабильности. **Целью работы** было изучить гликозидазную активность у 26 штаммов психротолерантных УФ-резистентных дрожжей, выделенных из почвенно-растительных ценозов Антарктики, и оценить их биотехнологический потенциал в качестве продуцентов энзимов. **Методы.** Культуры дрожжей выращивали глубинным способом при 15 – 42 °С в течение 5 суток. Энзиматические активности определяли в супернатанте культуральной жидкости. Для определения гликозидазных активностей использовали синтетические производные моносахаридов. Казеин и конго-рот эластин были использованы в качестве субстратов для определения протеолитической активности. **Результаты.** У антарктических дрожжей был изучен спектр из 12 гликозидазных активностей ( $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкозидазной,  $\beta$ -D-галактозидазной,  $\beta$ -D-глюкуронидазной,  $\alpha$ -L-фукозидазной,  $\alpha$ -L-рамнозидазной,  $\alpha$ -D-маннозидазной,  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-ксилозидазной,  $\alpha$ - и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазной,  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазной). Наиболее распространенными были  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазная и  $\beta$ -глюкозидазная активности (65 и 58 % штаммов соответственно). 4 штамма (бр1с, 2299, 31с и 4р5с2) проявляли высокую активность комплекса целлюлозодеградирующих энзимов. Штамм 5р5с1, выделенный из травы *Deshampcia antarctica*, проявлял высокую  $\beta$ -D-ксилозидазную активность (2,8 ед/мл). Штамм *Rhodotorula mucilaginosa* 33с характеризовался наличием спектра из десяти активностей, в том числе высокой  $\alpha$ -L-рамнозидазной активностью (0,62 ед/мл). **Вывод.** Дрожжевые психротолерантные культуры из фитоценозов Антарктики могут быть использованы для направленного поиска микробных гликозидаз с новыми свойствами и широким диапазоном активности.

*Ключевые слова:* гликозидазы, дрожжи, Антарктика,  $\alpha$ -L-рамнозидаза.

В последние годы наши знания о микроорганизмах арктического и антарктического регионов значительно обогатились. Появились работы посвященные ареалам распространения, биоразнообразию, свойствам экстремофильных наземных и водных грибов и бактерий [1, 2]. Активно исследуются механизмы адаптации таких микроорганизмов к низким температурам, высыханию и кристаллизации, к высокому содержанию солей, ионов тяжелых металлов и УФ-излучению [3, 4]. На сегодняшний день в Антарктике обнаружено множество видов психрофильных и психротолерантных дрожжей, преимущественно относящихся к *Ascomycota* и *Basidiomycota* [5]. Наиболее распространенными видами дрожжей, выделяемыми из почвы, воды и растений, являются *Candida glauca*, *Cryptococcus victoriae*, *Meyerozyma (Pichia) guillier-*

*mondii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. laryngis* [1 – 7], описаны ассоциированные с морскими беспозвоночными представители видов *Metschnikowia australis*, *Cystofilobasidium infirmominatum*, *Rhodotorula pinicola*, *Leucosporidiella creatinivora* [6, 8, 9]. Интерес к исследованиям биоразнообразия Антарктики и Субантарктики продиктован также высоким биотехнологическим потенциалом микроорганизмов, колонизирующих разнообразные экстремальные экониши. Среди дрожжевых штаммов, выделенных в Антарктике, описаны активные продуценты амилолитических, целлюлозолитических, протеолитических, лигнолитических энзимов, липаз, фитаз, лакказ, супероксиддисмутаза и др. [7, 8, 10]. Данная группа микроорганизмов представляется весьма привлекательной в качестве продуцентов биологически активных веществ. С одной стороны, они хорошо адаптированы к выживанию в условиях стресса, а с другой – продуцируемые ими энзимы обладают биотехнологическим преимуществом, связанным с высокой активностью при низких и умеренных температурах.

**Целью** данной работы было изучить гликозидазную активность штаммов антарктических дрожжей, выделенных из фитоценозов Антарктики, и оценить их биотехнологический потенциал в качестве продуцентов энзимов.

**Материалы и методы.** Объектами изучения были 26 штаммов дрожжей, выделенные из почвенно-растительных биоценозов низкотемпературного региона (Антарктика), которые были отобраны во время проведения сезонных биологических исследований на Украинской Антарктической станции «Академик Вернадский» в 2008 году. Штаммы хранятся в коллекции живых культур отдела биологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Список изученных штаммов приведен в таблице 1.

Культивирование дрожжей для исследования спектра гликозидазных и протеолитических активностей проводили на среде (1) следующего состава, г/л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,6;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,75;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5; дрожжевой автолизат – 0,15; мальтоза – 1,0; соевая мука – 20,0, pH 6,0.

Культивирование штаммов для изучения  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности проводили также на среде (2), г/л: жидкое сусло, разведенное в 2 раза, рамноза — 5,0; pH 6,5; и среде (3), г/л: мальтозный экстракт — 3,0, дрожжевой экстракт — 3,0; рамноза – 5,0; пептон – 5,0; pH 6,4. Среду 3 также использовали для исследования активности  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидазы,  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-ксилозидазы некоторых штаммов.

Для исследования ксилозидазной активности использовали среду (1) и среду (4), г/л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,6;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,75;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5; дрожжевой автолизат – 0,15; ксилоза – 5,0; pH 6,0.

Выращивание культур проводили глубинным способом на качалке со скоростью вращения 220 об/мин в течение 2 – 7 сут. Температура культивирования – 28 °C, для штамма *Rhodotorula mucilaginosa* 33с также использовался диапазон 15 – 42 °C. По окончании ферментации биомассу отделяли центрифугированием при 5000 g, 10 мин. В супернатанте культуральной жидкости определяли энзиматические активности.

## Штаммы дрожжей, изолированные из Западной Антарктики, 2008 г.

№ штамма Лаборат.	Вид	Пигментация колоний	Источник изоляции
209с1	н/и	Светло-бурые	о. Galindez, черные лишайники
2299	<i>Nadsoniella nigra</i> var. <i>hesuelica</i>	Черные	о. Galindez, черные лишайники
182с1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Красные	о. Galindez, черные накипные лишайники на скале
183с1	н/и	Бурые	о. Galindez, черные накипные лишайники на скале
183с2	н/и	Бурые	о. Galindez, черные накипные лишайники на скале
244с1	н/и	Розово-персиковые	о. King-George, лишайник
14с1	<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	Красные	о. Three little rig, лишайник
14с2	н/и	Красные	о. Three little rig, лишайник
15с	н/и	Розово-персиковые	о. Three little rig, лишайник
31с	н/и	Красные	о. Ljrrmann, лишайник
40p 1с2	н/и	Бурые	Лишайник
130с	<i>Tremella moriformis</i>	Бурые	о. Booth, лишайники на скале
237	<i>Exorhiala nigra</i>	Черные	м. Rasmussen, глинистая почва
33с3	н/и	Красные	о. Ljrrmann, почва под мхом
33с	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Красные	о. Ljrrmann, почва под мхом
36с	<i>Exorhiala nigra</i> .	Черные	о. Iqizag, каменист. почва (2007)
Кр5с	н/и	Розово-оранжевые	Херсонская обл., почва
48с3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Красные	о. Darboux. Мох на склоне скалы
48с4	н/и	Красные	о. Darboux. Мох на склоне скалы
6p1с	н/и	Белые	Мох
10p1с	н/и	Белые	Мох
11p5г1	<i>Leucosporidium scottii</i>	Белые.	Мох
11p5г2	<i>Debaromyces hansenii</i>	Ярко-белые.	Мох
4p5с2	н/и	Розовые	Трава <i>Deshampcia antarctica</i>
4p1с	н/и	н/п	Трава <i>Deshampcia antarctica</i>
5p5с1	н/и	Розовые	Трава <i>Deshampcia antarctica</i>

Примечание: н/и – неидентифицированные.

Определение активности гликозидаз изученных культур проводили при помощи синтетических нитрофенильных субстратов: *n*-нитрофенил- $\alpha$ -L-рамнопиранозид, *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкопиранозид; *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид; *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкозаминид; *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-галактозаминид; *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкуронид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-ксилопиранозид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-маннопиранозид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-фукопиранозид (“Sigma-Aldrich”, США) [11]. Реакционная смесь содержала 0,1 мл супернатанта культуральной жидкости, 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера (ФЦБ), pH 5,2, и 0,1 мл 2,5 мМ раствора субстрата в ФЦБ. Смесь инкубировали в течение 10 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Интенсивность окраски реакционной смеси измеряли на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 400 нм. За единицу активности энзимов принимали такое их количество, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин в условиях опыта.

Общую протеолитическую (казеинолитическую) активность определяли методом Ансона в модификации Петровой [12], эластазную – по расщеплению конго-рот эластина [13].

Концентрацию протеина в супернатанте культуральной жидкости определяли методом Лоури [14].

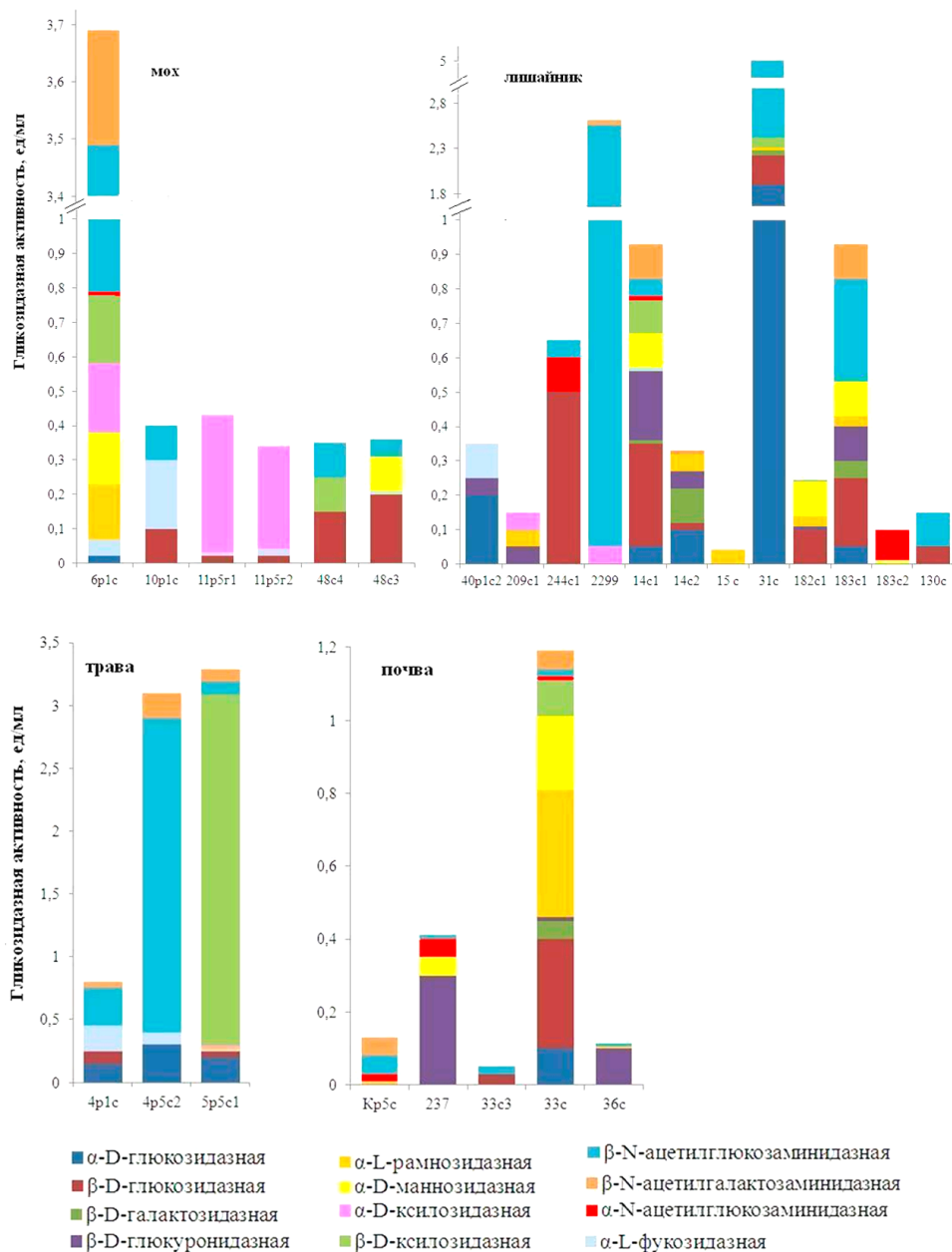
Все эксперименты проводили не менее, чем в 3 – 5 повторностях. Статистическую обработку результатов экспериментальных серий осуществляли стандартными методами с использованием *t*-критерия Стьюдента при 5% уровне значимости

**Результаты.** Гликозидазную активность изучали у 26 штаммов дрожжей, выделенных из мха, травы, лишайников и почвы Антарктики. Дрожжи были представлены в основном неидентифицированными пигментированными штаммами: 5 штаммов бурых, 3 – черных, 5 – розовых, 8 – красных и 5 – белых и непигментированных дрожжей (табл. 1). Только десять штаммов были ранее идентифицированы до вида филогенетическими методами [неопубликованные данные], все они относятся к циркумполярным и космополитическим видам дрожжей.

В супернатанте культуральной жидкости дрожжей был изучен спектр из 12 гликозидазных активностей (рис. 1). Нам не удалось отметить какой-либо жесткой закономерности в проявлении энзиматической активности культур в зависимости от источника выделения. Наиболее распространенными активностями были  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазная и  $\beta$ -глюкозидазная (17 и 15 культур соответственно). Эти ферменты играют ключевую роль в деградации различного растительного сырья и часто присутствуют у почвенных микроорганизмов. Четыре штамма (6p1c, 2299, 31c и 4p5c2) проявляли  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазную активность на уровне 2,5 – 3,0 ед/мл, а у одного штамма (31c) также была обнаружена высокая  $\alpha$ -D-глюкозидазная активность, что позволяет предполагать значительный биотехнологический потенциал данной культуры в качестве продуцента целлюлозодеградирующих энзимов. Штамм розовых дрожжей 5p5c1, выделенный из травы, проявил высокую  $\beta$ -D-ксилозидазную активность.  $\beta$ -Ксилозидаза относится к ключевым энзимам биodeградации ксилана лигноцеллюлоз, а активные продуценты ксилан-деградиру-

ющих энзимов востребованы в промышленных производствах, связанных с переработкой древесного и растительного сырья [15]. В культуральной жидкости штамма *R. mucilaginosa* 33с обнаружена высокая  $\alpha$ -L-рамнозидазная активность (0,35 ед/мл).

Было отмечено, что самый узкий спектр отмечался у черных дрожжей, а наиболее широкий – у красных (рис. 1, табл. 1). Однако в целом, каждая группа была неоднородной и корреляции между активностью определенных гликозидаз и пигментацией культур не обнаружено.



**Рис.1. Гликозидазная активность антарктических дрожжей (среда 1,  $t=24$  °C, 120 ч культивирования, показатели активности каждого энзима – среднее арифметическое 3 – 5 повторностей).**

Профили вторичных метаболитов, в том числе энзимов, могут отражать физиологические и регуляторные различия у видов, которые трудно идентифицировать морфологически. Количество идентифицированных штаммов в нашей работе было недостаточным для анализа, однако хотелось бы отметить следующее: оба штамма *E. nigra* проявляли  $\beta$ -D-глюкуронидазную и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазную активности, а три штамма *R. mucilaginosa* (33с, 48с3, 182с1) демонстрировали  $\beta$ -D-глюкозидазную и  $\alpha$ -D-маннозидазную активности вне зависимости от источника выделения культуры (рис. 1). При этом эти же активности были отмечены у штамма *R. diobovatum*, более того, у штаммов *R. diobovatum* 14с1 и *R. mucilaginosa* 33с мы отмечаем практически идентичные спектры из 9 гликозидазных активностей. Интересным нам представляется факт одинаковых спектров у двух разных видов: *Leucosporidium scottii* и *Debaryomyces hansenii*. У этих штаммов общими были источник выделения (мох), пигментация колоний (белые) и гликозидазные активности ( $\alpha$ -D-ксилозидазная,  $\alpha$ -L-фукозидазная и  $\beta$ -D-глюкозидазная). Также было показано, что все белые дрожжи, выделенные из мха, проявляли  $\alpha$ -L-фукозидазную активность (табл. 1, рис. 1). Все культуры, выделенные с травы, проявляли, помимо прочих,  $\alpha$ - и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазную,  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазную,  $\alpha$ -фукозидазную активности. В дальнейшем будет интересно изучить более широкий спектр активностей на большем количестве штаммов различных видов дрожжей.

Что касается протеолитической активности изученных штаммов, следует отметить, что в условиях эксперимента внеклеточная эластазная активность нами не была обнаружена ни у одной изученной культуры. Общая протеолитическая активность была отмечена у 27 % штаммов, но ее уровень был крайне низок (рис.2).

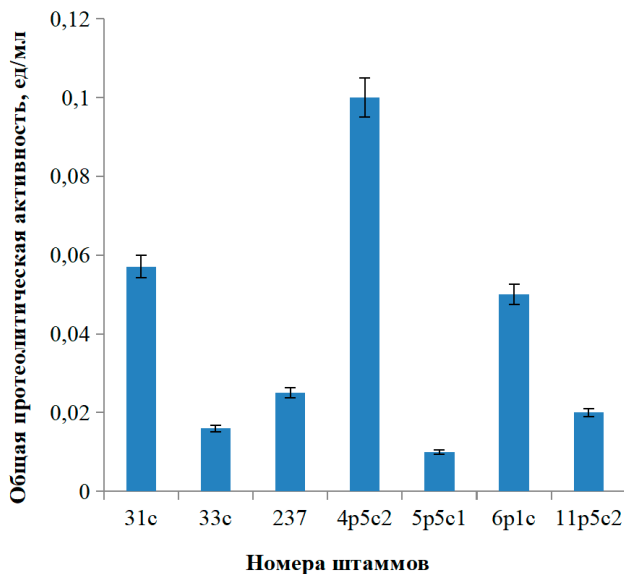
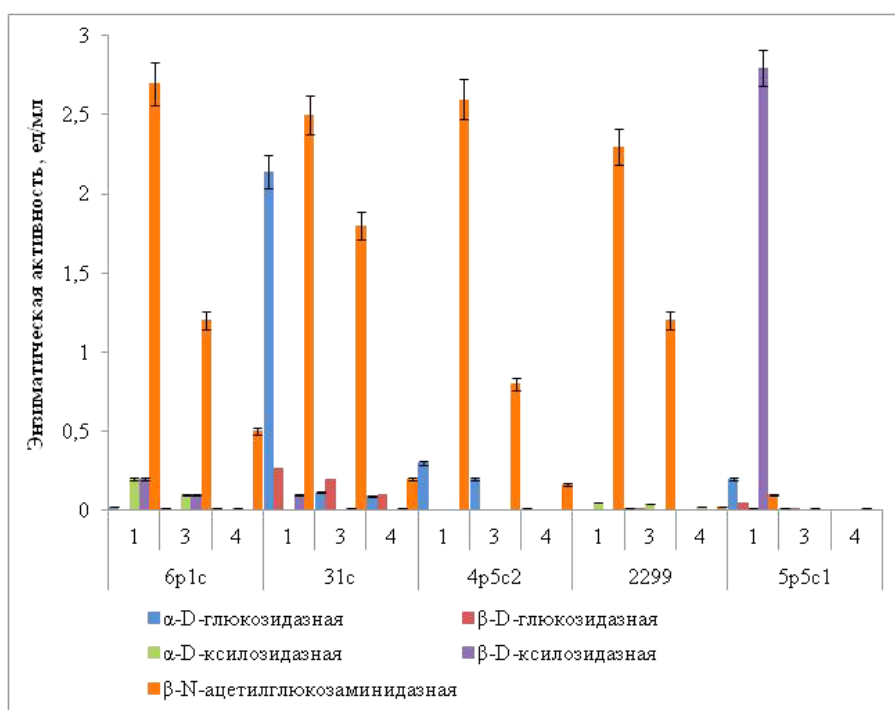


Рис. 2. Общая протеолитическая активность антарктических дрожжей (среда 1, t = 24°C, 120 ч культивирования).



Среди изученных дрожжей можно выделить несколько штаммов, проявляющих высокие активности биотехнологически важных энзимов ( $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы,  $\beta$ -D-ксилозидазы и  $\alpha$ -L-рамнозидазы). Первые две можно отнести к целлюлозодеградирующим энзимам, специфичным к конечным остаткам  $\beta$ -связанных N-ацетилглюкозамина и ксилозы. У штаммов бр1с, 4р5с2 и 2299 доминирующей была  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазная активность, а у 5р5с1 –  $\beta$ -D-ксилозидазная. Активность же других энзимов целлюлозодеградирующего комплекса ( $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидазы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ксилозидазы), была либо значительно ниже, либо вообще отсутствовала (рис. 3). Только у штамма 31с при выращивании на среде 1 была отмечена высокая активность как  $\alpha$ -глюкозидазы, так и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы. Данное свойство может свидетельствовать о более высокой конкурентноспособности культуры в борьбе за источники питания, а также имеет определенные биотехнологические преимущества.

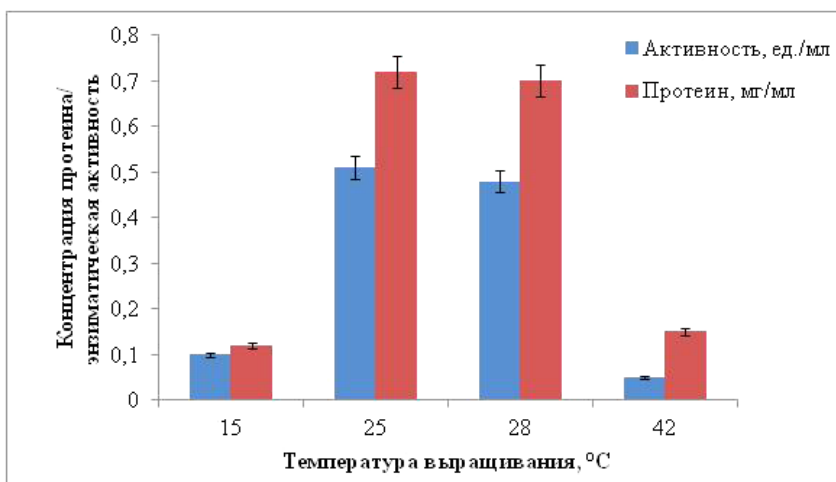


**Рис. 3.** Целлюлозодеградирующая активность дрожжей при культивировании на различных средах (1 – среда № 1; 3 – среда № 3; 4 – среда №4),  $t = 24^\circ\text{C}$ , 120 ч.

Поскольку синтез внеклеточных гликозидаз микроорганизмов зависит от состава питательной среды, нами была исследована энзиматическая активность этих штаммов на нескольких средах, отличающихся по составу и источнику углерода. Было отмечено, что выращивание культур бр1с, 2299, 31с, 4р5с2 и 5р5с1 на среде 1, где в качестве источника углерода использовали мальтозу и соевую муку, позволяло отмечать более высокие показатели активности целлюлозодеградирующих энзимов дрожжей по сравнению с культивированием на средах 3 и 4 (рис. 3). Мальтозу в данном случае можно рассматривать не только в качестве источника углерода

для культур дрожжей, она может выступать и как индуктор синтеза ферментов. Использование ксилозы (среда 4) для индукции синтеза гликозидаз сопровождалось снижением всех изученных активностей (рис. 3). Также наблюдалось снижение и  $\beta$ -D-ксилозидазной активности у культуры 5p5c1 (на 98 %), что может быть связано как с ингибированием ферментативной активности в присутствии продукта реакции, так и с ограниченной способностью культур использовать ксилозу для удовлетворения своих физиологических потребностей. Данный вопрос требует дополнительного изучения, так как устойчивость ксилозидаз к продукту реакции (ксилозе) является одним из ключевых факторов для успешного использования фермента в биотехнологических процессах. В целом можно отметить, что среда 1 зарекомендовала себя в качестве оптимальной по составу для проведения первичного скрининга гликозидазных активностей у дрожжей.

Большой интерес может представлять также психротолерантный УФ-резистентный штамм *R. mucilaginosa* 33с в качестве продуцента  $\alpha$ -L-рамнозидазы. Данный фермент в последние годы находит все большее применение в пищевой и фармацевтической промышленности в качестве агента дерамнозилирования природных флавоноидов и гликозидов [16]. На сегодняшний день в литературе преобладают данные о бактериальных психротолерантных продуцентах  $\alpha$ -L-рамнозидаз [17], в связи с чем новые дрожжевые продуценты, представители группы экстремофилов, представляют особый интерес. Изученная культура продемонстрировала высокие показатели  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности в диапазоне температур 15 – 42 °С (рис. 4) с максимумами ферментативной активности и накопления протеина в культуральной жидкости при 25 и 28 °С при выращивании на среде 3 с рамнозой в качестве источника углерода. Максимум  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности (0,62 ед/мл) *R. mucilaginosa* 33с не совпадал с максимумом накопления протеина культурой и отмечался в поздней стационарной фазе на 5 сутки при культивировании на среде 3 (рис. 5). В данных условиях выращивания у культуры не была обнаружена протеолитическая (казеинолитическая и эластазная) активность. Также



**Рис. 4. Зависимость  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности *R. mucilaginosa* 33с от температуры выращивания (120 ч культивирования, среда 3).**



было отмечено, что со временем при пересевах пигментация культуры *R. mucilaginosa* 33с снижалась, и параллельно наблюдалось снижение всех гликозидазных активностей. Подобный эффект (снижение пигментации и физиологической активности культуры в отсутствие УФ-воздействия) отмечался и другими авторами [18], которые связывают пигментацию у дрожжей *Rhodotorula* с адаптивным механизмом защиты от УФ-излучения.

Выделение и изучение свойств новой  $\alpha$ -L-рамнозидазы антарктической психротолерантной культуры *R. mucilaginosa* 33с в дальнейшем может позволить получить ценный инструмент для исследования рамнозидов и использования их в биотехнологических процессах.

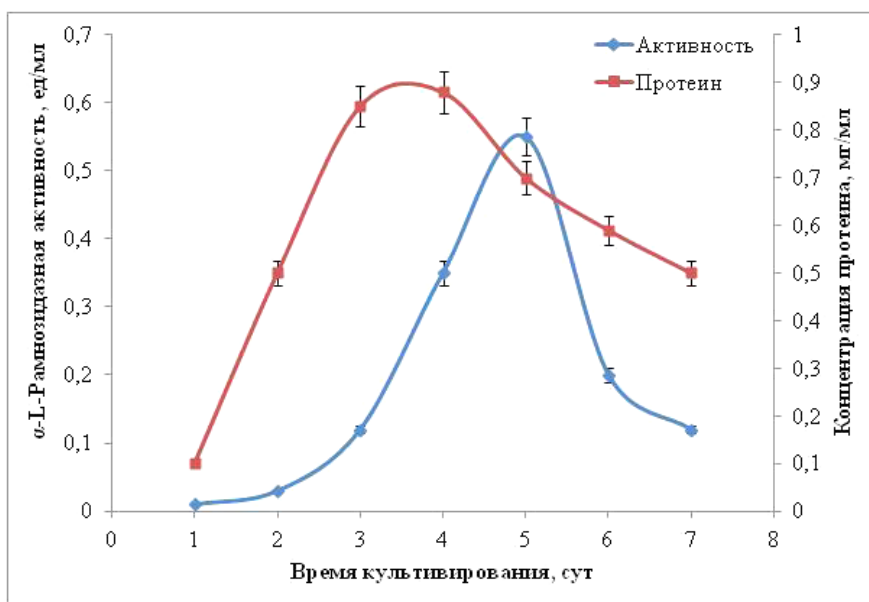


Рис. 5. Динамика изменения  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности *R. mucilaginosa* 33с от времени культивирования ( $t=25^{\circ}\text{C}$ , среда 3).

**Обсуждение.** Сообщества дрожжей в полярных регионах представлены достаточно широко и включают как эндемичные, циркумполярные, так и космополитические виды. Географическая изоляция в условиях низкой температуры, повышенной УФ-радиации и минерализации способствовали формированию и эволюции уникальных микробных сообществ Антарктики. В этих экстремальных условиях природная селекция была направлена на выживание наиболее устойчивых видов. Наиболее часто выделяемыми наземными и морскими дрожжами полярных экосистем являются представители родов *Cryptococcus*, *Mrakia*, *Cystobasidium*, *Rhodotorula*, *Gueomyces*, *Phenoliferia*, *Leucosporidium*, *Pseudogymnoascus*, *Metschnikowia* и *Pichia* [1]. Среди изученных нами штаммов, представленных доминирующими в растительно-почвенных ценозах Антарктики морфовидами, были дрожжи родов *Exophiala*, *Leucosporidium*, *Debaryomyces*, *Nadsoniella*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Tremella*.

Несмотря на экстремально низкие среднегодовые показатели температуры, в наземных экосистемах Антарктики психрофильные штаммы бактерий и дрожжей значительно уступают в количественном отношении психротолерантным [1, 2, 5, 9]. Можно предположить, что адаптация к росту в более широком диапазоне температур дает таким дрожжам конкурентное преимущество и позволяет активно развиваться в летний период, когда температура на островах Западной и Восточной Антарктики поднимается до 20 °С и выше. Все изученные в работе антарктические штаммы дрожжей, как было показано ранее [19], также относились к психротолерантным с температурными диапазонами роста 5 – 30 °С и 1 – 37 °С. Причем максимум их физиологической активности, в частности продукции внеклеточных гликозидаз, наблюдался при 25 – 28 °С. Помимо психротрофности, изученные культуры характеризовались высокой резистентностью к УФ-излучению. Следует отметить, что изученные дрожжи были преимущественно пигментированными (черные, красные, бурые, розовые) и проявляли УФ-устойчивость в диапазоне ЛД<sub>99,99</sub> 600 – 1200 Дж/м<sup>2</sup>, в то время, как для белых и непигментированных дрожжей этот показатель составлял 100 – 250 Дж/м<sup>2</sup> [19].

Интерес к экстремофильным микроорганизмам не в последнюю очередь связан с тем фактом, что экстремальные условия жизни обуславливают наличие у антарктических дрожжей вторичных метаболитов, в том числе энзимов, высокоактивных в условиях низких и умеренных температур, высокой концентрации солей и т. п. [3, 5, 7, 8, 10]. Психротолерантность дрожжей может обеспечиваться за счет особенностей строения протеинов и мембранных липидов этих микроорганизмов (жесткости структуры, преобладания ненасыщенных жирных кислот). Такие свойства продуцентов являются весьма ценными для биотехнологической промышленности, поскольку позволяют понизить энергозатраты в технологических процессах. Было показано, что экстремофильные дрожжи могут служить источником адаптированных к холоду гидролитических энзимов ( $\alpha$ -амилаз, целлюлаз, хитиназ, глюкозидаз, инвертаз, липаз, пектиназ, фитаз, протеаз и ксиланаз) [2, 7, 8, 10]. При этом у психротолерантных дрожжей обнаружены энзимы с повышенной термостабильностью, как например, липаза *Candida antarctica* [2], функционально активная при 90 °С.

Изученные нами культуры психротолерантных дрожжей демонстрировали наличие разнообразных комплексов гликозидаз: проявляли от одной (для штамма 15с), двух (для штаммов 183с2 и 33с3) до 10 (штамм 33с) активностей. Энзиматическая активность культур не зависела от источника их выделения и видовой принадлежности (на примере *E. nigra* 237 и 36с; *R. mucilaginosa* 33с, 48с3, 182с1). Мультиферментность и высокая активность определенных культур была скорее штаммовым признаком, что укладывается в современные представления о продукции экзоферментов микроорганизмами. Протеолитическая активность изученных культур была крайне низкой, что может быть связано как с физиологическими особенностями изученных штаммов, так и со способом культивирования. Среди исследованных дрожжей были выделены перспективные продуценты целлюлозодеградирующих энзимов экзо-типа действия:

$\beta$ -N-ацетилглюкозаминідази,  $\beta$ -D-ксилозидази,  $\alpha$ - і  $\beta$ -глюкозидази. Все эти энзимы характеризуются специфичностью к терминальным остаткам моносахаридов и аминсахаров целлюлозы, целлобиозы, целлоолигосахаридов, глюканов и ксиланов. По своей активности в супернатанте культуральной жидкости они сравнимы с культурами *Aspergillus niger*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* [20, 21]. Целлюлозолитические системы микроорганизмов зачастую объединяют энзимы экзо- и эндо-типа. Последние характеризуются способностью расщеплять 1,4- $\beta$ -глюкозидные связи в полимерных формах целлюлозы. В дальнейшем мы планируем изучить способность наиболее активных культур дрожжей гидролизовать такие субстраты. Безусловный интерес также представляет психротолерантный УФ-резистентный штамм *R. mucilaginosa* 33с, который демонстрировал широкий спектр гликозидазных активностей, в том числе – высокий уровень  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности.

Таким образом, было показано, что дрожжевые культуры, широко представленные среди психротрофных микроорганизмов различных фитоценозов Антарктики могут служить источником практически важных гликозил-гидролаз, активных и стабильных в экстремальных условиях реакционной среды.

## ЕНЗИМАТИЧНА АКТИВНІСТЬ ДРІЖДЖІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

*Н.В. Борзова, О.В. Гудзенко, Г.В. Гладка,  
Л.Д. Варбанець, О.Б. Таширеєв*

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

### Резюме

Унікальне біорізноманіття і біотехнологічний потенціал мікроорганізмів антарктичного регіону сприяють інтенсивним пошукам серед них продуцентів ензимів з новими властивостями і широким діапазоном стабільності. **Метою** роботи було вивчити глікозидазну активність у 26 штамів психротолерантних УФ-резистентних дріжджів, виділених з ґрунтового-рослинних ценозів Антарктики та оцінити їхній біотехнологічний потенціал як продуцентів ензимів. **Методи.** Культури дріжджів вирощували глибинним способом при 15 – 42 °С впродовж 5 діб. Ензимні активності визначали в супернатанті культуральної рідини. Для визначення глікозидазної активності використовували синтетичні похідні моносахаридів. Казеїн і конго-рот еластин були використані як субстрати для визначення протеолітичної активності. **Результати.** У антарктичних дріжджів було досліджено спектр з 12 глікозидазних активностей ( $\alpha$ - і  $\beta$ -D-глюкозидазної,  $\beta$ -D-галактозидазної,  $\beta$ -D-глюкуронідазної,  $\alpha$ -L-фукозидазної,  $\alpha$ -L-рамнозидазної,  $\alpha$ -D-манозидазної,  $\alpha$ - і  $\beta$ -D-ксилозидазної,  $\alpha$ - і  $\beta$ -N-ацетилглюкозамінідазної,  $\beta$ -N-ацетилгалактозамінідазної). Найчастіше відмічалися  $\beta$ -N-ацетилглюкозамінідазна і  $\beta$ -глюкозидазна активності (65 і 58 % штамів відповідно). 4 штами (6р1с, 2299, 31с і 4р5с2) проявляли високу активність комплексу целлюлозодеградувальних ензимів. Штам 5р5с1, виділений з трави *Deshampcia antarctica*, виявляв високу  $\beta$ -D-ксилозидазну активність (2,8 од/мл). Штам *Rhodotorula mucilaginosa* 33с характеризувався наявністю спектра з десяти

активностей, в тому числі високою  $\alpha$ -L-рамнозидазною активністю (0,62 од/мл). **Висновок.** Дріжджові культури з фітоценозів Антарктики можуть бути використані для спрямованого пошуку мікробних глікозидаз з новими властивостями та широким діапазоном дії.

*Ключові слова:* глікозидази, дріжджі, Антарктика,  $\alpha$ -L-рамнозидаза.

## ENZYMATIC ACTIVITY OF YEAST FROM ANTARCTIC REGION

*N.V. Borzova, O.V. Gudzenko, G.V. Gladka,  
L.D. Varbanets, A.B. Tashyrev*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

### Summary

Unique biodiversity and biotechnological potential of microorganisms in the Antarctic region contributes to the intensive search among them of enzymes producers with new properties and a wide range of stability. **The aim** of the work was to study the glycosidase activity in 26 strains of psychrotolerant UV-resistant yeast isolated from soil-plant cenosis of the Antarctic and evaluate their biotechnological potential as a producer of enzymes. **Methods.** Yeast cultures were grown in submerged conditions (15-42 °C). Enzymes activities were determined in the culture supernatant. Synthetic monosaccharide derivatives were used to measure glycosidase activity. Casein and elastin-congo red were used as substrates for the determination of proteolytic activity. **Results.** A spectrum of 12 glycosidase activities ( $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucosidase,  $\beta$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucuronidase,  $\alpha$ -L-fucosidase,  $\alpha$ -L-rhamnosidase,  $\alpha$ -D-mannosidase,  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-xylosidase,  $\alpha$ - and  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase,  $\beta$ -N-acetylgalactosaminidase) was studied in Antarctic yeast. The most common were  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and  $\beta$ -glucosidase activities (65 and 58 % of strains respectively). 4 strains (6p1s, 2299, 31s and 4p5s2) showed high activity of the complex of cellulose-degrading enzymes. 5p5s1 strain, isolated from the *Deshampcia antarctica* grass, showed high  $\beta$ -D-xylosidase activity (2.8 U/ml). *Rhodotorula mucilaginosa* 33c strain showed a spectrum of ten activities, including high  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity (6.2 U/ml). **Conclusion.** Yeast cultures from the Antarctic phytocenosis can be used for the directional search for microbial glycosidases with new properties and a wide range of activity.

*Keywords:* glycosidase, yeast, Antarctic,  $\alpha$ -L-rhamnosidase.

1. Buzzini P, Turk M, Perini L, Turchetti B, Gunde-Cimerman N. Yeasts in polar and subpolar habitats. In: Buzzini P, Lachance MA, Yurkov A, eds. Yeasts in natural ecosystems: diversity. Springer, Cham. 2017; 331–365.
2. Shivaji S, Prasad GS. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: Satyanarayana T, Kunze G, eds. Yeast biotechnology: diversity and applications. Springer, Dordrecht. 2009; 3–18.
3. Villarreal P, Carrasco M, Barahona S, Alcaino J, Cifuentes V, Baeza M. Antarctic yeasts: analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol. BMC Microbiol. 2018; 18(1):66.

4. Fernandez PM, Martorell MM, Blaser MG, Ruberto LAM, de Figueroa LIC, Mac Cormack WP. Phenol degradation and heavy metal tolerance of Antarctic yeasts. *Extremophiles*. 2017; 21(3):445–457.
5. Duarte AWF, Dayo-Owoyemi I, Nobre FS, Pagnocca FC, Chaud LCS, Pessoa A, Felipe MG, Sette LD. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*. 2013; 17(6):1023–1035.
6. Vaca I, Faundez C, Maza F, Paillavil B, Hernandez V, Acosta F, Levican G, Martinez C, Chavez R. Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013; 29(1):183–189.
7. Martorell MM, Ruberto LAM, Fernandez PM, Castellanos de Figueroa LI, Mac Cormack WP. Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *J Basic Microbiol*. 2017; 57(6):504–516.
8. Duarte AWF, Dos Santos JA, Vianna MV, Vieira JMF, Mallagutti VH, Inforsato FJ, Wentzel LCP, Lario LD, Rodrigues A, Pagnocca FC, Pessoa Junior A, Duraes Sette L. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Crit Rev Biotechnol*. 2018; 38(4):600–619.
9. Wentzel LCP, Inforsato FJ, Montoya QV, Rossin BG, Nascimento NR, Rodrigues A, Sette LD. Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. *Microb Ecol*. 2019; 77(1):12–24.
10. Loperena L, Soria V, Varela H, Lupo S, Bergalli A, Guigou M, Pellegrino A, Bernardo A, Calvino A, Rivas F, Batista S. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28(5):2249–2256.
11. Chaplin ME, Kennedy JE, eds. *Carbohydrate analysis: a practical approach*. Washington, Oxford IRL Press. 1986; 228 p.
12. Petrova IS, Vintsyunayte MN. [Determination proteolytic activity enzyme preparations of microbial origin]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 1966; 2(1):322–327. Russian.
13. Trombridg GO, Moon HD. Purification of human elastase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1972, 141(3):928–931.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folinphenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(2):265–275.
15. Juturu V, Wu JC. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnol Adv*. 2012; 30(6):1219–1227.
16. Yadav P, Chauhan AK, Singh SP  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: sources, production, purification and characterization of the debittering enzyme. *IJBTR*. 2017; 7(1): 1-10.
17. Orrillo AG, Ledesma P, Delgado OD, Spagna G, Breccia JD. Cold-active  $\alpha$ -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme Microb Technol*. 2007; 40(2):236–241.
18. Chaud LC, Lario LD, Bonugli-Santos RC, Sette LD, Pessoa Junior A, Felipe MD. Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. 2016; 33(6): 807-814.
19. Tashyrev A, Gladka G, Romanovskaya V. [Evolutionary ecology and strategy of survival of antarctic microorganisms in extreme conditions]. In: *Proceedings of the VIII Intern. scientific conference “Factors in experimental evolution of organisms”* 2013; 12:88–93. Russian.

20. Patel H, Kumar AK, Shah A. Purification and characterization of novel bi-functional GH3 family  $\beta$ -xylosidase/ $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* ADH-11. *Int J Biol Macromol.* 2018; 109:1260–1269.
21. Nguyen HA, Nguyen TH, Kren V, Eijsink VG, Haltrich D, Peterbauer CK. Heterologous expression and characterization of an N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase from *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(12):3275–3281.

Отримано 24.06.2019