

## ГЛІКОЗИДАЗНА ТА ПРОТЕОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ МІКРОМІЦЕТІВ, ВИДІЛЕНИХ З ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ ЗОНИ ВІДЧУЖЕННЯ

*Н.В. Борзова, О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець, Л.Т. Наконечна, Т.І. Тугай*

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна  
e-mail: [nv\\_borzova@bigmir.net](mailto:nv_borzova@bigmir.net)*

*Дослідження мікроміцетів екстремальних екосистем представляють інтерес як з точки зору вивчення механізмів адаптаційних процесів, так і у зв'язку з їхнім високим біотехнологічним потенціалом. **Мета.** Дослідити  $\alpha$ -L-рамнозидазну, манан-деградувальну та протеолітичну активності культур мікроміцетів, виділених з ґрунтів Чорнобильської зони відчуження. **Методи.** Як субстрат для визначення  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності використовували нарингін, для  $\alpha$ -галактозидазної – *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-галактопіранозид, а для  $\beta$ -мананазної – галактоманан гуару. Скринінг протеолітичних активностей проводили з використанням 10 % желатинового середовища та 1 % казеїнового агару. **Результати.** Показано, що 42 % досліджених штамів проявляли  $\alpha$ -L-рамнозидазну (0,01–1,1 од/мл), 75 % –  $\alpha$ -галактозидазну (0,05–3,0 од/мл), 50 % –  $\beta$ -мананазну (0,5–45 од/мл) та 74 % – протеолітичну активності. Всі глікозидазні активності були відмічені у *Eupenicillium pinetorum*, *Trichoderma viride*, *Eurotium herbariorum*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium adametzii*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium variable*, *Penicillium verrucosum*. **Висновки.** Встановлена висока деградувальна активність штамів *A. flavipes*, *P. decumbens*, *P. clavigerum*, *P. restrictum*, *P. roseopurpureum*, *P. sacculum* щодо субстратів, які містять термінальні залишки рамнози та галактози, продемонстрована здатність гідролізувати галактоманан, казеїн та желатину. Показано, що техногенно забруднені території можуть бути джерелом нових продуцентів біотехнологічно важливих ензимів.*

*Ключові слова: мікроміцети,  $\alpha$ -L-рамнозидазна,  $\beta$ -мананазна,  $\alpha$ -галактозидазна, протеолітична активності.*

Мікроміцети відносяться до організмів, що проявляють здатність колонізувати екстремальні еконіші в усіх регіонах Землі. Вони знайдені у наземних і водних екосистемах, засолених та посушливих, арктичних та антарктичних ґрунтах, районах з підвищеною УФ-активністю [1, 2, 3]. Але в наш час інтерес вчених привертають не тільки природні екстремальні еконіші. В останні десятиліття антропогенний вплив призвів до появи територій з підвищеним рівнем іонізуючого випромінювання, однією з яких є 30-ти кілометрова зона відчуження Чорнобильської атомної електростанції (ЧАЕС). Встановлено, що радіоактивне забруднення спричиняє вплив на всіх рівнях біологічної організації – від вірусів до екосистем [4, 5].

Широкі адаптаційні механізми, які в процесі еволюції виробили мікроміцети для протидії природним екстремальним факторам, допомагають їм успішно виживати на територіях за-

бруднених радіонуклідами [6]. Дослідженнями останніх років показано [6–8], що іонізуюче випромінювання в цих умовах може бути не тільки пошкоджуючим фактором, але й спричиняти певний позитивний ефект на біологічні об'єкти, прискорюючи їхній ріст та розвиток. Така стимуляція метаболізму є проявом відновлення порушеного гомеостазу у фазі гіперкомпенсації [6] та може проявлятися у різних формах. В останні роки неодноразово було показано, що за умов хронічного іонізуючого випромінювання на забруднених територіях сформувались популяції грибів, збагачені на вміст меланінів, які є фактором радіорезистентності [7]. Порівняння зміни рівня карбонільних груп в білках у відповідь на пероксидний стрес виявило підвищену стресостійкість у штамів *Purpureocillium lilacinum*, які були виділені з ґрунтів з високим вмістом радіонуклідів або іонів міді, порівняно зі штамми, які виділені з незабруднених ґрунтів [8]. Ензи-

матичні системи мікроміцетів, які відіграють не останню роль у їхній адаптивній і колонізуючій здатності, за стресових умов також піддаються стимулюванню [2, 3, 9], а глікозидази та протеолітичні комплекси деградації органічних решток, які забезпечують біодеструктивну роль мікроміцетів, за цих умов поповнюються ензимами з підвищеною активністю та стабільністю [10, 11]. Все це створює засади для дослідження мікроміцетів екстремальних еконіш для вирішення як теоретичних питань еволюції адаптивних механізмів еукаріотичних мікроорганізмів, так і практичних – пошуку серед них продуцентів біологічно активних речовин та гідролітичних ензимів з новими властивостями та підвищеною стабільністю.

Більшість сучасних ензимних препаратів для біотрансформації отримують за допомогою мікроміцетів [12]. Це пов'язано з наявністю у них широкого ензиматичного апарату для перетворення рослинних та тваринних білкових полімерів та полісахаридів для забезпечення своїх харчових потреб. До промислово важливих глікозил гідролаз відносяться ензими манан-дегидрувального комплексу, а саме –  $\alpha$ -галактозидаза (КФ 3.2.1.22) та  $\beta$ -мананаза (КФ 3.2.1.78), що гідролізують  $\beta$ -манозидний зв'язок в основному ланцюзі та  $\alpha$ -галактозидний – у бічних ланцюгах геміцелюлози, глюко- та галактомананів, утворюючи маноолігосахариди, манозу й галактозу. Високий інтерес до цих ензимів пов'язаний з їхнім зростаючим попитом у різних галузях біоконверсії агропромислових відходів, у харчовій та кормовій промисловості, виробництві детергентів та біопалива [13]. У біотехнологічному виробництві мийних засобів перевагу можуть мати мікробні продуценти, що синтезують одночасно гліколітичні та протеолітичні ензими [14]. Так само цікавим є спрямований пошук продуцентів іншої глікозидази –  $\alpha$ -L-рамнозидази (КФ 3.2.1.40). Здатність до модифікації рамнозозвмісних пектинів та флавоноїдів робить  $\alpha$ -L-рамнозидазу привабливою для використання у харчових та фармацевтичних технологіях [15], де переваги ензиматичного гідролізу перед хімічним, завдяки високій специфічності дії та екологічності, є надзвичайно важливими.

Таким чином, метою нашої роботи було дослідити здатність штамів мікроміцетів, виділених з ґрунтів зони відчуження ЧАЕС, продукувати ензими з глікозидазними та протеолітичними активностями.

**Матеріали і методи.** Об'єктами досліджень були 40 штамів мікроміцетів, які виділені в Чорнобильській зоні відчуження в 2018 р. Штами зберігаються в колекції живих культур відділу фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Культури мікроміцетів вирощували 14 діб на сусли агари, після чого пересівали на декілька видів рідкого поживного середовища. Для виявлення глікозидазних активностей культивування мікроорганізмів проводили глибинним способом в пробірках в умовах качалки за температури 25 °С, зі швидкістю обертання 220 об/хв протягом 5-ти діб на середовищі наступного складу, г/л: мальтоза – 5,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 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; дріжджовий автолізат – 0,15, соєве борошно, рН 6,0.

Для виявлення  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності культивування мікроорганізмів проводили на цьому ж середовищі, де як джерело вуглецю використовували рамнозу (5 г/л).

Після закінчення ферментації біомасу відділяли фільтруванням.  $\alpha$ -Галактозидазну активність визначали в супернатанті культуральної рідини за допомогою *p*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-галактопіранозиду (“Sigma-Aldrich”, США) [16]. За одиницю ензиматичної активності приймали таку кількість ензиму, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах досліджу.

Визначення  $\beta$ -мананазної активності проводили за оцінкою кількості манози, що утворилася в результаті гідролізу галактоманану гуару. Кількість манози визначали динітросаліциловим методом [17]. Реакційну суміш, що містила 0,5 мл культуральної рідини та 0,5 мл 1 % галактоманану в 0,1 М фосфатно-цитратному буфері (ФЦБ), рН 5,2, інкубували 30 хв при 45 °С, потім додавали 1 мл динітросаліцилового реактиву й кип'ятили протягом 10 хв. Інтенсивність забарвлення оцінювали спектрофотометрично при 540 нм. Як стандарт використовували манозу.

$\alpha$ -L-Рамнозидазну активність визначали методом Davis [18], використовуючи як субстрат нарингін. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує в умовах досліджу 1 мкмоль субстрату за хв. Реакційна суміш містила 0,1 мл розчину ензиму в 0,1 М ФЦБ, рН 5,2, 0,1 мл 2,5 мМ розчину субстрату. Суміш інкубували протягом 30 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 3 мл 4 М розчину

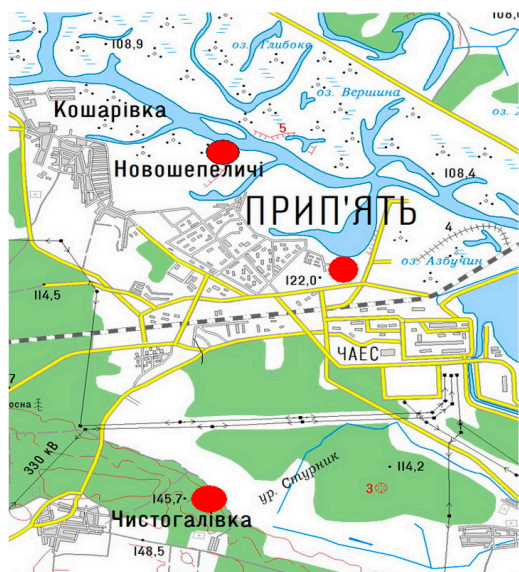
NaOH. Через 30 хв вимірювали інтенсивність забарвлення реакційної суміші при довжині хвилі 310 нм на спектрофотометрі СФ-26.

Скринінг протеолітичних активностей досліджуваних мікроміцетів проводили з використанням 10 % желатинового середовища та 1 % казеїнового агару [19]. Желатину та казеїн розчиняли у 0,1 М ФЦБ, рН 5,2. У лунки діаметром 3 мм вносили 10 мкл супернатанту культуральної рідини та інкубували при 20 °С протягом 24 год. Результати оцінювали візуально за діаметром зони гідролізу желатини або казеїну.

Всі експерименти проводили не менше ніж в 3–5 повторностях. Статистичну обробку результатів експериментальних серій здійснювали стандартними методами з використанням t-критерію Стьюдента.

**Результати.**  $\alpha$ -L-Рамнозидазну, манан-деградувальну та протеолітичну активності вивчали в культуральній рідині 40 штамів мікроміцетів, які були виділені з різних шарів ґрунту та поверхні опор ліній електропередач трьох різних точок Чорнобильської зони відчуження. Місця відбору проб знаходилися на території населених пунктів Новошепеличі, Чистогалівка та Прип'ять (рис.1).

Серед досліджених штамів найменш представленими були роди *Cladosporium* (2 штами 2 видів), *Trichoderma* (3 штами 3 видів), *Eurotium* (2 штами 2 видів), *Eupenicillium* (1 штама).  $\alpha$ -L-Рамнозидазна активність представників родів *Cladosporium*, *Trichoderma* та *Eurotium* була



**Рис. 1.** Місця відбору проб для виділення мікроміцетів

невисокою і коливалася в діапазоні від 0,01 до 0,11 од/мл (рис. 2). У *Trichoderma koningii* зр. 7 в супернатанті культуральної рідини  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності не відмічали. Штам *T. viride* 6 зр., крім  $\alpha$ -L-рамнозидазної, проявляв слабку  $\alpha$ -галактозидазну та  $\beta$ -мананазну активності.

Обидва представники роду *Eurotium*, а саме – *Eurotium rubrum* 6 зр та *Eurotium herbariorum* проявляли  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність (0,015 та 0,11 од/мл відповідно). Слід відмітити, що *E. rubrum* 6 зр також проявляв  $\beta$ -мананазну активність, тоді як у *E. herbariorum* визначали всі три досліджені глікозидазні активності. Максимальну  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність відмічали у *Eupenicillium pinetorum* 3 зр. (0,32 од/мл). Даний штам також проявляв високу  $\alpha$ -D-галактозидазну (2,25 од/мл) та незначну  $\beta$ -мананазну (6,1 од/мл) активність.

З 12 штамів мікроміцетів роду *Aspergillus* найменш активними були представники виду *Aspergillus sulphureus*: два з трьох штамів не проявили жодної з досліджених активностей, а  $\alpha$ -L-рамнозидазна та  $\alpha$ -галактозидазна активності третього штаму були невисокими (рис. 3). В супернатанті культуральної рідини *Aspergillus flavipes* 2, *Aspergillus ochraceus* 261, *A. ochraceus* 3045, *A. ochraceus* 3048 та *Aspergillus flavus* 3051 відмічали всі три глікозидазні активності ( $\alpha$ -L-рамнозидазну,  $\alpha$ -галактозидазну та  $\beta$ -мананазну), у чотирьох культур домінуючою була  $\alpha$ -L-рамнозидазна активність. Найбільш розповсюдженою серед *Aspergillus* була  $\alpha$ -галактозидазна активність (75 % штамів), її наявність демонстрували всі представники виду *A. ochraceus*. Присутність обох манан-деградувальних ензимів була показана у 50 % штамів, найвищу активність відмічали у *A. flavipes* 1. Дві культури (*A. ochraceus* 1059, *A. versicolor* 3050) проявляли лише по одній активності із досліджених. Дві культури *A. sulphureus* 3046 і 3047 в умовах експерименту не проявляли жодної з досліджених активностей.

Група штамів роду *Penicillium* була представлена 20 культурами 15 видів (рис. 4). Дослідження глікозидазної активності показали, що 30 % цих штамів проявляли всі три досліджувані активності.  $\alpha$ -L-Рамнозидазну активність відмічали у 85 % досліджених культур,  $\alpha$ -галактозидазну – у 80 %, тоді як  $\beta$ -мананазну – лише у 35 % вивчених штамів. Всі штами з  $\beta$ -мананазною проявляли і  $\alpha$ -галактозидазну активність, хоча внесок цих активностей різ-

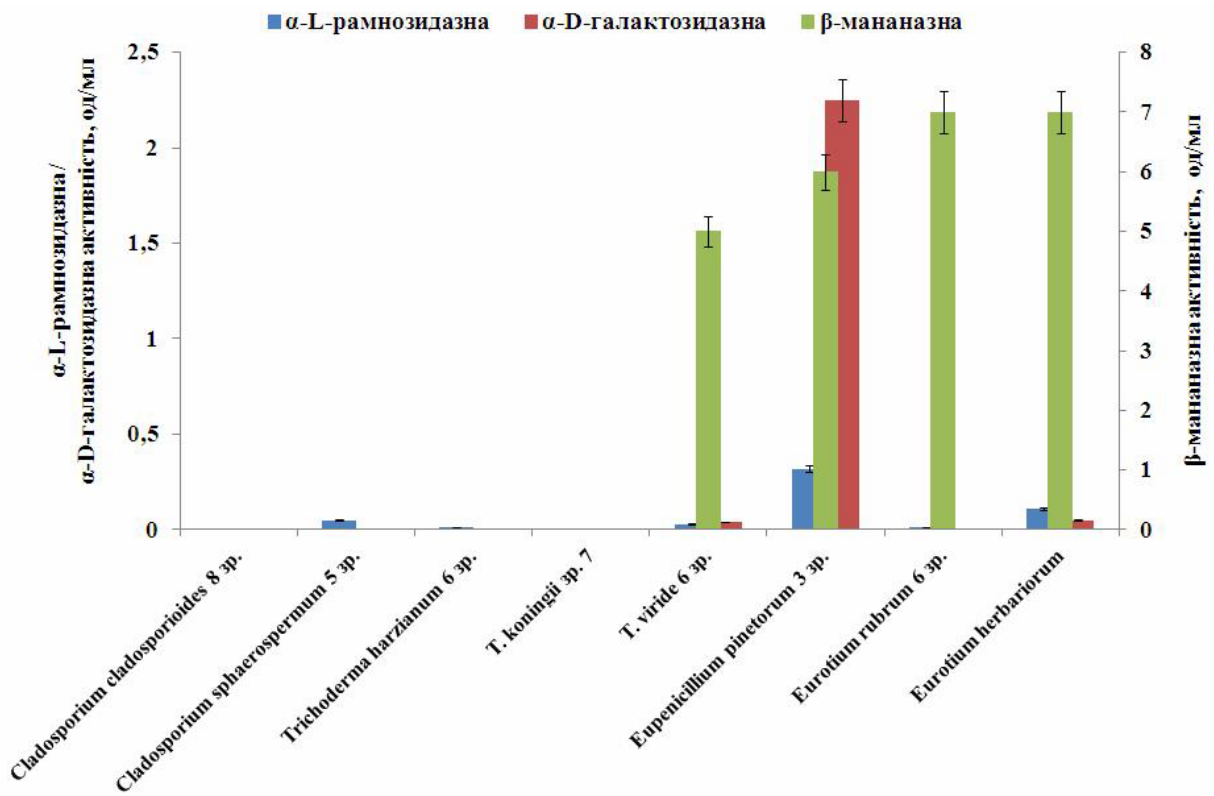


Рис. 2. Глікозидазна активність представників родів *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Eurotium*, *Eupenicillium*

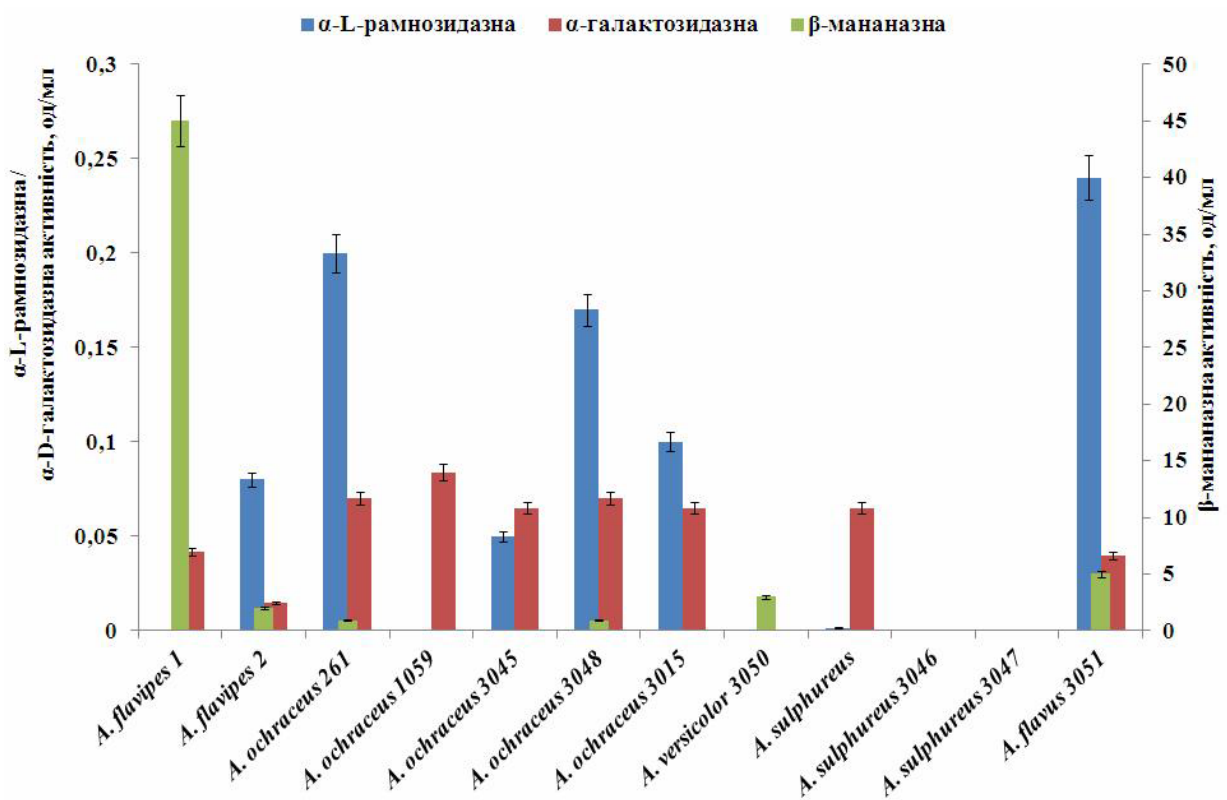


Рис. 3. Глікозидазна активність представників роду *Aspergillus*

нився в залежності від штаму. Така активність може свідчити про здатність розщеплювати глікозидний зв'язок як у основному, так і у бічних ланцюгах галактомананів, що може мати певні переваги для цих мікроміцетів у конкуруванні за джерела живлення та енергії. Можна виділити три штами – *Penicillium decumbens* зр. 7, *Penicillium restrictum* зр. 7, *Penicillium sacculum*,  $\alpha$ -галактозидазна активність яких у культуральній рідині була вище 2 од/мл, що робить їх перспективними продуцентами даного ензиму

[20]. Також біотехнологічний потенціал мають три штами *Penicillium* та *A. flavipes* 2, які проявляють  $\beta$ -мананазну активність в діапазоні 15–45 од/мл (рис. 3, 4).

15 з 20 штамів роду *Penicillium* проявляли  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність на рівні від 0,01 до 1,1 од/мл (рис. 4), найбільш активними були *Penicillium adametzii* зр. 8, *P. decumbens* зр. Г4, *P. restrictum* зр. 7, *Penicillium roseopurpureum* 9, *P. sacculum*.

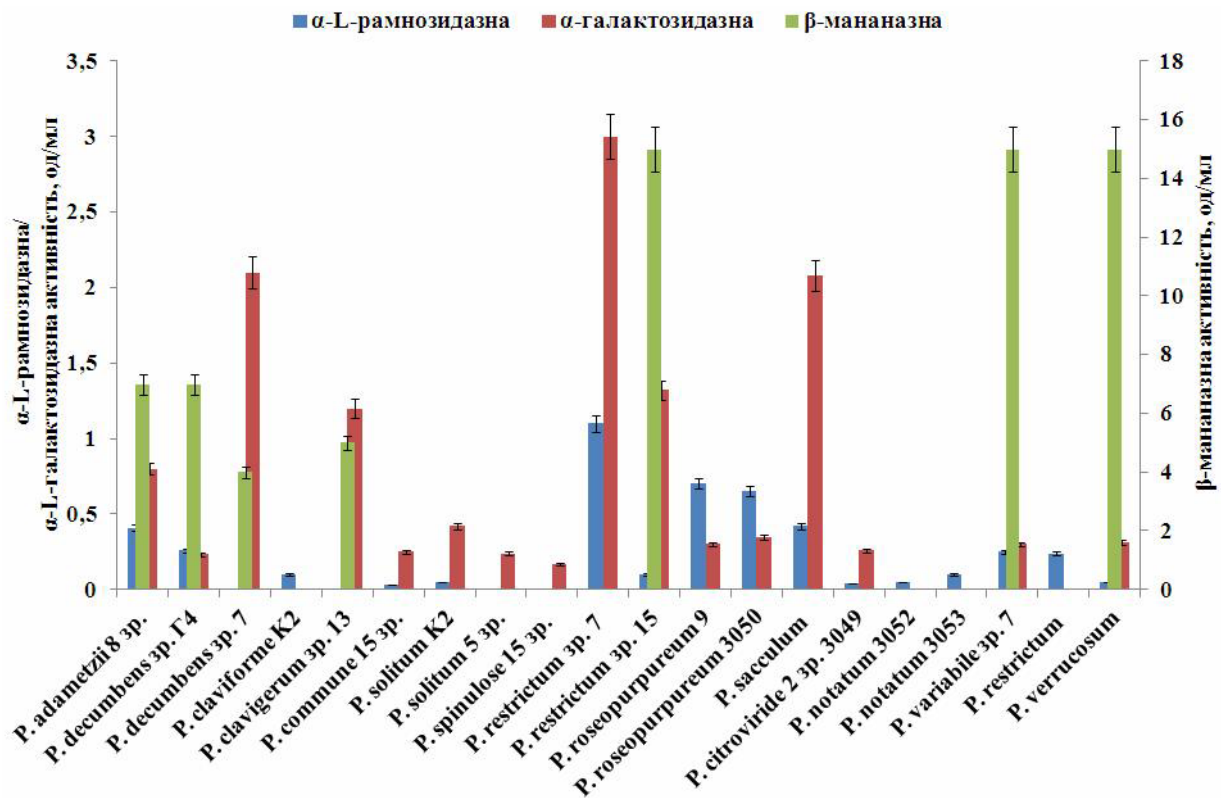


Рис. 4. Глікозидазна активність представників роду *Penicillium*

Вивчення протеолітичної активності 40 досліджених мікроміцетів показало (рис. 5), що в умовах експерименту в 26 % штамів не виявляли ні желатиназної, ні казеїнолітичної активності. Шість досліджених культур проявляли лише желатиназну активність, але її рівень був дуже низьким. Найвищу протеолітичну активність проявляли штами видів *A. flavipes*, *A. ochraceus*, *P. restrictum*, *P. spinulose*, *P. citroviride*. Рівні глікозидазної та протеолітичної активності досліджених культур не корелювали між собою. Більшість штамів, що проявляли високу ту чи іншу глікозидазну активність, не продукували протеази, або рівень їхньої протеолітичної активності був низьким (рис. 2–5). Винятком були тільки три штами: *A. ochraceus* 261, який на фоні ви-

сокої протеолітичної активності продукував активну  $\alpha$ -L-рамнозидазу, а також *A. flavipes* 1 та *P. restrictum* 15 з високою манан-деградувальною та протеолітичною активністю.

**Обговорення.** Зростаючі об'єми відходів, забруднення води та ґрунту токсичними речовинами та солями важких металів, виснаження ґрунтів в результаті сільськогосподарської діяльності та техногенні аварії все частіше в останні десятиліття призводять до негативних екологічних наслідків для біоти. Забруднення території України радіонуклідами в результаті аварії на ЧАЕС призвело до хронічного впливу іонізуючого випромінювання на території 30-ти кілометрової зони відчуження на всі об'єкти

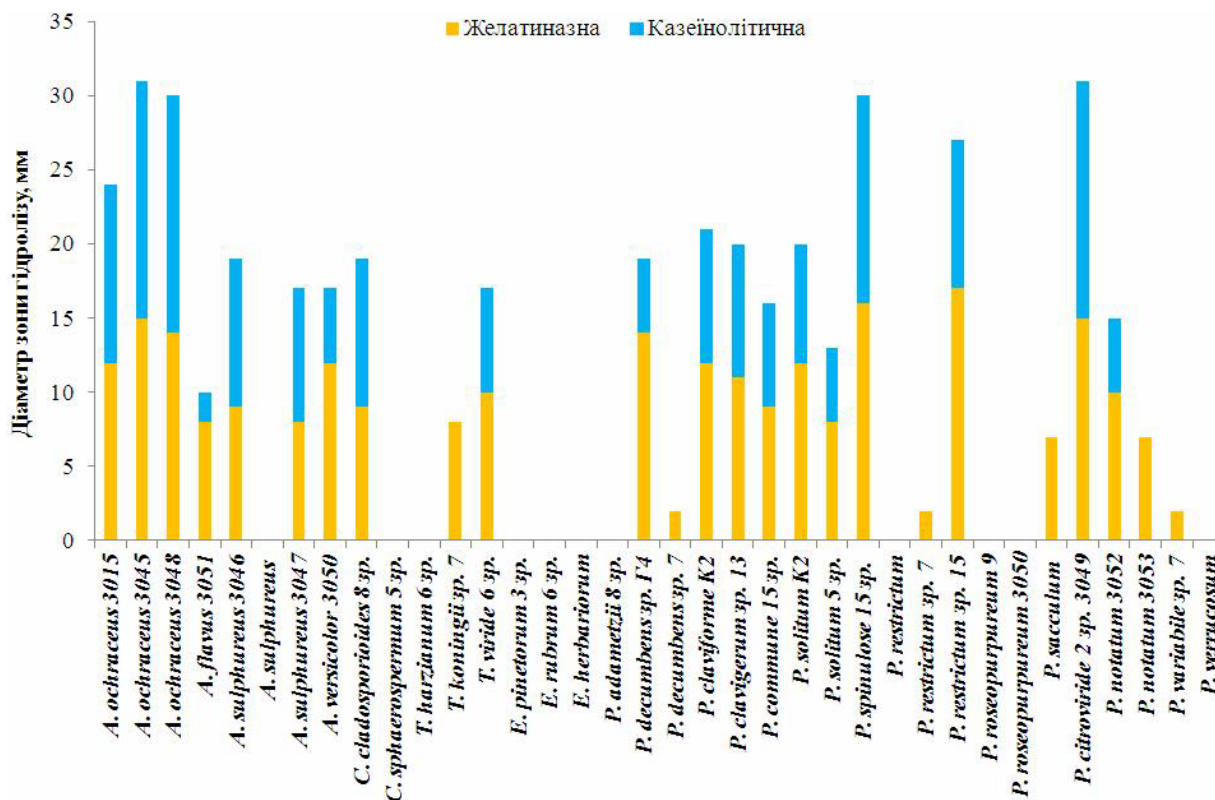


Рис. 5. Протеолітична активність мікроміцетів у супернатанті культуральної рідини (5 діб, середовище з сосвим борошном та рамнозою,  $t=25^{\circ}\text{C}$ )

біоти – рослини, гриби, нижчі та вищі тварини, мікроорганізми та віруси. В першу декаду після аварії спостерігались істотні зміни видового складу мікроорганізмів у різних еконішах [8, 10]. Було відмічено зниження як чисельності, так і різноманіття мікроорганізмів під впливом антропогенної радіації [5]. Показано, що у бактерій та грибів за умов підвищеного рівня радіоактивних забруднень субстрату зростала швидкість утворення мутантних форм, що вказує на можливість появи більш радіостійких популяцій мікроорганізмів [6, 7].

Серед усіх груп мікроорганізмів мікроміцети є найбільш стійкими до техногенного забруднення, оскільки характеризуються швидким й рясним спороутворенням та мають потужну ензиматичну систему [6, 8]. Також мікроскопічні гриби сприяють відтворенню рослинного різноманіття через симбіоз з вищими рослинами, але можуть мати і негативний вплив, через розповсюдження токсичних та патогенних видів [5]. Відомо, що забруднені, в тому числі радіонуклідами, ґрунти характеризуються певними змінами грибних комплексів: збільшенням видового різноманіття та чисельності грибів, накопиченням темнозбарвлених форм, що мають середню та високу швидкість росту [7].

Феномен прискорення метаболізму грибів під впливом іонізуючого випромінювання дозволяє передбачати у цих мікроорганізмів продукцію глікозидаз та протеаз з новими властивостями.

Нами було досліджено глікозидазну та протеолітичну активність 40 свіжовиділених штамів мікроміцетів. Досліджені культури було ізольовано переважно з ґрунтів 10-ти кілометрової зони ЧАЕС. Слід відмітити, що було виділено досить широке коло видів мікроміцетів (27 видів, 6 родів). Всі вони є типовими ґрунтовими представниками грибів. Вони були представлені як евритопними видами *Aspergillus versicolor* та *A. flavipes*, *T. koningii*, так і патогенними видами *A. flavus*, *E. herbariorum*. Відомо, що зростанню відсотку патогенних та фітопатогенних видів мікроміцетів на забруднених територіях сприяє їхня целюлозо- та геміцелюлозодеградувальна, протеолітична активність [21]. Але в наших дослідженнях представники цих видів не демонстрували високої позаклітинної гідролітичної активності, натомість *A. flavipes* 1 проявляв досить високу манан-деградувальну та протеолітичну активність, що в перспективі може мати переваги при виробництві детергентів на основі ензимного препарату цього продуцента.

Виділялися меланін синтезуючі види *Clado- sporium*, хоча їхня ензиматична активність була вкрай низькою. Так само мало активними виявилися і представники роду *Trichoderma*, на відміну від інших штамів *T. harzianum* і *T. koningii*, які описані у літературі, як активні біосинтетики гідролаз [9, 12, 13]. Це ще раз доводить, що секреторна ензиматична активність є штамовою, а не видовою ознакою.

Були виділені такі типові представники агрогрунтів, як *A. sulphureus* та *A. ochraceus*. Найбільш широко була представлена група *Penicillium*, представники якої є відомими синтетиками біологічно активних речовин. В цій групі нами були виявлені штами *P. restrictum* та *P. roseopurpureum* з високою  $\alpha$ -L-рамнозидазною активністю (0,65 – 1,1 од/мл), вищою за активність відомих продуцентів – *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. aculeatus*, *Penicillium* sp., *P. decumbens* [22]. Слід відмітити, що  $\alpha$ -L-рамнозидазна активність для цих видів описана вперше.

Індуцибельний характер синтезу позаклітинних глікозидаз дозволяє в певній мірі прогнозувати ензиматичну активність того чи іншого штаму мікроорганізму в залежності від джерела його виділення [9, 11]. Багаті на органічні рештки ґрунти дозволяють виділяти мікроорганізми з високою специфічністю щодо полі- та олігосахаридів, глікопротеїнів, протеїнів, тощо [12]. Очікувано досліджені культури проявляли манан-деградувальну активність (75 %): 5 % штамів продукували в культуральну рідину  $\beta$ -мананазу, 30 % –  $\alpha$ -галактозидазу і 40 % –  $\beta$ -мананазу та  $\alpha$ -галактозидазу одночасно. Така активність мікроміцетів цілком вкладається в сучасні уявлення про їхню роль деструкторів ґрунтового біогеоценозу. Серед досліджених штамів слід виділити *P. decumbens* 7, *P. clavigerum* зр.13, *P. restrictum* 7, 15, *P. sacculum*, які проявляли  $\alpha$ -галактозидазну активність від 1,2 до 3 од/мл, однак  $\beta$ -мананазна активність цих штамів була невисокою, а у *P. restrictum* 7 та *P. sacculum* взагалі була відсутня. Висока  $\alpha$ -галактозидазна активність культур роду *Penicillium* потребує подальшого дослідження, оскільки їхня активність перевищує активність таких відомих грибних продуцентів, як *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium purpurogenum*, *Mortierella vinacea*, *Trichoderma reesei* [13, 20]. Слід відмітити, що штами *Penicillium* з високою глікозидазною активністю майже не гідролізували

желатину та казеїн, за виключенням *P. restrictum* 15.

Таким чином, слід відмітити високу гідролазну активність ґрунтових штамів мікроміцетів, які були виділені з екоотопів, що піддаються впливу хронічного іонізуючого випромінювання. Була показана висока деградувальна активність штамів *A. flavipes*, *P. decumbens*, *P. clavigerum*, *P. restrictum*, *P. roseopurpureum*, *P. sacculum* щодо субстратів, які містять термінальні залишки рамнози та галактози, а також здатність гідролізувати основний та бічні ланцюги галактоманану, казеїн та желатину. Показано, що техногенно забруднені території можуть бути джерелом нових продуцентів біотехнологічно важливих ензимів.

## GLYCOSIDASE AND PROTEOLYTIC ACTIVITY OF MICROMYCETES ISOLATED FROM THE CHERNOBYL EXCLUSION ZONE

*N.V. Borzova, O.V. Gudzenko, L.D. Varbanets, L.T. Nakonechnaya, T.I. Tugay*

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

### Summary

Studies of microscopic fungi of extreme ecosystems are of interest both in terms of researching the mechanisms of adaptation processes and in connection with the high biotechnological potential of micromycetes. **Aim.** To investigate  $\alpha$ -L-rhamnosidase, mannan-degrading and proteolytic activity of micromycetes cultures isolated from the Chernobyl Exclusion Zone. **Methods.** Naringin was used as a substrate for determining  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside – for  $\alpha$ -galactosidase activity, and galactomannan guar – for  $\beta$ -mannanase activity. Screening of proteolytic activities was performed using 10 % gelatin medium and 1 % casein agar. **Results.** It was shown that 42 % of the tested strains showed  $\alpha$ -L-rhamnosidase (0.01–1.1 U/ml), 75 % –  $\alpha$ -galactosidase (0.05–3.0 U/ml), 50 % –  $\beta$ -mannanase (0.5–45 U/ml) and 74 % – proteolytic activity. Three glycosidase activities were observed in *Eupenicillium pinetorum*, *Trichoderma viride*, *Eurotium herbariorum*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium adametzii*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium variable*, *Penicillium verru-*

*cosum*. **Conclusions.** High degradation activity of *A. flavipes*, *P. decumbens*, *P. clavigerum*, *P. restrictum*, *P. roseopurpureum* and *P. sacculum* strains against substrates containing terminal rhamnose and galactose residues, ability to hydrolyze galactomannan, casein and gelatin were showed. It has been shown that technogenic pollution areas can be a source of new producers of biotechnologically important enzymes.

**Keywords:** micromycetes,  $\alpha$ -L-rhamnosidase,  $\beta$ -mannanase,  $\alpha$ -galactosidase, proteolytic activity.

1. Cantrell SA, Dianese JC, Fell J, Gunde-Cimerman N, Zalar P. Unusual fungal niches. *Mycologia*. 2011; 103(6):1161–1174.
2. Batista-García RA, Sutton T, Jackson SA, Tovar-Herrera OE, Balcazar-Lopez E, Sanchez-Carbente MD, Sanchez-Reyes A, Dobson AD, Folch-Mallol JL. Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0173750. doi: 10.1371/journal.pone.0173750.
3. Dalmaso GZL, Ferreira D, Vermelho AB. Marine extremophiles a source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar Drugs*. 2015; 13(14): 1925–1965.
4. Steinhauser G, Brandl A, Johnson TE. Comparison of the Chernobyl and Fukushima nuclear accidents: a review of the environmental impacts. *Sci Total Environ*. 2014; 470–471:800–817.
5. Romanovskaia VA, Sokolov IG, Rokitko PV, Chernaia NA. [Ecological consequences of radioactive pollution for soil bacteria within the 10-km region around the Chernobyl Atomic Energy Station]. *Mikrobiologiya*. 1998; 67(2):274–280. Russian.
6. Dighton J, Tugay T, Zhdanova N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 281(2):109–120.
7. Belozerskaya TA, Aslanidi K, Gessler N, Egorova A, Karpenko Yu, Olishchevskaya S. Characteristics of extremophilic fungi from Chernobyl Nuclear Power Plant. In: Mendez Vilas A, editor. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Formatex Res Center, 2010; 1:88–94.
8. Egorova AS, Gessler NN, Belozerskaya TA, Ryasanova LP, Kulakovskaya TV. [Stress resistance mechanisms in the indicator fungi from highly radioactive Chernobyl zone sites]. *Mikrobiologiya*. 2015; 84(2):152–158. Russian.
9. Aulitto M, Fusco S, Limauro D, Fiorentino G, Bartolucci S, Contursi P. Galactomannan degradation by thermophilic enzymes: a hot topic for biotechnological applications. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019; 35(2):32.
10. Dumorne K, Cordova DC, Astorga-Elo M, Renganathan P. Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J Microbiol Biotechnol*. 2017; 27(4):649–659.
11. Brandt SC, Ellinger B, van Nguyen T, Thi QD, van Nguyen G, Baschien C, Yurkov A, Hahnke RL, Schafer W, Gand M. A unique fungal strain collection from Vietnam characterized for high performance degraders of bioecological important biopolymers and lipids. *PLoS One*. 2018; 13(8):e0202695.
12. Chambergo FS, Valencia EY. Fungal biodiversity to biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100(6):2567–2577.
13. Srivastava PK, Kapoor M. Production, properties, and applications of endo- $\beta$ -mannanases. *Biotechnol Adv*. 2017; 35(1):1–19.
14. David A, Singh Chauhan P, Kumar A, Angural S, Kumar D, Puri N, Gupta N. Coproduction of protease and mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 in solid state fermentation and their combined application as detergent additives. *Int J Biol Macromol*. 2018;108:1176–1184.
15. Slamova K., Kapesova J., Valentova K. “Sweet Flavonoids”: Glycosidase-catalyzed modifications. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(7): 21–26.
16. Chaplin ME, Kennedy JE. Carbohydrate analysis. Oxford: IRL Press, 1986. 228 p.
17. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*. 1959; 31:426–428.
18. Davis B.J. Assay of naringinase. *Anal Biochem*. 1985; 149(2):566–571.
19. Vermelho AB, Meirelles MNL, Lopes A, Petinate SDG, Chaia AA, Branquinha MH. De-



- tection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1996, 91(6):755–760.
20. Katrolia P, Rajashekhara E, Yan Q, Jiang Z. Biotechnological potential of microbial galactosidases. Crit Rev Biotechnol, 2014; 34(4):307–317.
21. Frac M, Hannula SE, Belka M, Jedryczka M. Fungal biodiversity and their role in soil health. Front Microbiol. 2018; 9:707.
22. Yadav V, Yadav PK, Yadav S, Yadav KDS.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: A review. Process Biochemistry. 2010; 45(8):1226–1235.

Отримано 22.01.2020