

ОСОБЛИВОСТІ ПРОДУКЦІЇ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ *PENICILLIUM RESTRICTUM*

Н.В. Борзова, О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, 03143, Україна,
e-mail: nv_borzova@bigmir.net*

*Оптимізація умов культивування продуцента є необхідним етапом в отриманні біотехнологічно важливих ензимів. **Мета.** Дослідити деякі параметри культивування *Penicillium restrictum* Gilman & Abbott, встановити джерела вуглецю та азоту, які забезпечуватимуть високу активність α -галактозидази та оцінити здатність культури гідролізувати галактозовмісні вуглеводи. **Методи.** Культуру мікроміцета вирощували глибинним способом при 25 °С. Як джерела вуглецю та азоту використовували рамнозу, сахарозу, галактоманан гуару, грейпфрутову макуху, соєве борошно, NaNO_2 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, сечовину, дріжджовий автолізат, дріжджовий екстракт, пептон. Глікозидазні активності визначали за допомогою синтетичних нітрофенільних субстратів; здатність гідролізувати рафінозу, стахіозу та галактоманан оцінювали динітросалициловим методом. **Результати.** Встановлено, що максимум α -галактозидазної активності (6,05 од/мл) та продуктивності (0,036 од/мл/год) *P. restrictum* спостерігався на 7 добу інкубування за використання рамнози, соєвого борошна та сульфату амонію. Швидкість гідролізу рафінози, стахіози та галактоманану становила 133, 116 та 27 мкмоль/хв/мл відповідно. **Висновки.** Показано, що штам *P. restrictum* має високу секреторну здатність до продукції α -галактозидази за використання відповідних середовищ. Субстратна специфічність та висока швидкість гідролізу рафінози, стахіози, галактоманану відкриває широкі перспективи для використання α -галактозидази *P. restrictum* у харчовій, кормовій, паперовій промисловостях та технологіях переробки агровідходів.*

*Ключові слова: α -галактозидаза, *Penicillium restrictum*, рафіноза, стахіоза, галактоманан.*

Дослідження умов культивування продуцентів біотехнологічно важливих ензимів є запорукою ефективності процесів секреції та отримання кінцевого продукту [1]. Вже давно і успішно для отримання препаратів ензимів різної специфічності використовують метод глибинного культивування мікроорганізмів [2–4]. В такий спосіб отримують як позаклітинні, так і внутрішньоклітинні ензими. Підбір субстратів, джерел азоту та вуглеводу, індукторів дозволяє вирішувати задачі підвищення виходу біологічно активних сполук під час мікробного синтезу.

Представлена робота присвячена дослідженню деяких аспектів продукції α -галактозидази (КФ 3.2.1.22) мікроміцетом *Penicillium restrictum*. α -Галактозидаза – ензим, який гідролітично відщеплює термінальні невідновлені залишки D-галактози, які присутні як у синтетичних, так і природних глікозидах, олігополісахаридах, гліколіпідах й різних глікокон'югатах. Ензим має значний потенціал в різних промислових секторах, особливо в харчовій промисловості

та виробництві кормів [5]. У буряково-цукровому виробництві застосування ензиму дозволяє збільшити вихід цукру з бурякової меляси за рахунок гідролізу галактоолігосахаридів [6]. Крім того, здатність α -галактозидази гідролізувати олігосахариди родини рафінози дозволяє використовувати її для покращення якості продуктів із сої, інших бобових та овочів [7], а також залучати ензим до технології попередньої обробки кормів з метою підвищення їхньої поживності. Показано, що в комбінації з β -мананазою ензим може бути використаний для відбілювання сировини в паперовому виробництві [8]. Таким чином, потенціал мікробних α -галактозидаз є незаперечним і базується на їхній технологічній та комерційній привабливості, хоча вартість ензиму досі обмежує рентабельність застосування α -галактозидази у багатьох галузях. Для подолання цього недоліку розробляються різні методи отримання ензиму, в тому числі використання в якості субстратів для культивування мікроорганізмів дешевої сировини з відходів

агропромисловості, таких як солома, фруктова та овочева макуха, меляса, геміцелюлоза. Використання таких субстратів для культивування продуцентів α -галактозидаз може, з одного боку, знижувати вартість ензиму, а з іншого – одночасно дозволяє отримувати цукри та біоетанол [5, 6], що сприяє циркулярній економіці.

Метою нашої роботи було дослідити деякі параметри культивування мікроміцета *P. restrictum*, встановити джерела вуглецю та азоту, які забезпечуватимуть високі рівні активності α -галактозидази, а також оцінити здатність культури гідролізувати деякі галактозовмісні вуглеводи.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження була ензиматична активність культури *Penicillium restrictum* Gilman & Abbott, виділеної у 2018 р. з верхнього шару ґрунту (2 см) під ялиною у с. Новосепелічі Чорнобильської зони відчуження. Штам зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером ІМВ F-100139.

Культивування *P. restrictum* для дослідження ензиматичної активності проводили в глибинних умовах з перемішуванням у колбах Ерленмейера за температури 25 °С зі швидкістю обертання 220 об/хв протягом 5 діб на середовищі наступного складу, г/л: мальтоза – 5,0; KH_2PO_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 – 20, рН 6,0.

Після закінчення ферментації біомасу відділяли фільтруванням. Глікозидазні активності визначали в супернатанті культуральної рідини за допомогою *n*-нітрофенільних субстратів (“Sigma-Aldrich”, США): *n*-нітрофеніл- α -D-глюкопіранозид, *n*-нітрофеніл- β -D-глюкопіранозид, *n*-нітрофеніл- α -D-галактопіранозид, *n*-нітрофеніл- β -D-галактопіранозид, *n*-нітрофеніл- β -D-глюкуронід, *n*-нітрофеніл- α -D-манопіранозид, *n*-нітрофеніл- α -D-ксилопіранозид, *n*-нітрофеніл- β -D-ксилопіранозид, *n*-нітрофеніл- α -D-фукопіранозид, *n*-нітрофеніл-N-ацетил- α -D-глюкозамін, *n*-нітрофеніл-N-ацетил- β -D-глюкозамін, *n*-нітрофеніл-N-ацетил- β -D-галактозамін, *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозид [9]. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка гідролізує 1 мкмоль субстрата за 1 хв в умовах досліду.

Визначення швидкості розщеплення рафінози, стахіози та галактоманану гуару проводили у супернатанті *P. restrictum* за оцінкою кількості галактози, що утворилася в результаті гідролізу відповідного субстрату. Кількість галактози визначали динітросаліциловим методом [10]. Реакційну суміш, що містила 0,25 мл культуральної рідини та 0,25 мл субстрату (1 % галактоманану або 50 мМ розчинів рафінози та стахіози в 0,1 М фосфатно-цитратному буфері (ФЦБ), рН 5,2), інкубували 60 хв при 40 °С, потім додавали 0,25 мл динітросаліцилового реактиву й кип'ятили протягом 10 хв. Інтенсивність забарвлення оцінювали спектрофотометрично при 500 нм. Як стандарт використовували галактозу.

Загальну протеолітичну (казеїнолітичну) активність визначали методом Ансона в модифікації Петрової [11].

Дослідження впливу складу поживного середовища на активність α -галактозидази *P. restrictum* проводили у глибинних умовах у колбах Ерленмейера (швидкість обертання 241 об/хв, рівень аерації 16,76 мг O_2 /л/год) при 25 °С протягом 8 діб. Засів середовища проводили 5 % двохдобовим інокулюмом.

Для дослідження залежності ензиматичної активності у культуральній рідині *P. restrictum* від концентрації мінеральних сполук та джерела вуглецю було використано 10 середовищ наступного складу (в г/л):

- 1) KH_2PO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,8; CaCl_2 – 0,3; дріжджовий автолізат – 0,15; соєве борошно – 10,0; рамноза – 5,0;
- 2) KH_2PO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,8; CaCl_2 – 0,3; дріжджовий автолізат – 0,15; рамноза – 5,0;
- 3) KH_2PO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,8; CaCl_2 – 0,3; дріжджовий автолізат – 0,15; сахароза – 10,0; рамноза – 5,0;
- 4) KH_2PO_4 – 10,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 3,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; CaCl_2 – 1,0; дріжджовий автолізат – 0,15; соєве борошно – 10,0; рамноза – 5,0;
- 5) KH_2PO_4 – 10,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 3,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; CaCl_2 – 1,0; дріжджовий автолізат – 0,15; рамноза – 5,0;
- 6) KH_2PO_4 – 10,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 3,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; CaCl_2 – 1,0; дріжджовий автолізат – 0,15; сахароза – 10,0; рамноза – 5,0;
- 7) KH_2PO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,8; CaCl_2 – 0,3 г/л; грейпфрутова макуха – 20,0; рамноза – 5,0;
- 8) KH_2PO_4 – 10,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 3,0;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 2,0$; $\text{CaCl}_2 - 1,0$; грейпфрутова макуха – 20,0; рамноза – 5,0;

9) $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,6$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,8$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0,8$; $\text{CaCl}_2 - 0,3$; грейпфрутова макуха – 20,0;

10) $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,6$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,75$; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,25$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0,5$; дріжджовий автолізат – 0,15, галактоманан гуару — 10, 0, рН 6,0.

Для дослідження впливу різних концентрацій рамнози (1, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25 г/л) використовували середовище 5.

Для дослідження впливу різних джерел азоту на α -галактозидазну активність мікроміцета використовували базове середовище (у г/л): $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 10,0$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 3,0$; $\text{CaCl}_2 - 1,0$; рамноза – 5,0. Як джерела азоту було використано NaNO_2 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, сечовину, дріжджовий автолізат, дріжджовий екстракт, пептон, соєве борошно. Сполуки азоту було використано в концентрації 1 г N/л.

Вміст загального протеїну у супернатанті культуральної рідини визначали за методом Лоурі [12]. Калібрувальну криву будували з використанням як стандарту бичачого сироваткового альбуміну.

Усі досліді проводили у 3–5 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводився шляхом їх статистичної обробки з використанням t -критерію Стюдента. Результати, що подані графічно, отримували за допомогою програми Microsoft Excel 2007. Значення при $P < 0,05$ розглядали як достовірні.

Результати. Важлива деструктивна роль мікроміцетів у ґрунтових біогеоценозах пояснюється їхньою ензиматичною активністю щодо широкого кола субстратів. Їхня целюлозолітична, манан-деградувальна, протеолітична активність дозволяє їм здійснювати редукцію органічних речовин та ефективно конкурувати за джерела живлення та енергії.

Дослідження ензиматичної активності мікроміцета *P. restrictum* показало наявність у супернатанті культуральної рідини 8 з 14 досліджених глікозидазних активностей (рис. 1). Домінуючою виявилася α -галактозидазна активність (2,62 од/мл). Також у культуральній рідині були відмічені високі рівні активності α -рамнозидази та β -глюкозидази. Наявність комплексу α - та β -галактозидази, β -глюкозидази, N-ацетил- β -D-глюкозамінідази та N-ацетил- β -D-галактозамінідази може свідчити про здатність *P. restrictum* гідролізувати широкий спектр рослинних субстратів та частково деградувати целюлозу й геміцелюлозу. У ґрунтових мікроміцетів поряд з активністю глікозидаз часто відмічають і протеолітичну активність, яка дозволяє грибам виконувати роль активних біодеструкторів. Проте у *P. restrictum* нами не була виявлена така активність. Дана властивість культури може дозволити уникнути в майбутньому інактивації α -галактозидази протеазами під час виділення та очистки препарату ензиму.

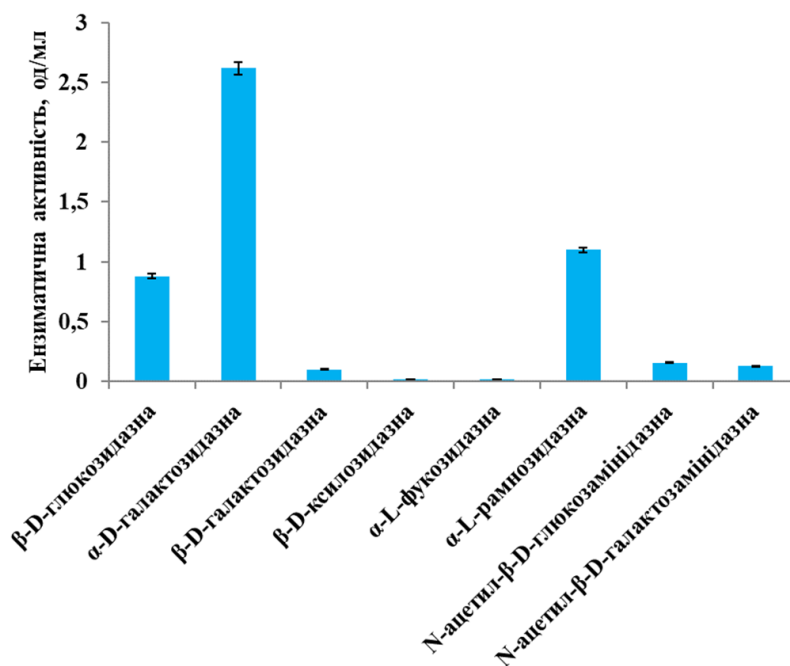


Рис. 1. Спектр глікозидазних активностей у супернатанті культуральної рідини *P. restrictum*

Беручи до уваги високу швидкість гідролізу синтетичного субстрату α -галактозидазою *P. restrictum*, доцільно було дослідити її активність щодо деградації таких галактоолігосахаридів як рафіноза, стахіоза та галактоманан. Було показано, що швидкість гідролізу цих субстратів

зменшувалася зі зростанням молекулярної маси (рис. 2). Також швидкість відщеплення галактози від основного ланцюга олігосахаридів (рафінози та стахіози) була значно вищою, ніж при розщепленні галактозидного зв'язку бічних ланцюгів манану.

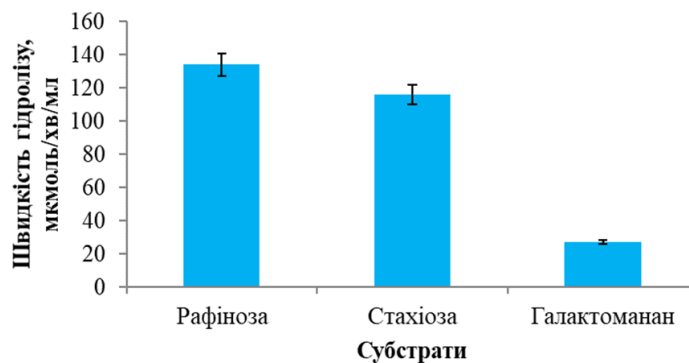


Рис. 2. Швидкість гідролізу галактозовмісних вуглеводів α -галактозидазою *P. restrictum*

Відомо, що активність індукцибельних глікозидаз мікроміцетів може бути підвищена шляхом оптимізації живильного середовища та використання рослинних субстратів, багатих на органічні джерела вуглецю та азоту [2–4, 7]. До таких субстратів відносяться камеді, соєве, рисове, кокосове борошно, насіння, солома, макуха, отримана в процесі переробки овочів та фруктів [1, 3].

Для дослідження особливостей продукції α -галактозидази культурою *P. restrictum* було використано 10 різних середовищ, в яких варіювали джерела вуглецю й азоту та концентрацію мінеральних солей. Мінеральний склад середовища було вибрано на підставі попередніх досліджень [13, 14], але було використано різні концентрації солей. Так, у середовищах 1–3, 7, 9 та 10 солі були використані у концентрації (у г/л): K_2HPO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,8; CaCl_2 – 0,3, а у середовищах 4–6 та 8 – K_2HPO_4 – 10,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 3,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; CaCl_2 – 1,0. Рамноза, сахароза та галактоманан були відібрані на підставі літературних даних щодо їхньої ефективності для підвищення виходу α -галактозидаз [2–5]. Соєве борошно та грейпфрутову макуху, яку ми отримували шляхом подрібнення цілих плодів після вичавлювання соку, також неодноразово успішно використовували для отримання глікозидаз інших мікроміцетів [3, 13–15]. Було показано, що максимальні рівні активності α -галактозидази (4,47 та 6,05 од/мл)

припадали на 7 добу культивування мікроміцета на середовищах 1 та 4 відповідно (рис. 3). При подовженні часу інкубації активність починала знижуватися, хоча все ще залишалася високою. В обох випадках було використано однакові концентрації соєвого борошна та рамнози, але середовище 4 містило більші концентрації мінеральних солей. Заміна соєвого борошна на галактоманан або грейпфрутову макуху (середовища 7–10) супроводжувалася зменшенням ензиматичної активності на 90–95 %. Шкірки грейпфрутів та фруктова макуха, які містять велику кількість вуглеводів, протеїнів, кислот є багатим джерелом поживних речовин та енергії. Наші результати продемонстрували низьку ензиматичну активність за використання грейпфрутової макухи та галактоманану, хоча культура була здатна ефективно використовувати ці субстрати, про що свідчать показники кількості секреторного протеїну у культуральній рідині. Так, концентрації протеїну на 5–7 добу культивування на середовищах 7, 8, 9, 10 склали 2,4–1,94; 2,05–1,92; 1,96–1,61 та 0,6–0,4 мг/мл відповідно. Низьку активність за цих умов можна пов'язати або з інгібуванням ензиму високими концентраціями утвореної галактози під час гідролізу галактоманану, або з присутністю якихось природних інгібіторів ензиму у шкірках грейпфруту, що не дозволяє рекомендувати дані субстрати для культивування *P. restrictum* з метою отримання α -галактозидази.

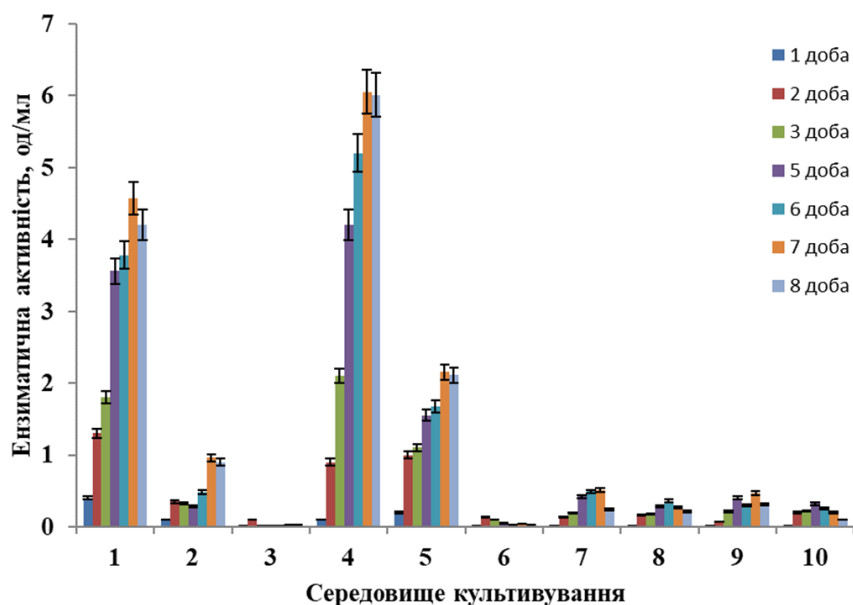


Рис. 3. Активність α -галактозидази *P. restrictum* на різних середовищах в залежності від часу культивування (22 °С)

Дослідження деяких параметрів продукції α -галактозидази *P. restrictum* на середовищах 1, 2, 4, 5 показали (рис. 3, 4А), що накопичення протеїну та ензиму не співпадають у часі як у присутності, так і за відсутності соєвого борошна. В усіх випадках максимум продукції протеїну припадав на 5–6 добу культивування, а зростання ензиматичної активності продовжувалося до 7 доби. При цьому найвищі показники продуктивності (0,035–0,037 од/мл/год) спостерігали на середовищі 4 на 5–7 добу, в той час як на інших середовищах культура досягала максимуму продуктивності на 2 добу, однак показники були значно нижчими (рис. 4Б). Таким чином, показано, що середовища 4 та 5, в яких було збільшено концентрації K_2HPO_4 з 1,6 до 10 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ з 0,8 до 3,0 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з 0,8 до 2,0 г/л та CaCl_2 з 0,3 до 1,0 г/л, за інших рівних умов дозволяють подовжити період продукції α -галактозидази *P. restrictum* та отримати більший вихід ензиму.

Було відмічено активуючий вплив рамнози (середовища 1, 2, 4, 5) у порівнянні з використанням сахарози (середовища 3 і 6) (рис. 3). Раніше нами вже відмічалася індукція синтезу глікозидаз у присутності рамнози, яка мала як специфічний, так і неспецифічний характер. Так, індукція синтезу нарингінази може бути пояснена специфічністю до субстрату [16], а підвищення виходу манан-деградувальних ензимів дріжджів при культивуванні на середовищі з рамнозою пов'язано з іншим фізіологіч-

ним механізмом і особливостями метаболізму продуцентів [17].

В результаті дослідження різних концентрацій рамнози за відсутності соєвого борошна у поживному середовищі встановлено, що концентрація 4–5 г/л забезпечувала найвищі показники активності α -галактозидази (рис. 5). При збільшенні концентрації рамнози відмічали збільшення продукції протеїну культурою, але ензиматична активність при цьому стрімко знижувалася. Індукційний ефект рамнози може бути пов'язаним як з фізіологічними особливостями мікроміцету, так і з впливом безпосередньо на ензим. Ці питання потребують подальшого дослідження, особливо беручи до уваги той факт, що рамноза не є субстратом або продуктом реакції для α -галактозидази.

Всі використані джерела азоту, крім нітриту натрію, забезпечували продукцію α -галактозидази. Найвища активність була показана за використання сульфату та нітрату амонію (рис. 6). На природних азотних джерелах ензиматична активність була нижчою, ніж на мінеральних, а найвищий рівень накопичення протеїну та ензиму спостерігався при додаванні пептону як єдиного джерела азоту. Однак найбільш ефективною була комбінація сульфату амонію (2 г/л) та соєвого борошна (10 г/л). В цьому випадку активність була вищою більш, ніж на 80 % у порівнянні з використанням однієї сполуки. Ефективність соєвого борошна пояснюється як високим вмістом

джерел органічного азоту, так і значною кількістю вуглеводів. Всі ці фактори необхідні як

для росту мікроорганізму, так і для біосинтезу протеїну.

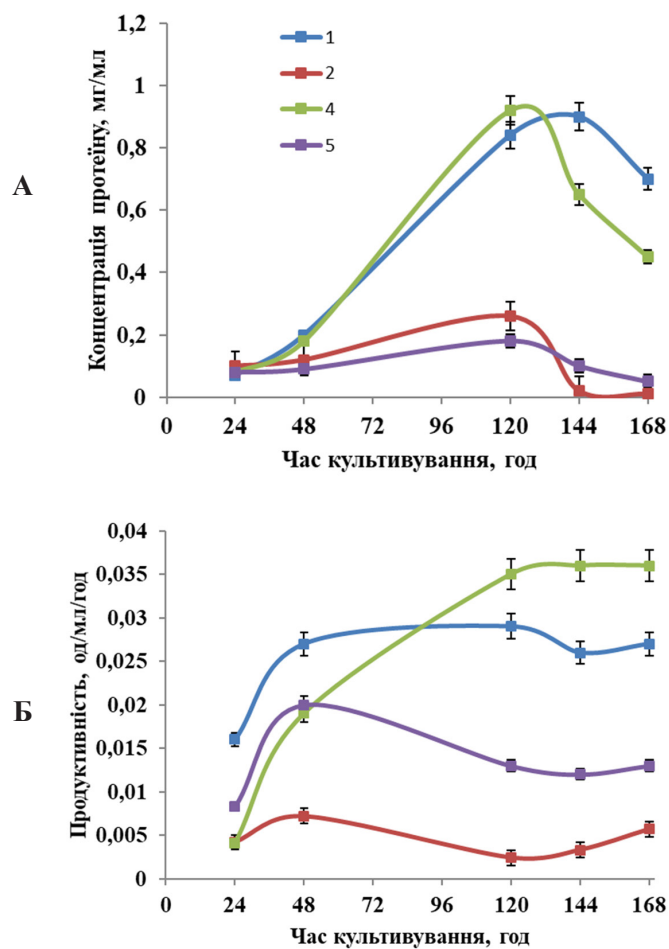


Рис. 4. Накопичення протеїну (А) та продуктивність (Б) *P. restrictum* на середовищах 1, 2, 4, 5 в залежності від часу культивування

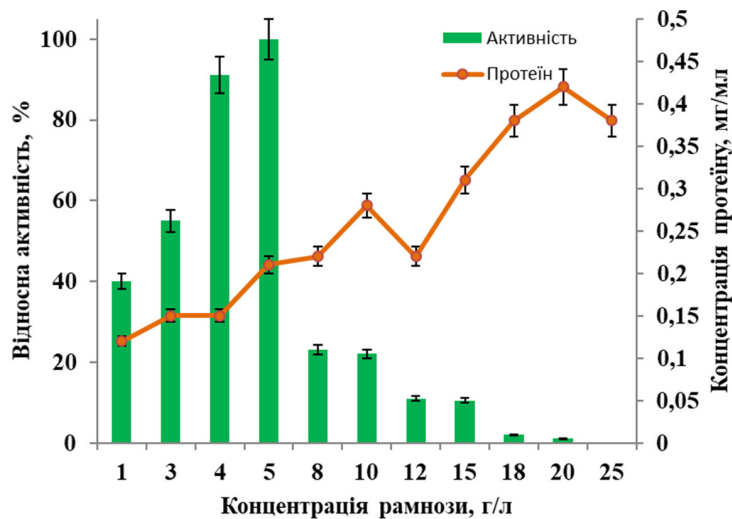


Рис. 5. Залежність активності α -галактозидази *P. restrictum* від концентрації рамнози (7 доба культивування, 22 °С)

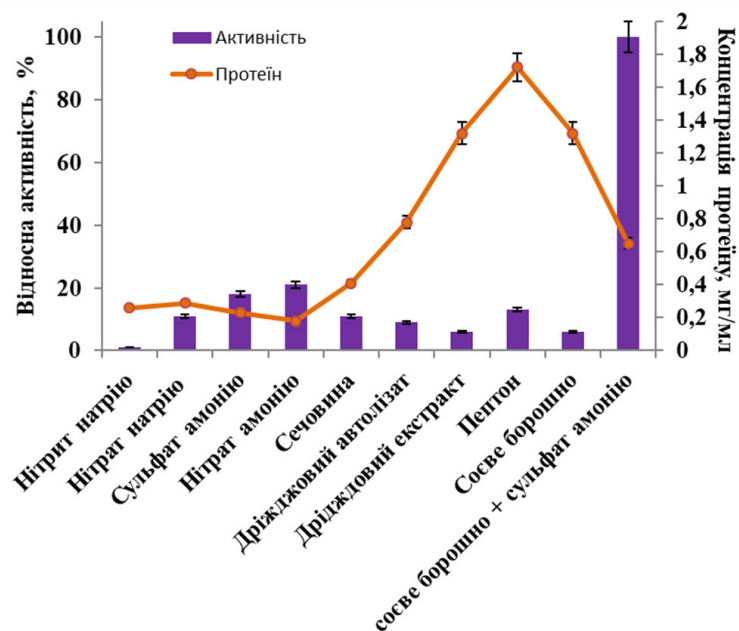


Рис. 6. Залежність активності α -галактозидази *P. restrictum* від джерела азоту (7 доба культивування, 22 °С)

Обговорення. Отримання біологічно активних речовин різної природи за допомогою мікроміцетів є пріоритетним напрямком практичної ензимології та біотехнологічного виробництва. Особливо активними продуцентами ензимів різної специфічності серед мікроміцетів є представники родів *Aspergillus* та *Penicillium* [15, 18–20]. Це пов'язано з їхньою багатoproфільною ензиматичною системою, високою активністю та стабільністю секреторних ензимів, невибагливістю до умов культивування. Зазвичай у культуральній рідині мікроміцетів відмічається широкий спектр глікозидазних активностей, але при цьому відсутня однорідність всередині як роду, так і виду. У *P. restrictum* нами відмічались 8 глікозидазних активностей, в той час як у *Penicillium canescens* та *Aspergillus niger* – по 5 та 6 відповідно, а у *Cladosporium cladosporioides* – тільки 3 [13, 14]. Слід відмітити, що в усіх випадках, поряд з α -галактозидазою, відмічали присутність β -галактозидази та β -глюкозидази. Також часто у продуцентів α -галактозидаз відмічають присутність N-ацетил- β -D-глюкозамінідази [3, 7, 20]. Така ензиматична активність ґрунтових мікроміцетів, скоріш за все, пов'язана з їхніми еколого-фізіологічними особливостями.

Оскільки α -галактозидаза відноситься до біотехнологічно важливих ензимів, нами було досліджено деякі умови продукції α -галактозидази ґрунтовим мікроміцетом *P. restrictum*. Відомо, що утворення позаклітинних ензимів мікромі-

цетами знаходиться у тісному зв'язку зі складом поживного середовища та умовами культивування. Варіювання параметрів вирощування продуцента дозволяє підвищити продуктивність культури та активність ензиму, а використання відповідних субстратів дозволяє збільшити вихід ензимів або інших біологічно активних речовин.

Багаті на рослинні полімери субстрати традиційно використовують для культивування продуцентів різних глікозидаз [18]. Високі показники активності α -галактозидази було отримано при культивуванні *Saccharomyces cerevisiae* на буряковій мелясі, що багата на сахарозу та галактоолігосахариди [6]. Галактоманан та соєве борошно забезпечували високі показники α -галактозидазної активності у *A. niger*, *A. oryzae*, *C. cladosporioides*, *P. canescens*, *P. ochrochloron* [2, 7, 13, 14, 21]. Екстракт соєвого шроту дозволяв отримувати α -галактозидазу *Penicillium chrysogenum* та *A. niger* з активністю 4,2 та 7 од/мл культурального середовища [3]. Галактозу, мелібіозу, рафінозу використовували для ферментації *Aspergillus fumigatus* та *C. cladosporioides* [14, 22]. Високий вихід секреторних ензимів отримували при вирощуванні *Penicillium glabrum*, *Trichoderma evansii*, *Lasiodiplodia theobromae* та *Penicillium flavus* на галактоманані, соєвому казеїні та пшеничній соломі [2]. Було показано, що активність α -галактозидази *P. restrictum* варіювала в залежності від часу культивування

та субстрату (рис. 3). Показано високу ефективність використання одночасно рамнози та соєвого борошна для продукції α -галактозидази *P. restrictum*. Соєве борошно у середовищі росту виступає як джерело азоту та вуглецю, оскільки містить до 10 % протеїну та значні кількості полісахаридів. Відомо, що швидкість продукції ензимів залежить від складу та доступності субстрату, наявності індукторів й інгібіторів та може обмежуватися специфічністю дії ензиму. Так, грейпфрутова макуха та галактоманан гуару цілком задовольняли енергетичні потреби культури *P. restrictum*, кількість секреторного протеїну за їхнього використання була високою (до 2,4 мг протеїну/мл культурального середовища), але активність α -галактозидази була на рівні 0,32–0,49 од/мл, тобто більш, ніж у 10 разів нижчою, ніж на рамнозі та соєвому борошні.

Оптимальний час інкубації для забезпечення максимального виходу ензиму залежить від фізіологічних особливостей продуцента. Так, наші дослідження показали, що максимуму активності *P. restrictum* досягав на 7 добу культивування, тоді як для *P. chrysogenum*, *C. cladosporioides* та *A. niger* – на 5–6 добу [3, 13, 14], а *A. fumigatus*, *P. canescens* – на 48 год [14, 22]. В той же час нами було показано, що максимума ензиматичної активності та продуктивності на різних середовищах не співпадали у часі, що є характерним для синтезу вторинних метаболітів. Так, активність продовжувала збільшуватися на фоні зниження загальної секреції протеїну, що може бути наслідком або індукції активності якимись новоутвореними метаболітами культури, або навпаки – руйнуванням інгібіторів. Таким чином, це питання потребує додаткових досліджень для виявлення зв'язку між активністю α -галактозидази за одиницю часу та продукцією ензиму. Також слід відмітити, що збільшення концентрації мінеральних солей дозволяло отримувати вищі показники активності протягом всього періоду ферментації.

Для використання ензиму у різних технологічних процесах дуже важливим є питання його субстратної специфічності, оскільки саме цей показник дозволяє окреслити галузі його можливого використання. Досліджена культура проявляла активність щодо таких галактоолігосахаридів як рафіноза та стахіоза. Присутність цих вуглеводів у буряковій меласі знижує вихід цукру [6], а у соєвих продуктах – є причиною ускладненого перетравлення їжі [5, 7, 15, 23]. За допомогою гідролітичного відщеплення

α -галактозидазою α -1,6-зв'язаної галактози олігосахаридів можна досягти як збільшення виходу цукру при обробці сировини, так і покращення якості готового продукту. Рівень активності у культуральній рідині *P. restrictum* щодо рафінози та стахіози був на рівні 134 та 116 од/мл відповідно, що відповідає рівню найкращих продуцентів *Mortierella vinaceae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium purpurogenum* [5, 20, 23] та є вищим за активність досліджених раніше у нашому відділі α -галактозидаз *C. cladosporioides* та *A. niger* [13, 14]. Хоча галактоманан гуару і не забезпечував високої активності та виходу ензиму при додаванні до середовища росту, але досить ефективно піддавався гідролізу культурою *P. restrictum* (рис.2). Невисоку активність можна пояснити накопиченням галактози у середовищі росту, що за певних концентрацій призводить до інгібування ензиматичної активності. Специфічність α -галактозидази *P. restrictum* щодо галактоманану гуару свідчить про здатність гідролізувати α -1,6-зв'язану галактозу бічних ланцюгів полісахаридів, що є цінною властивістю, яка розширює можливості використання ензиму.

Таким чином, було показано, що штам *P. restrictum* має високу секреторну здатність до продукції α -галактозидази за використання відповідних середовищ. Досліджена культура показала високу швидкість гідролізу галактоолігосахаридів рафінози та стахіози, а також галактоманану. Така субстратна специфічність дозволяє передбачати значний біотехнологічний потенціал культури у харчовій, кормовій та паперовій галузях та може бути рекомендована для залучення у технології переробки агровідходів для отримання вуглеводів та біопалива.

FEATURES OF α -GALACTOSIDASE PRODUCTION BY *PENICILLIUM RESTRICTUM*

N.V. Borzova, O.V. Gudzenko, L.D. Varbanets

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

Summary

Optimization of producer culture conditions is a necessary step in obtaining biotechnologically important enzymes. **The aims were** to investigate some parameters of *Penicillium restrictum* Gilman & Abbott cultivation, identify carbon and nitrogen sources

that will provide high α -galactosidase activity, and evaluate the culture's ability to hydrolyze galactose-containing carbohydrates. **Methods.** Micromycete was grown in submerged cultivation conditions at 25 °C. Rhamnose, sucrose, guar galactomannan, grapefruit mill, soy flour, NaNO₂, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂NO₃, urea, yeast autolysate, yeast extract, peptone were used as carbon and nitrogen sources. Glycosidase activity was determined using synthetic nitrophenyl substrates; the ability to hydrolyze raffinose, stachyose and galactomannan was evaluated by the dinitrosalicylic method. **Results.** It was found that the maximum of α -galactosidase activity (6.05 U/ml) and productivity (0.036 U/ml/h) of

P. restrictum was observed on the 7th day of incubation in case of rhamnose, soy flour and ammonium sulfate using. The hydrolysis rate of raffinose, stachyose and galactomannan was 133, 116 and 27 μ mol/min/ml, respectively. **Conclusions.** The high *P. restrictum* ability to produce α -galactosidase was shown using appropriate media. The substrate specificity and high rate of hydrolysis of raffinose, stachyose, galactomannan opens up broad prospects for α -galactosidase from *P. restrictum* use in food, feed, paper industry and agricultural waste processing technologies.

Keywords: α -galactosidase, *Penicillium restrictum*, raffinose, stachyose, galactomannan.

1. Renge VC, Khedkar SV, Nandurkar NR. Enzyme synthesis by fermentation method: a review . Sci Revs Chem Commun. 2012; 2(4):585–590.
2. Goundar R, Mulimani VH. Purification and characterization of guar galactomannan degrading α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* DR-5. J Microbiol Biotechnol. 2004; 14(4):863–867.
3. Aleksieva P, Tchobanov B, Nacheva L. High-yield production of alpha-galactosidase excreted from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger*. Biotechnol Biotechnological Equipment. 2010; 24(1):1620–1623.
4. Chauhan AS, Srivastava N, Kehri HK, Sharma B. Optimization of culture conditions for some identified fungal species and stability profile of α -galactosidase produced. Biotechnol Res Int 2013; 2013:920759.
5. Katrolia P, Rajashekhara E, Yan Q, Jiang Z. Biotechnological potential of microbial α -galactosidases. Crit Rev Biotechnol, 2014; 34(4):307–317.
6. Alvarez-Cao ME, Cerdan ME, Gonzalez-Siso MI, Becerra M. Bioconversion of beet molasses to alpha-galactosidase and ethanol. Front Microbiol. 2019;10:405.
7. Kapnoor S, Veerappa Mulimani VH. Production of α -galactosidase by *Aspergillus oryzae* through solid-state fermentation and its application in soymilk galactooligosaccharide hydrolysis. Braz Arch Biol Technol. 2010, 53(1):211–218.
8. Malgas S, van Dyk JS, Pletschke BI. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. World J Microbiol Biotechnol. 2015; 31(8):1167–1175.
9. Chaplin ME, Kennedy JE. Carbohydrate analysis. Oxford: IRL Press, 1986. 228 p.
10. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem. 1959; 31:426–428.
11. Petrova IS, Vintsyunayte MN. [Determination proteolytic activity enzyme preparations of microbial origin]. Prikl Biokhim Mikrobiol. 1966; 2(1):322–327. Russian.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folinphenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(2):265–275.
13. Borzova NV, Malanchuk VM, Varbanets LD, Seifullina II, Zubkov SV. [Optimization of culture conditions of *Aspergillus niger* for the synthesis of alpha-N-acetylgalactosaminidase and alpha-galactosidase]. Mikrobiol Z. 2001; 63(4):27–36. Russian.
14. Buglova TT, Malanchuk VM, Elanskaya IA, Zaichenko AM, Zakharova IYa. [Physiological and biochemical peculiarities of some alpha-galactosidase producers]. Mikrobiol Z. 1991; 53(6):34–41. Russian.
15. Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyma SB, Abraham A, Mathew AK, Madhavan A, Rebello S, Pandey A. Applications of microbial enzymes in food industry. Food Technol Biotechnol. 2018; 56(1):16–30.

16. Borzova N, Gudzenko O, Varbanets L. Purification and characterization of a naringinase from *Cryptococcus albidus*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018; 184(3):953–969.
17. Borzova NV, Gladka GV, Varbanets LD, Tashyrev AB. [β -Mannanase activity of yeasts isolated in Antarctic]. *Microbiol. Z.* 2018; 80(2):28–43. Russian.
18. Vittaladevaram V. Fermentative production of microbial enzymes and their applications: Present status and future prospects. *J Appl Biol Biotechnol*. 2017; 5(4):90–94.
19. 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. doi: 10.1007/s11274-019-2591-3.
20. Bhatia S, Singh A, Batra N, Singh J. Microbial production and biotechnological applications of α -galactosidase. *Int J Biol Macromol*. 2019; pii: S0141-8130(19)34841-X. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.140.
21. Dey PM, Patel S, Brownleader MD. Induction of alpha-galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonobola*) gum. *Biotechnol Appl Biochem*. 1993; 17(3):361–371.
22. de Rezende ST, Guimaraes VM, de Castro Rodrigues M, Felix CR. Purification and characterization of an α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Braz Arch Biol Technol*. 2005; 48(2):195–202.
23. Ramalingam R, Saraswathy N, Sadasivam S. Degradation of flatulence-causing oligosaccharides in soymilk by α -galactosidase – a novel thermotolerant from *Penicillium purpurogenum*. *Indian J Biotechnol*. 2010; 9:160–165.

Отримано 7.02.2020