

## ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *PENICILLIUM RESTRICTUM* НА $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗНУ АКТИВНІСТЬ

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

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

Ефективність процесу отримання ферментів шляхом мікробіологічного синтезу в значній мірі залежить від оптимізації умов культивування продуцента. **Мета.** Дослідити вплив основних компонентів поживного середовища та умов культивування на рівень позаклітинної  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності *Penicillium restrictum*. **Методи.** Культуру мікроміцета вирощували глибинним способом при 25 °С протягом 7 діб.  $\alpha$ -L-Рамнозидазну активність визначали за допомогою *p*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду в супернатанті культуральної рідини *P. restrictum*. Як джерела вуглецю та азоту було використано: ксилозу, арабінозу, глюкозу, галактозу, рамнозу, манозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маніт, нітрат натрію, нітрит натрію, сульфат амонію, нітрат амонію, дріжджовий автолізат, дріжджовий екстракт, пептон, сечовину, соєве борошно. На середовищі, оптимізованому за джерелами вуглецю і азоту досліджували вплив параметрів культивування: рН середовища (3,0–8,0), температури (25–42 °С) і об'єму середовища (50–250 мл). **Результати.** Встановлено, що найвищі показники  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності *P. restrictum* відмічено на сьому добу культивування за використання як джерела вуглецю рамнози в концентрації 5 г/л та джерела азоту — 0,8 г/л сульфату амонію. Найбільш ефективним для синтезу  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. restrictum* було використання середовища з початковим значенням рН 6,0 за температури 25 °С та об'єму живильного середовища в колбах 100 мл. **Висновки.** Високу  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність можна отримати шляхом глибинного культивування *P. restrictum*. Комбінація рамнози та сульфату амонію забезпечує  $\alpha$ -рамнозидазну активність культури на рівні 1,2 од/мл.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -L-рамнозидаза, *Penicillium restrictum*, параметри культивування, джерела вуглецю і азоту.

Рослинні флавоноїди (флавоноїди, флаванони та флаволи) є невід'ємною складовою раціону людини. Найпоширенішими флавоноїдами в продуктах харчування є флавоноли, що включають в себе кверцетин, його глікозид рутин (кверцетин-3-рутинозид), кемпферол, ізорхамнетин та його глікозид нарцисин (ізорамнетин-3-рутинозид). Основними джерелами цих сполук є цибуля та брокколі, а також абрикоси, червоне вино, зелений чай та шоколад. Такі флаванони як нарингенін, гесперетин та їх глікозиди містяться в грейпфрутах, апельсинах, помідорах та ароматичних рослинах. Широко представлені в продуктах харчування є також флаволи апігенін та лютеолін, які містяться у червоному перці та селері; ізофлаволи присутні у сої або червоній конюшині [1–5].

Зростання інтересу до флавоноїдів в останні десятиліття пов'язане з їхніми протизапальними, антиоксидантними, антимуtagenними, антипроліферативними та антиатерогенними властивостями, які показані для ізорхамнетину, нарінгеніну, гесперетину, кверцетину та його глікозиду рутину, нарцисину, нарінгину (нарінген-7-неогесперидозиду), гесперидину (гесперетин-7-рутинозиду) та ін. [6–9]. Ці сполуки є незамінними у лікуванні різних нейродегенеративних, пухлинних та серцево-судинних захворювань, включаючи атеросклероз, тромбоз та гіпертонію. Більшість флавоноїдів існує у глікозильованій рутинозою (6-О- $\alpha$ -1-рамнопіранозил-Д-глюкоза) або неогесперидозою (2-О- $\alpha$ -1-рамнопіранозил-Д-глюкоза) формі. Оскільки таке глікозильовання перешкоджає

всмоктуванню флавоноїдів у тонкому кишківнику, для збільшення ефективності метаболізації флавоноїдних глікозидів необхідний фермент  $\alpha$ -L-рамнозидаза [Е.С. 3.2.1.40], що відщеплює термінальну  $\alpha$ -L-рамнозу, присутню в більшості флавоноїдів [2, 4, 6, 8, 9]. Фермент широко представлений у різних живих організмах: він присутній в тканинах тварин і рослин, продукується багатьма видами дріжджів, грибів і бактерій. Біотехнологічний потенціал ферменту в основному пов'язаний з можливістю його використання для дерамнозилювання природних продуктів з метою одержання сполук медико-фармацевтичного призначення, а також для залучення його у харчові технології покращення якості цитрусових соків та підсилення аромату виноградних вин [4, 6, 9, 10].

Всі ці галузі потребують високоактивних та високоспецифічних ензимів. На сьогодні найдоцільнішим за економічністю та ефективністю є біотехнологічний спосіб отримання ферментних препаратів шляхом мікробного синтезу. Тому актуальними є дослідження умов культивування нових продуцентів ферментів серед мікроорганізмів, зокрема мікроскопічних грибів.

Зважаючи на викладене, **метою** наших досліджень було дослідити вплив основних компонентів поживного середовища та умов культивування на рівень позаклітинної  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності *Penicillium restrictum* ІМВ F-100139.

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

Дослідження впливу складу поживного середовища на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність *P. restrictum* проводили у глибинних умовах у колбах Ерленмейєра (750 мл) (швидкість обертання – 250 об/хв) при 25 °С протягом 7 діб. Засів середовища проводили 5 % (v/v) двоходовим інокулюмом.

Для дослідження залежності ферментативної активності культуральної рідини *P. restrictum* від концентрації мінеральних сполук та джерела вуглецю було використано 9 середовищ наступного складу (в г/л):

1)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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; дріжджовий автолізат – 0,15; соєве борошно – 10,0; рамноза – 5,0;

2)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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; дріжджовий автолізат – 0,15; рамноза – 5,0;

3)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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; дріжджовий автолізат – 0,15; сахароза – 10,0; рамноза – 5,0;

4)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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; дріжджовий автолізат – 0,15; соєве борошно – 10,0; рамноза – 5,0;

5)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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; дріжджовий автолізат – 0,15; рамноза – 5,0;

6)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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; дріжджовий автолізат – 0,15; сахароза – 10,0; рамноза – 5,0;

7)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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 г/л; грейпфрутова макуха – 20,0; рамноза – 5,0;

8)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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; рН 6,0.

Для дослідження впливу різних джерел вуглецю на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність мікроміцета використовували середовище 2. Як джерела вуглецю було використано (в концентрації 5 г/л): ксилізу, арабінозу, глюкозу, галактозу, рамнозу, манозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маніт. Рамнозу вносили також у концентрації від 1 до 25 г/л.

Для дослідження впливу різних джерел азоту на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність мікроміцета використовували середовище 2, в якому дріжджовий автолізат був замінений на інші джерела азоту:  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ , сечовину, дріжджовий екстракт, пептон, соєве борошно. Сполуки азоту вносили в концентрації 1 г N/л.

Для дослідження впливу параметрів культивування штам вирощували на середовищі, оптимізованому за джерелами вуглецю і азоту, змінюючи початкове рН середовища (3,0–8,0), температуру (25–42 °С) і об'єм середовища (50–250 мл). Початкове рН середовища створювали за допомогою 1 М розчинів  $\text{NaOH}$  і  $\text{HCl}$ .

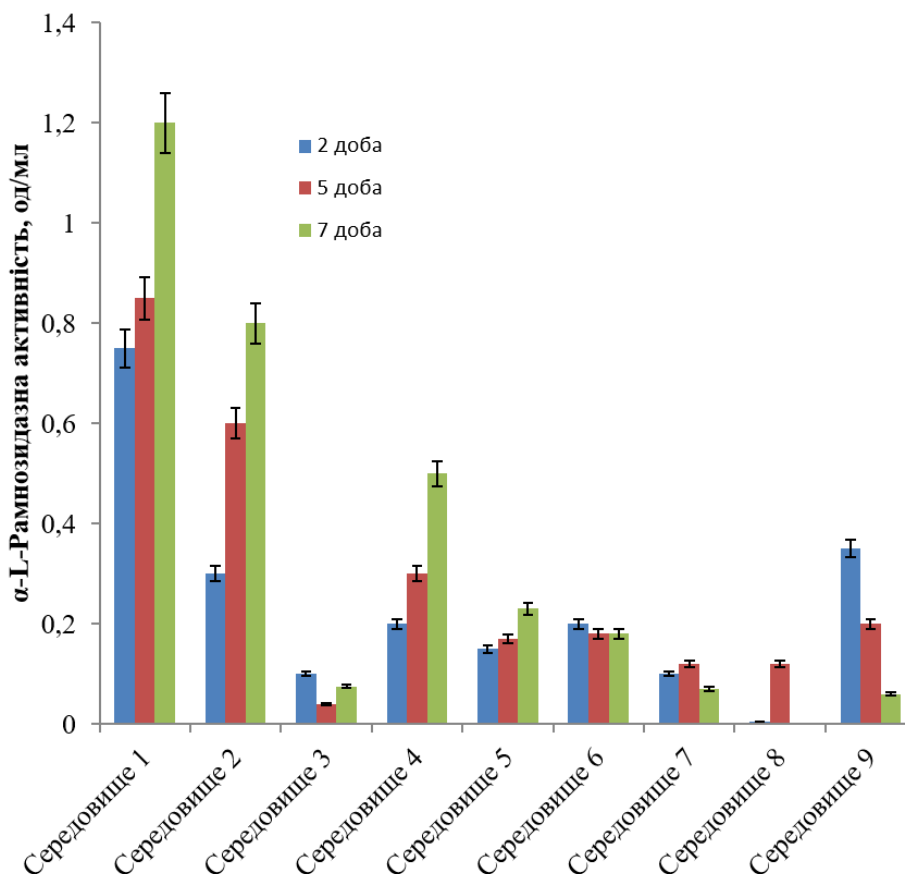
Для визначення  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності до 0,1 мл розчину супернатанту культуральної рідини додавали 0,2 мл 0,1 М фос-

фатно-цитратного буферу (ФЦБ), рН 5,2 та 0,1 мл 0,01 М розчину субстрату (*n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид, “Sigma-Aldrich”, США) у ФЦБ. Реакційну суміш інкубували протягом 10 хв при температурі 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 1 М розчину бікарбонату натрію. До контролю додавали ті ж компоненти, але у зворотному порядку. Кількість *n*-нітрофенолу, який було відщеплено у результаті гідролізу, визначали колориметричним методом на спектрофотометрі СФ-26 за поглинанням при 400 нм [11]. За одиницю активності ферменту приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах дослідю.

Усі дослідю 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.** Відомо [12–25], що одним зі шляхів активації продукції ферментів є оптимізація поживного середовища за мінеральними компонентами та джерелами вуглецевого і азотного живлення. Нами були використані 9 поживних середовищ, в яких варіювали джерела вуглецю й азоту та концентрація мінеральних солей. Подібні середовища, згідно літературних даних [14–25], найчастіше використовують для отримання максимального синтезу  $\alpha$ -L-рамнозидаз. Показано, що найвищі показники (1,2 од/мл) відмічали при вирощуванні продуцента на середовищі № 1 на 7-у добу культивування, дещо нижчою (0,45–0,78 од/мл) була активність на середовищах № 2 та № 4 (рис.1).



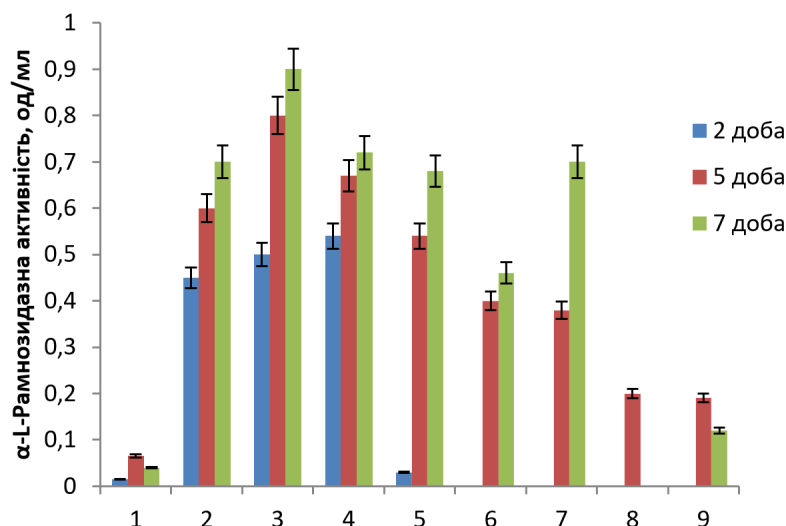
**Рис. 1.**  $\alpha$ -L-Рамнозидазна активність *P. restrictum* на різних поживних середовищах в динаміці

На середовищах № 3, 6, 9 максимальний синтез відмічали на другу добу культивування (0,1–0,37 од/мл), тоді як на середовищах № 7 та

№ 8 – на п’яту добу. Низький рівень активності (0,02–0,21 од/мл) відмічали при вирощуванні на середовищах № 3, 5, 6, 7 та 8. Цікавими ви-

явилися результати вирощування *P. restrictum* на середовищі № 9, яке за мінеральним складом аналогічне середовищу № 2, але в середовищі № 9 рамноза була замінена на грейпфрутову макуху, яка містить флавоноїди нарингін і нарингенін. Ця заміна призвела до зменшення  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності майже в 2 рази.

Дані щодо впливу джерел азоту (нітрит натрію, нітрат натрію, сульфат амонію, нітрат амонію, сечовина, дріжджовий автолізат, пептон, дріжджовий екстракт та автолізат, соєве борошно в концентрації 1,0 г N/л) на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність *P. restrictum* наведені на рис. 2. Слід відмітити, що чотири останні сполуки можуть одночасно слугувати і джерелами вуглецевого живлення.



**Рис. 2.** Вплив різних джерел азоту на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність *P. restrictum* в динаміці: 1 – NaNO<sub>2</sub>, 2 – NaNO<sub>3</sub>, 3 – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>, 5 – сечовина, 6 – дріжджовий екстракт, 7 – пептон, 8 – дріжджовий екстракт, 9 – соєве борошно

На другу добу культивування *P. restrictum* синтез  $\alpha$ -L-рамнозидази був або повністю відсутній (на середовищах з дріжджовим автолізатом, пептоном, дріжджовим екстрактом та соєвим борошном), або складав 0,01-0,02 од/мл (на середовищі з нітритом натрію та сечовиною). Оптимальним для біосинтезу  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. restrictum* виявилось вирощування продуцента на середовищі з сульфатом амонію, нітратом натрію та нітратом амонію (від 0,45 до 0,9 од/мл) незалежно від терміну культивування. Дещо меншу (0,4–0,7 од/мл) активність відмічали на 5–7 добу вирощування продуцента на середовищах з сечовиною, дріжджовим автолізатом і пептоном. В цілому можна відмітити, що неорганічні джерела азоту переважно забезпечували продукцію ензиму культурою *P. restrictum*, починаючи з 2-ої доби культивування, в той час як органічні – з 5–7-ої доби.

Оскільки сульфат амонію виявився найкращим джерелом азоту, були проведені дослідження щодо встановлення його оптимальної концентрації для максимального синтезу  $\alpha$ -L-

рамнозидази. Показано, що найвищий рівень активності в супернатанті культуральної рідини *P. restrictum* (0,85 од/мл) спостерігався за концентрації 0,8 г/л сульфату амонію (рис. 3).

Дослідження впливу деяких вуглеводів (у концентрації 5 г/л) на синтез  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. restrictum* показало, що ксилоза, арабіноза, рамноза, маноза, лактоза, мальтоза та сахароза сприяли синтезу ензиму (рис.4). Встановлено, що найвищий рівень ферментативної активності в культуральній рідині спостерігається на 7-му добу культивування продуцента на середовищі з рамнозою (0,91 од/мл). Дослідження впливу різних її концентрацій на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність *P. restrictum* свідчить про те, що оптимальною концентрацією рамнози є 5 г/л (рис. 5). Дещо нижчі показники  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності (0,25–0,53 од/мл) спостерігали при додаванні в середовище культивування рамнози від 1 до 4 г/л, тоді як при збільшенні концентрації вище оптимальної відмічали значне зниження активності ферменту.

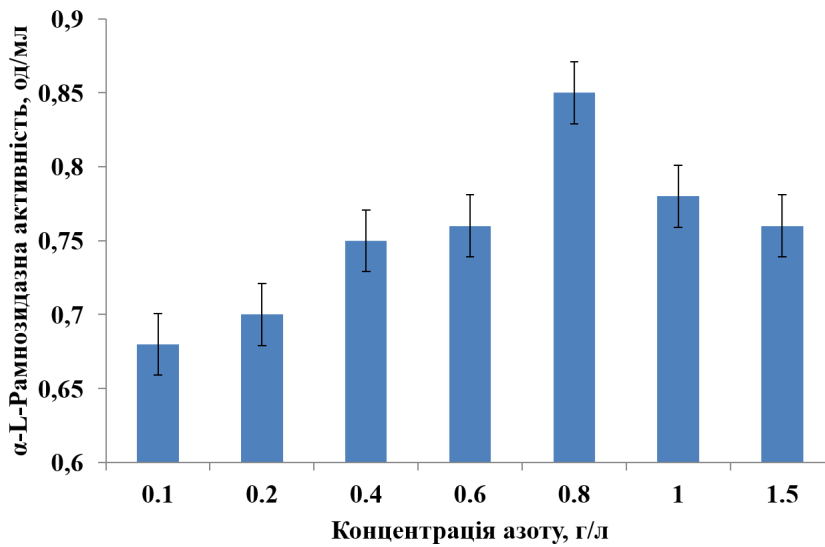


Рис. 3. Вплив різних концентрацій сульфату амонію на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність *P. restrictum*

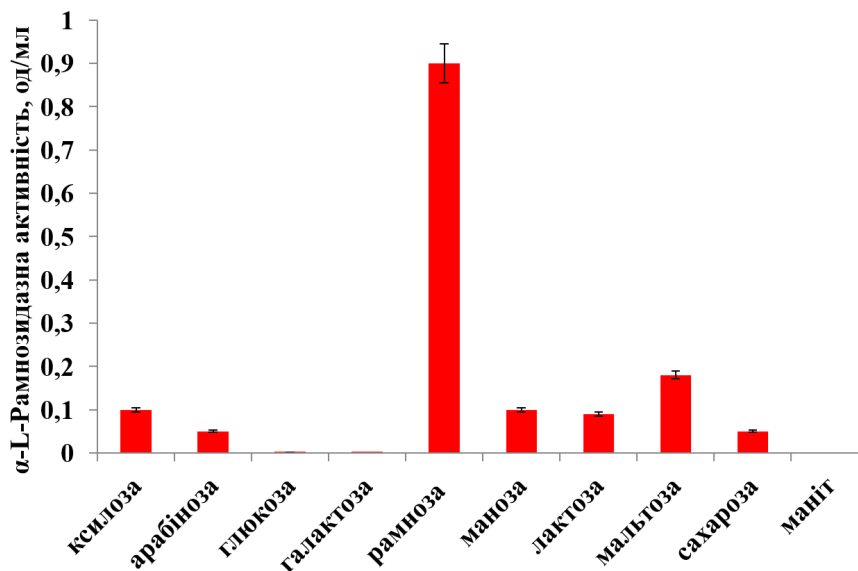


Рис. 4. Вплив джерел вуглецю на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність *P. restrictum*

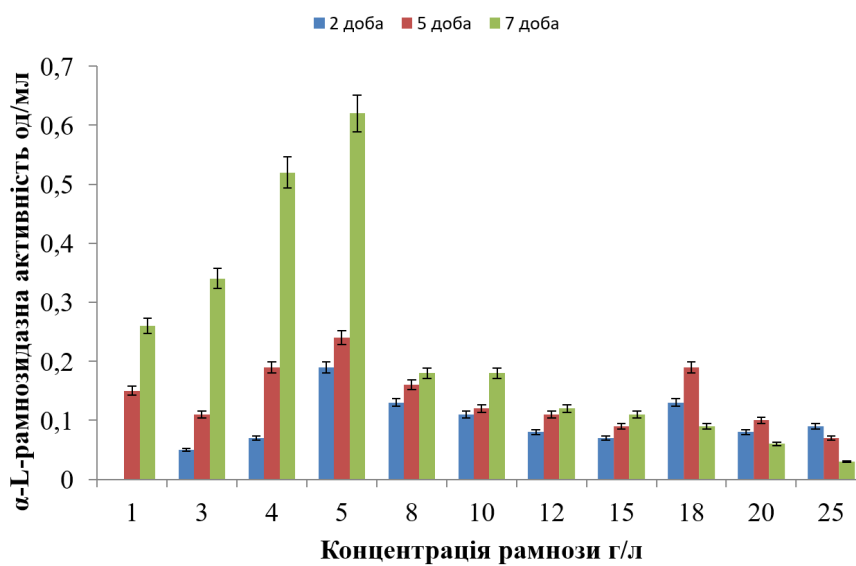


Рис. 5. Вплив різних концентрацій рамнози на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність *P. restrictum*

Результати дослідження впливу оптимальних параметрів культивування свідчать про те, що найбільш ефективним для синтезу  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. restrictum* є використання середовища з початковим значенням рН 6,0, в той час як при початкових значеннях рН 3,0; 4,0 та вище 7,0 він суттєво гальмувався (рис. 6, А). Під час росту культури значення рН середовища майже не змінювалось.

Суттєвий вплив на синтез ферментів має також температура вирощування продуцента. Оптимальною для синтезу  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. restrictum* була температура 25 °С (рис. 6, В).

Дослідження впливу інтенсивності аерації на продукцію  $\alpha$ -L-рамнозидази показали, що більші об'єми поживного середовища в колбах, які знижують масоперенос кисню спричиняють незначне зменшення активності  $\alpha$ -L-рамнозидази. Максимальний рівень  $\alpha$ -L-рамнозидазної актив-

ності спостерігали при вирощуванні в колбах із 100 мл поживного середовища (рис. 6, С). Таким чином, для досягнення максимальної  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності потрібна ефективна аерація.

**Обговорення.** Для отримання позаклітинних глікозидаз найчастіше використовують методи глибинного та твердо-фазного культивування [14–16]. Культивування мікроорганізмів глибинним методом має певні переваги, зокрема – простота автоматизації та масштабування процесу, зручність підтримання стерильних умов під час ферментації, можливість стандартизувати отриманий продукт, регулювати вихід біологічно активних речовин. Ключовими питаннями успішного отримання ензимів шляхом ферментації є відбір високоактивного продуцента та створення оптимальних умов його культивування

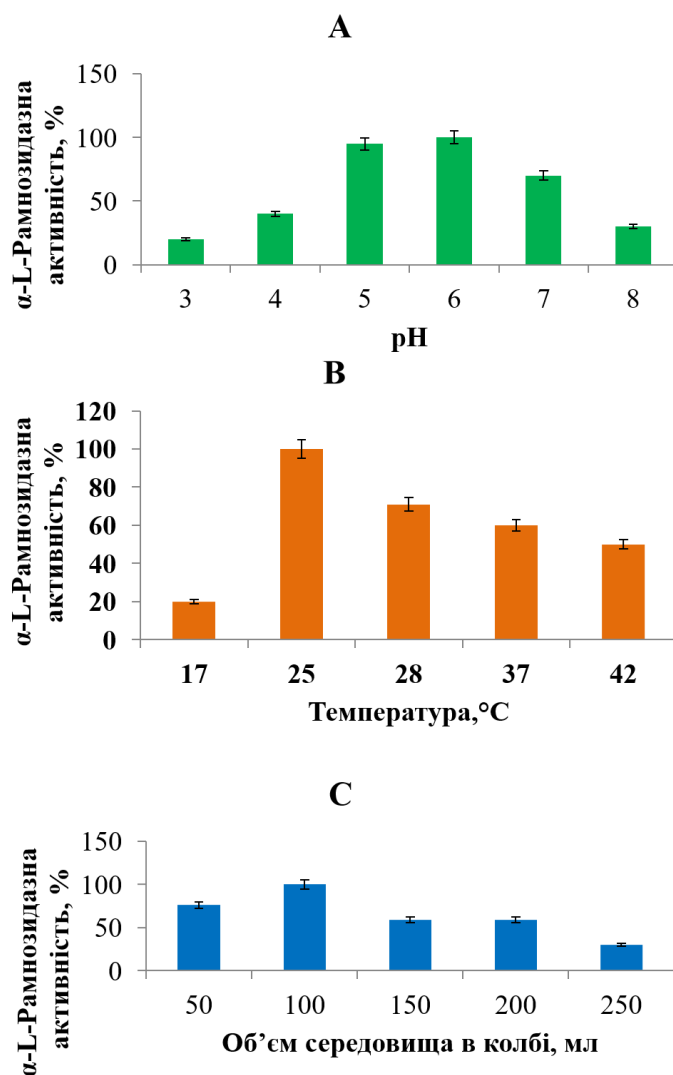


Рис. 6. Вплив рН середовища (А), температури вирощування (В) та об'єму поживного середовища (С) на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність *P. restrictum*



з урахуванням складу поживного середовища, температури вирощування, рН середовища, режиму аерації [16]. Поживне середовище має включати в себе компоненти, які забезпечують спрямований біосинтез ферменту. Це, в першу чергу, сполуки, які містять азот, вуглець та мінеральні речовини для задоволення потреб культури у джерелах енергії. Другим важливим компонентом, який дозволяє максимально збільшити синтез екзоферментів культурою є індуктори, в якості яких можуть виступати різні сполуки: субстрати ензиму, продукти реакції та ін. [14–25].

Стосовно продуцента – то перевагу серед інших таксономічних груп мікроорганізмів мають гриби. Інтерес до мікроміцетів викликаний не лише їхньою здатністю синтезувати ряд біологічно активних речовин, що отримують у наш час, а і тим, що грибні виробництва можна зробити високотехнологічними. Мікроміцети здатні рости на відносно дешевих поживних середовищах в умовах поверхневого і глибинного культивування, не дають спорношення на стадії вегетативного росту, що знижує небезпеку професійних захворювань людей у біотехнологічному виробництві, а також зменшує витрати при отриманні екзометаболітів.

Останнім часом опубліковано багато робіт, де показано, що відходи агропромислової переробки можуть бути використані для отримання  $\alpha$ -L-рамнозидаз з високою активністю [20–25]. Так, у роботах багатьох авторів показано [20–25], що застосування цитрусових відходів та вищих концентрацій солей в поживних середовищах сприяють максимальному синтезу  $\alpha$ -L-рамнозидаз. Двократне збільшення синтезу ензиму *Staphylococcus xylosus* MAK2 було досягнуто за допомогою додавання порошку цитрусової шкірки та збільшення концентрації вуглеводів (15 г/л) у ферментаційному середовищі [20]. Показана висока ефективність використання і інших полімерних субстратів та рослинних відходів. Зокрема, касава використовувалась як джерело вуглецю для росту *Aspergillus brasiliensis* [19]. Однак для максимального синтезу  $\alpha$ -L-рамнозидази із *Aspergillus niger* найбільш оптимальним було поживне середовище, що містило в своєму складі соєву макуху та рисову солому [17, 18]. Але нашими дослідженнями не було встановлено такої закономірності: при додаванні грейпфрутової макухи в середовище культивування синтез  $\alpha$ -L-рамнозидази культурою *P. restrictum*, навпаки, був в 2 рази меншим, ніж при використанні

рамнози, що говорить про неможливість використання макухи в якості оптимального джерела вуглецю.

Відомо, що рівень активності позаклітинних ензимів залежить від часу культивування продуцента. Зустрічаються повідомлення [15–20], що оптимальним терміном вирощування грибних продуцентів є 6–10 доба. У культуральній рідині досліджуваного нами штаму *P. restrictum* максимум  $\alpha$ -рамнозидазної активності припадав на 7 добу, як і у  $\alpha$ -L-рамнозидази *A. niger* CCTCC M [21].

На накопичення біомаси та біосинтетичну активність культури, а саме – на характер метаболізму та синтез біологічно активних сполук суттєве значення мають оптимально підібрані джерела вуглецевого та азотного живлення. З літературних джерел відомо [14, 17], що вибірковість відносно джерел вуглецю та азоту в поживному середовищі є видовою та штамовою особливістю мікроорганізмів, а підбір середовища культивування визначає ступінь виходу цільового продукту. Оскільки продукування  $\alpha$ -L-рамнозидази має індукцибельну природу, до складу поживного середовища обов'язково включають речовину, що може бути індуктором її біосинтезу. Зазвичай це рамноза або рамнозвмісні сполуки, такі як нарингін, рутин, гесперидин, пектин. Для ферментації *P. restrictum* найбільш придатним було середовище з рамнозою. Однак є повідомлення про те, що нарингіназа з *A. brasiliensis* MTCC 1344 мала високі рівні активності при використанні в поживному середовищі трьох основних компонентів — мальтози, пептону та хлориду кальцію [19].

Нами показано, що для синтезу  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. restrictum* комбінація рамнози та неорганічних джерел азотного живлення, зокрема сульфату амонію, є найбільш оптимальною, що узгоджується з наведеними в роботах інших дослідників даними, де неорганічні джерела азоту сприяють максимальному синтезу ензиму *A. niger* з  $\alpha$ -L-рамнозидазною активністю [17, 18, 23]. Однак в іншому дослідженні показано, що найкращим джерелом азоту для продукування ензиму з *Aspergillus oryzae* JMU316 був пептон [24]. Це ще раз свідчить про необхідність підбору складу поживного середовища для кожного штаму окремо незалежно від видової та родової приналежності.

Фізико-хімічні умови культивування продуцента, до яких відносяться рН, температура та режим аерації, відіграють важливу роль у процесі продукування кінцевого продукту. Концен-

трація водневих іонів (рН) суттєво впливає на фізіологічну активність мікроміцета та дозволяє керувати процесом росту міцелію у глибинній культурі. Ріст *P. restrictum* у широкому діапазоні рН від 3,0 до 8,0 є безумовною перевагою даної культури, але оптимальними для отримання високих показників продукції  $\alpha$ -рамнозидази виявилися нейтральні початкові значення рН. Аналогічні дані було отримано для *Penicillium decumbens*, для якого оптимальним виявилось початкове рН середовища 6,0 [25]. Yadav V et al. встановили, що максимальна ензиматична активність *A. niger* МТСС 1344 отримана за початкового значення рН культурального середовища 4,5 [14]. Для бактеріального екзоферменту зі *S. xylosus* оптимальними для виходу  $\alpha$ -рамнозидази були значення рН 5,5 і температури культивування 30 °С [20]. Проте досягнення максимальної ферментативної активності деяких видів грибів було можливим лише за умови, коли початкове рН культурального середовища складало 7,5 [15].

Іншим, не менш важливим чинником процесу глибинного культивування мікроорганізмів є перемішування, що сприяє вирівнюванню концентрації розчинених компонентів поживного середовища, кисню і продуктів метаболізму по всьому об'єму. В результаті оптимізації цього показника може бути значно підвищена продуктивність синтезу ферменту і знижені енергетичні витрати. Так, нами показано, що для максимального рівня  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності *P. restrictum* необхідна ефективна аерація, що досягається в колбах зі 100 мл поживного середовища та при швидкості обертання качалки 250 об/хв.

Таким чином, показана можливість шляхом глибинного культивування *P. restrictum* отримати активну позаклітинну  $\alpha$ -L-рамнозидазу. Встановлено, що комбінація рамнози та сульфату амонію забезпечувала  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність культури на рівні 1,2 од/мл, що вдвічі перевищує активність описаних в літературі нарингінази та гесперидинази [4, 14]. Встановлені фізико-хімічні параметри культивування можуть бути використані для отримання  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. restrictum* для біотехнологічних цілей.

## THE INFLUENCE OF CULTIVATION PARAMETERS ON *PENICILLIUM RESTRICTUM* $\alpha$ -L-RHAMNOSIDASE ACTIVITY

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

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
NAS of Ukraine,

154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

### Summary

The efficiency of the process of obtaining biotechnologically active substances, in particular enzymes, by microbiological synthesis largely depends on the successful optimization of the conditions of producer cultivation. **The aim** was to determine the influence of the main components of nutrient medium and culture conditions on the level of extracellular  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity of *Penicillium restrictum*. **Methods.** The micromycetes culture was grown in a submerged cultivation condition at 25 °C for 7 days.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase activity in the supernatant culture liquid of *P. restrictum* was determined using *n*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside. Xylose, arabinose, glucose, galactose, rhamnose, mannose, lactose, maltose, sucrose, and mannitol were used as carbon sources. Sodium nitrate, sodium nitrite, ammonium sulfate, ammonium nitrate, yeast autolysate, yeast extract, peptone, urea, and soy flour were used as nitrogen sources. To study the effect of cultivation conditions, the strain was grown on medium optimized for carbon and nitrogen sources, changing the initial pH of the medium (3.0–8.0), temperature (25–42 °C) and volume of the medium (50–250 ml). **Results.** It was found that the highest rates of *P. restrictum*  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity were observed on the 7<sup>th</sup> day of cultivation in case of rhamnose using a as carbon source at a concentration of 5 g/l and ammonium sulfate as nitrogen source – 0.8 g/l. The most effective for  $\alpha$ -L-rhamnosidase synthesis by *P. restrictum* was the use a medium with an initial pH value of 6.0, temperature of 25 °C and 100 ml of nutrient medium in flasks. **Conclusions.** It was shown the possibility of *P. restrictum* to synthesize a new highly active  $\alpha$ -L-rhamnosidase in submerged cultivation conditions. The combination of rhamnose and ammonium sulfate was found to provide  $\alpha$ -rhamnosidase activity (1.2 U/ml). The established physical and chemical conditions of *P. restrictum* cultivation can be used for production of  $\alpha$ -L-rhamnosidase for biotechnological purposes.



**Keywords:**  $\alpha$ -L-rhamnosidase, *Penicillium restrictum*, cultivation parameters, carbon and nitrogen sources.

1. Quideau S, Deffieu D, Douat-Casassus C, Pouysegue L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew Chem Int Edit.* 2011; 50(3):586–621. doi: 10.1002/anie.201000044.
2. Xiao J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017; 57(9):1874–1905. doi: 10.1080/10408398.2015.1032400.
3. Slamova K, Kapesova J, Valentova K. “Sweet Flavonoids”: Glycosidase-catalyzed modifications. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(7): 2126. doi: 10.3390/ijms19072126.
4. Puri M. Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects. *Appl Microb Biotechnol.* 2012; 93(1):49–60.
5. Yadav V, Yadav KDS. New fungal for  $\alpha$ -L-rhamnosidase an important enzyme used in the synthesis of drugs and drug precursors. *Appl Biochemistry and Microbiol.* 2010; 48(3):295–301.
6. Al-Maqtari QA, AL-Ansi W, Mahdi AA. Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry. A review. *Int J Agr Innov Res.* 2019; 8(1):ISSN (Online); 1473–2319 .
7. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem.* 2010;122:987–996.
8. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol.* 2012; 83:6–15.
9. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res.* 2015; 29:323–331. doi: 10.1002/ptr.5256.
10. Patel K, Singh GK, Patel DK. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. *Chin J Integr Med.* 2012; 1–12 .
11. Romero C, Manjon A, Bastida J A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase. *Anal Biochem.* 1985; 149(2):566–571.
12. Yadav S, Yadava S.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Aspergillus flavipus* using citrus solid waste as inducer for application in juice industry. *GJBB,* 2016; 5(4): 453–456.
13. Guillotin L, Kim H, Traore Y, Moreau P, Lafite P, Coquoin V, Nuccio S, de Vaumas R, Daniellou R. Biochemical characterization of the  $\alpha$ -l-rhamnosidase *DtRha* from *Dictyoglomus thermophilum*: application to the selective derhamnosylation of natural flavonoids. *ACS Omega.* 2019; 4(1): 1916–1922.
14. Puri M, Banerjee A, Banerjee UC. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC-1344. *Process Biochemistry.* 2005; 40(1):195–201.
15. Kumar V. Comparative studies on inducers in the production of naringinase from *Aspergillus niger* MTCC 1344. *African J Biotechnol.* 2010; 9(45):7683–7686.
16. Yadav S, Yadav KDS. Secretion of  $\alpha$ -L-rhamnosidases by some indigenous fungal strains. *JSIR.* 2004; 63:439–443.
17. Sloothaak J, Odoni DI, Martins dos Santos VAP, Schaap PJ, Tamayo Ramos JA. Identification of a novel L-rhamnose uptake transporter in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Plos Genetics.* 2016; 12(12).
18. Petri AC, Buzato JB, Celligoi MA, Borsato D. Optimization of the production of  $\alpha$ -L-rhamnosidase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using agro-industrial residues. *Brit Microbiol Res J.* 2014; 4(11):1198–1210.
19. Shanmugaprakash M, Kirthika J, Ragupathy J, Nilanee K, Manickam A. Statistical based media optimization and production of naringinase using *Aspergillus brasiliensis* 1344. *Int J Biol Macromol.* 2014; 64:443–52.
20. Puri M, Kaur A, Barrov CJ, Singh RS. Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by *Staphylococcus xylosus* MAK2 in a stirred tank reactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 89 (3):715–22.

21. Wang D, Zheng P, Chen P. Production of a recombinant  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* CCTCC M 2018240 in *Pichia pastoris*. Appl Biochem Biotechnol. 2019; 189 (3):1020–1037.
22. Shehata AN, Aty AA. Optimization of process parameters by statistical experimental designs for the production of naringinase enzyme by marine fungi. Int J Chem Eng 2014, Article ID 273523:10.
23. Thammawat K, Pongtanya P, Juntharasri V, Wongvithoonyaporn P. Isolation, preliminary enzyme characterization and optimization of culture parameters for production of naringinase isolated from *Aspergillus niger* BCC 25166. Kasetsart J (Natural Science), 2008; 42 (1): 61–72.
24. Chen D, Niu T, Cai H. Optimizing culture medium for debittering constitutive enzyme naringinase production by *Aspergillus oryzae* JMU316. Afr J Biotechnol. 2010; 31(9): 4970–4978.
25. Lee YS, Hug J, Nam SH, Kim D, Lee SB. Synthesis of quercetin-3-O-glucoside from rutin by *Penicillium decumbens* naringinase. J Food Sci. 2013; 78 (3):411–5.

Отримано 27.02.2020