

УДК 577.15.:577.152.3

## *Penicillium* sp. — ПРОДУЦЕНТ ПОЗАКЛІТИННОЇ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗИ

О. В. Гудзенко  
Л. Д. Варбанець  
І. М. Курченко  
Л. Т. Наконечна

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного  
НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Отримано 03.03.2014

Метою роботи було дослідити  $\alpha$ -L-рамнозидазу, що гідролітично відщеплює термінальні невідновлені  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- та  $\alpha$ -1,6-зв'язані залишки L-рамнози, присутні як у синтетичних, так і в природних глікозидах, оліго-, полісахаридах, гліколіпідах і різних глікокон'югатах: похідних флавоноїдів (рутин, неогесперидин, гесперидин, нарингін, кверцитрин), сапонінах, терпенових глікозидах. Ці властивості ензиму можуть бути використані для потреб харчової, фармацевтичної і хімічної промисловості: поліпшення якості напоїв (зменшення гіркоти соків, підсилення аромату вин), у виробництві харчових добавок, лікарських засобів, а також рамнози.

Унаслідок скринінгу, проведеного серед 9 штамів мікроміцетів, здатність синтезувати  $\alpha$ -L-рамнозидазу виявлено лише у *Penicillium* sp. 2918. Із супернатанта культуральної рідини цього мікроміцета осадженням сульфатом амонію (90% насичення) одержано комплексний ензимний продукт та вивчено деякі його фізико-хімічні властивості, такі як рН- і термооптимум, рН- і термостабільність, а також субстратну специфічність. Встановлено, що цей продукт має рН-оптимум 6,0, а термооптимум — 60 °С. Препарат *Penicillium* sp. 2918 поряд з  $\alpha$ -L-рамнозидазою виявляє також  $\beta$ -D-глюкозидазу,  $\beta$ -D-галактозидазу та  $\beta$ -D-глюкозамінідазу активність.

**Ключові слова:** *Penicillium* sp. 2918,  $\alpha$ -L-рамнозидаза, мікроміцети, ензимний комплекс, субстратна специфічність.

У сучасних промислових технологічних процесах дедалі більшого значення набувають гідролітичні ензими, які в багатьох виробництвах замінили процес кислотного гідролізу. Їхня висока специфічність дає змогу одержувати готові продукти з мінімальною кількістю сторонніх речовин. Найбільш перспективними для широкого використання виявились гідролітичні ензими, продуцентами яких є мікроорганізми, передусім завдяки необмеженій доступності вихідної сировини та можливостям, що їх відкривають відбір і штучний мутагенез для спрямованого синтезу. Унікальна специфічність дії та висока каталітична активність, а також широка доступність індивідуальних ензимів зумовили широке використання їх у наукових дослідженнях з молекулярної біології і генетики, а також для вирішення деяких практичних завдань медицини, харчової, мікробіологічної промисловості, контролю навколишнього середовища. Серед глікозидаз важливе місце посідає  $\alpha$ -L-рамнозидаза [КФ 3.2.1.40], яка гідролітично відщеплює термінальні  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- та  $\alpha$ -1,6-зв'язані

залишки L-рамнози, що присутні як у синтетичних, так і в природних глікозидах, оліго-, полісахаридах, гліколіпідах і різних глікокон'югатах: похідних флавоноїдів (рутин, неогесперидин, гесперидин, нарингін, кверцитрин), сапонінах, терпенових глікозидах. Лише у кверцитрині L-рамноза безпосередньо зв'язана з агліконовою частиною, тимчасом як усі інші субстрати — це глікозиди, в яких L-рамноза зв'язана з  $\beta$ -D-глюкопіранозильною одиницею за допомогою різних типів глікозидних зв'язків.

Зазначені властивості дають змогу застосовувати  $\alpha$ -L-рамнозидази в різних галузях промисловості: харчовій, фармацевтичній і хімічній. Головне використання її у харчовій промисловості спрямоване на поліпшення якості напоїв (зменшення гіркоти, підсилення аромату вин) та виробництво харчових добавок. Біотехнологічні підходи до зменшення гіркоти цитрусових соків базуються на здатності цього ензиму гідролізувати нарингін і лимонін.

В останні роки  $\alpha$ -L-рамнозидаза привертає особливу увагу дослідників, які на основі

глікозидів рослинного походження створюють засоби для лікування серцево-судинних захворювань, а також препарати із проти-вірусною та імунотропною дією. Для вияву біологічної дії деяких із цих препаратів необхідна наявність рамнози, інших — її відщеплення. Використання  $\alpha$ -L-рамнозидаз у хімічній промисловості пов'язано зі зде-шевленням виробництва рамнози [1].

Однак більшість відомих на сьогодні  $\alpha$ -L-рамнозидаз мікробного походження характеризуються низкою недоліків [2], тому пошук нових, ефективних синтетиків  $\alpha$ -L-рамнозидаз залишається актуальним питанням, враховуючи те, що в Україні їхні продуценти взагалі відсутні, а висока вартість комерційних ензимних препаратів іноземного виробництва суттєво гальмує їх застосування в промислових технологіях нашої країни.

З огляду на вищезазначене метою роботи був пошук ефективного продуцента  $\alpha$ -L-рамнозидази, а також дослідження деяких фізико-хімічних властивостей і субстратної специфічності одержаного ензиму.

### Матеріали і методи

Об'єктами досліджень слугували 9 штамів мікроміцетів: *Trichoderma harzianum* 2915, *Trichoderma* sp. 344, *Trichoderma viride* 906, *Trichoderma viride* 2917, *Trichoderma pseudokoningii* 2928, *Trichoderma virens* 2916, *Penicillium raciborskii* 16896=0096, *Aspergillus rhizopodus* 16870=0152, *Penicillium* sp. 2918. Мікроміцети вирощували у пробірках зі скошеним середовищем сусло-агару протягом 14 діб за температури 25 °C, а потім пересівали у колби Ерленмейера (750 мл), які містили 100 мл рідкого середовища Чапека такого складу, г/л: рамноза — 4; NaNO<sub>3</sub> — 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,0; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0,5; KCl — 0,5; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0,015; рН 5,0. Вирощування проводили за наявності качалок при 220 об/хв за температури 25 °C упродовж 5 діб.

Зразок  $\alpha$ -L-рамнозидази одержували із супернатанта культуральної рідини *Penicillium* sp. 2918 після відокремлення біомаси фільтруванням через 4 шари марлі, а також осадженням сульфатом амонію до 90% насичення. Суміш витримували 12–16 год за температури 4 °C і центрифугували (5 000 g) протягом 30 хв. Осад збирали, розчиняли у трикратному об'ємі 3 M сульфату амонію, для зберігання додавали 0,01 M азиду натрію.

З метою визначення активності глікозидаз до 0,1 M розчину ензиму додавали 0,2 мл

0,1 M фосфатно-цитратного буферу (ФЦБ), рН 5,2, та 0,1 мл 0,01 M розчину субстрату в цьому буфері. Реакційну суміш інкубували упродовж 10 хв за температури 37 °C. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 1 M розчину бікарбонату натрію. До контролю вносили ті самі компоненти, але у зворотному порядку. Кількість *n*-нітрофенолу, який було відщеплено в результаті гідролізу, встановлювали колориметричним методом на спектрофотометрі СФ-26 за поглинанням при 400 нм [3]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах досліду.

Глікозидазну активність визначали, використовуючи відповідні синтетичні субстрати: *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -D-глюкопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - і  $\beta$ -D-галактопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -D-ксилопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-манопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-фукопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкозамінід (Sigma-Aldrich, США).

У разі визначення  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності із застосуванням природного субстрату нарингіну послуговувались методом Davis [4].

Вміст протеїну на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм, його кількість встановлювали за методом Lowry et al. [5]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали за довжини хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Дослідження впливу температури та рН середовища здійснювали в інтервалі температур від 4 до 90 °C та рН від 2,0 до 10,0, останній створювали 0,01M універсальним фосфатним буфером (УФБ).

Термостабільність ензиму визначали при температурі 37 °C (час експозиції 90 хв), рН-стабільність — за показників рН середовища 4,0; 5,0; 6,0 та 7,0 (час експозиції 30 хв). Після вичерпання часу дії на ензим відповідного чинника відбирали аліквоти по 0,1 мл і оцінювали активність, як описано вище.

Усі досліди виконували у 5–8 повторях. Статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної та кореляційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента [6]. Враховували середні значення величин і стандартні похибки ( $M \pm m$ ). Значення за  $P < 0,05$  розглядали як достовірні. Результати, що подані графічно, обробляли за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

## Результати та обговорення

Відомо, що  $\alpha$ -L-рамнозидазу здатні синтезувати мікроорганізми різних таксономічних груп, передусім мікроміцети, серед яких виділено найбільшу кількість продуцентів глікозидаз [7, 8]. На сьогодні в промисловості використовують ензимні препарати *Penicillium decumbens* і *Aspergillus niger*, які синтезують відповідно нарингіназу і гесперидиназу (Sigma-Aldrich, США). Бактеріальні продуценти  $\alpha$ -L-рамнозидаз виявлено серед *Bacteroides*, *Fusobacterium* K-60, *Sphingomonas paucimobilis*, *Bacillus* sp., *Clostridium stercorarium* [9–11]. Що стосується дріжджів, то низькі рівні  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності було зафіксовано у *Saccharomyces cerevisiae* Tokaj 7, *Hansenula anomala*, *Debaryomyces polymorphus*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida guilliermondii* і *Pichia angusta* X349 [12, 13]. Але оскільки всі дріжджі синтезують внутрішньоклітинні  $\alpha$ -L-рамнозидази, це істотно ускладнює процеси виділення та очищення ензимів.

Скринінг продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази здійснювали серед 9 штамів мікроміцетів на середовищі, яке містило потенційний індуктор ензиму — L-рамнозу. Встановлено, що в супернатанті культуральної рідини *Penicillium* sp. 2918 (таблиця) виявлено  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність, яка становила 0,3 од/мг протеїну.

Для одержання частково очищеного ензиму проводили осадження супернатанта культуральної рідини *Penicillium* sp. сульфатом амонію (90% насичення). Дослідження фізико-хімічних властивостей (рис. 1) показало, що рН оптимум ензиму становить 6,0, хоча за рН 4,0 та 5,0  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Penicillium* sp. зберігала 80%, а при рН 7,0 та 8,0 — 55% від початкової активності ензиму. Однак за значень рН 9,0 і 3,0 активність ензиму знижувалась до 22–35% від вихідної.

Результати узгоджуються з даними літератури, згідно з якими показники рН-оптимумів грибних глікозидаз лежать в інтервалі рН 4,0–6,0. Так, для  $\alpha$ -L-рамнозидази *A. nidulans* оптимальними значеннями рН були 4,5–6,0, а для ензиму *A. terreus* — 5,5, тимчасом як  $\alpha$ -L-рамнозидаза *A. flavus* виявляла оптимальну активність за рН 6,5 [14].

Важливими характеристиками ензимних препаратів, суттєвими для практичного використання, є стабільність за певних значень рН і температури. Встановлено, що досліджуваній ензим  $\alpha$ -L-рамнозидази *Penicillium* sp. 2918 був стабільним у діапазоні рН від 4,0 до 6,0 впродовж 30 хв (рис. 2). У разі значення рН 7,0 активність ензиму дещо зменшувалась і становила до 80% від вихідної. За оптимального значення рН 6,0 та температури 20 °С досліджувана  $\alpha$ -L-рамнозидаза була стабільна протягом двох діб.

За даними літератури [1],  $\alpha$ -L-рамнозидаза з *A. niger* стійка в інтервалі рН 3,0–5,0. Ензим *A. terreus* зберігав понад 95% активності за рН 4,0–6,5, тоді як за рН > 6,5 активність  $\alpha$ -L-рамнозидази прогресивно знижувалась, а при рН 8,5 становила лише 10% від максимальної [15].  $\alpha$ -L-рамнозидаза *A. aculeatus* стабільна за рН 3,0–5,0 [16], а *A. nidulans* — 4,5 [17]. Ензим, виділений із *P. paucimobilis* [14], був стабільним за рН 5,5–9,0.

Відомо, що температурний оптимум більшості  $\alpha$ -L-рамнозидаз становить 40–80 °С, винятком є бактеріальна  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Pseudoalteromonas* sp., яка виявляла активність при 4 °С [18]. Температурний оптимум для очищеної  $\alpha$ -L-рамнозидази *A. kawachii* становив 60 °С, за таких умов ензим зберігав 80% від максимальної активності протягом 1 год [19].

Стосовно досліджуваної  $\alpha$ -L-рамнозидази *Penicillium* sp. 2918: її температурний оптимум спостерігався при 60 °С (рис. 3), а за 30 °С та 80 °С вона зберігала 30% ензимної активності від максимальної упродовж 3 год.

Скринінг продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази

Рід мікроорганізмів	Активність, од/мг	Джерело виділення
<i>Trichoderma harzianum</i> 2915	0	Ґрунт 2011 р., Київська область
<i>Trichoderma</i> sp. 344	0	Ґрунт зони відчуження 30 км, Чорнобиль
<i>Trichoderma viride</i> 906	0	Лісовий ґрунт, Київська область
<i>Trichoderma viride</i> 2917	0	Підлога квартири, м. Київ
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> 2928	0	Ґрунт зони відчуження 30 км, Чорнобиль
<i>Trichoderma virens</i> 2916	0	Ґрунт дубових посадок, Київська область
<i>Penicillium raciborskii</i> 16896=0096	0	Ґрунт 1999 р., Київська область
<i>Aspergillus rhizopodus</i> 16870=0152	0	Деревина верби, Київська область
<i>Penicillium</i> sp. 2918	0,3±0,015	Повітря, м. Київ

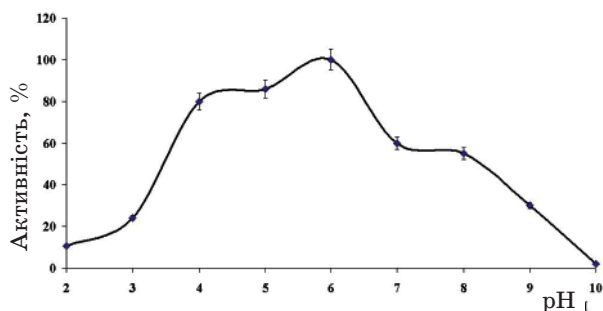


Рис. 1. рН-оптимум  $\alpha$ -L-рамнозидази *Penicillium* sp. 2918

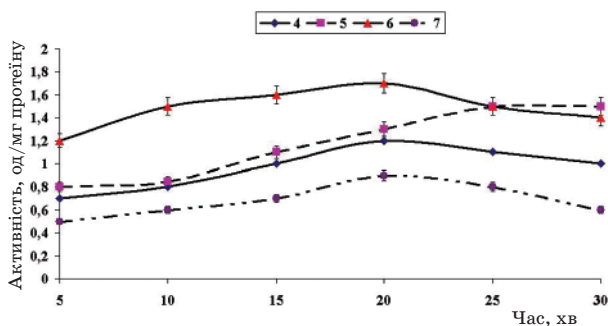


Рис. 2. рН-стабільність (4–7)  $\alpha$ -L-рамнозидази *Penicillium* sp. 2918

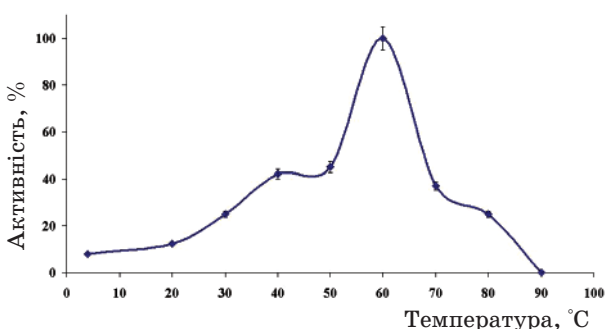


Рис. 3. Термооптимум  $\alpha$ -L-рамнозидази *Penicillium* sp. 2918

Дослідження термостабільності ензиму *Penicillium* sp. 2918 показало (рис. 4), що при 37 °C та рН від 4,0 до 7,0 він є стабільним протягом 90 хв. За –18 °C ензим не втрачав активності впродовж кількох місяців. Аналогічні дані було отримано дослідниками для  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. raucimobilis* [14], яка після заморожування також не втрачала активності.

Вивчення субстратної специфічності ензиму *Penicillium* sp. 2918 (рис. 5) показало, що він гідролізує такі синтетичні субстрати, як *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозид та *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкозамінід.

Подібну широку субстратну специфічність виявлено також у супернатанті культуральної рідини раніше вивченого нами про-

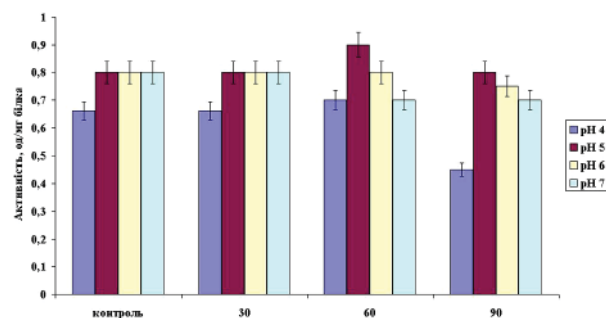


Рис. 4. Термостабільність препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *Penicillium* sp. 2918 при 37 °C (\* —  $P \leq 0,05$ )

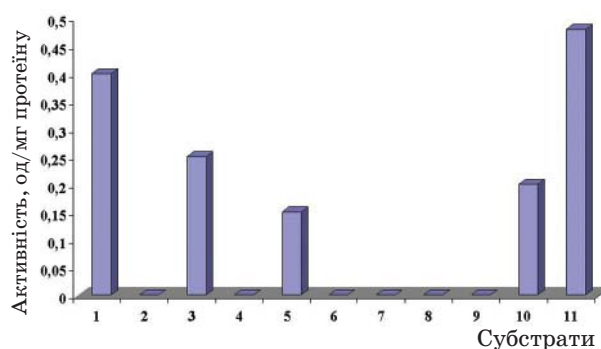


Рис. 5. Субстратна специфічність препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *Penicillium* sp. 2918:

- 1 — *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид;
- 2 — *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-глюкопіранозид;
- 3 — *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид;
- 4 — *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-галактопіранозид;
- 5 — *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозид;
- 6 — *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-ксилопіранозид;
- 7 — *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-ксилопіранозид;
- 8 — *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-манопіранозид;
- 9 — *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-фукопіранозид;
- 10 — *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкозамінід;
- 11 — нарингін

дучента *Eurpenicillium erubescens* [20], який окрім *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду гідролізував *n*-нітрофеніл- $\beta$ -N-ацетилгалактозамінід, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -N-ацетил-глюкозамінід і *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид.

Однак на відміну від  $\alpha$ -L-рамнозидази *E. erubescens* [21], досліджуваний ензим *Penicillium* sp. 2918 найбільшу активність виявляв стосовно природного субстрату — нарингину.

Monti D. зі співавт. [21] показали, що  $\alpha$ -L-рамнозидази, ізольовані з різних видів грибів, виявляють різну специфічність щодо таких L-рамнозовмісних природних глікозидів, як рутин, гесперидин, нарингін, кверцитрин, гінзенозид та азіатикозид. Так, препарати  $\alpha$ -L-рамнозидаз, одержаних із представників більшості видів досліджених

грибів, були не здатні гідролізувати кверцитрин, тимчасом як ензим з *A. aculeatus*, який характеризувався широкою субстратною специфічністю щодо різних субстратів, був ефективним також і стосовно кверцитрину.

Вивчення субстратної специфічності  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Penicillium commune* показало, що ензим 1 має широку субстратну специфічність і здатен відщеплювати  $\beta$ -D-глюкозу,  $\beta$ -D-ксилозу,  $\alpha$ -D-манозу,  $\alpha$ -D-галактозу, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамін від відповідних *n*-нітрофенільних субстратів, тоді як  $\alpha$ -L-рамнозидаза 2 характеризувалася вузькою субстратною специфічністю, гідролізуючи тільки *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид. Обидва ензими виявляли високу спорідненість до природних субстратів: нарингін та неогесперидину [22]. Так,  $K_m$  становила 1,7 та 1,6 мМ для рамнозидази 1 та 1,32 і 1,95 мМ — для рамнозидази 2, від-

повідно для нарингін та неогесперидину. Проте  $\alpha$ -L-рамнозидази 1 і 2 виявляли меншу спорідненість до *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду порівняно з ензимом *E. erubescens*: значення  $K_m$  2,97, 2,81 і 1,0 мМ відповідно.

Таким чином, за результатами скринінгу серед 9 штамів мікроміцетів відібрано лише один штам — *Penicillium* sp. 2918, який виявився продуцентом  $\alpha$ -L-рамнозидази. Показано, що ензим *Penicillium* sp. є стабільним і має рН-оптимум 6,0, а термооптимум 60 °С. Препарату *Penicillium* sp. 2918 поряд з  $\alpha$ -L-рамнозидазою (нарингінназою) пригатаманна  $\beta$ -D-глюкозидазна,  $\beta$ -D-галактозидазна та  $\beta$ -D-глюкозамідазна активність. Отже, цей продуцент  $\alpha$ -L-рамнозидази може бути використаний для подальших досліджень з метою його застосування в різних біотехнологічних процесах.

## REFERENCES

1. Gudzenko O. V., Varbanets L. D. Mikrobial  $\alpha$ -L-rhamnosidases: producers, properties, practical use. *Biotechnologiya*. 2012, 5(6), 9–26. (In Ukrainian).
2. Yadav V., Yadav P. K., Yadav S., Yadav K. D. S.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: A review. *Process Biochemistry*. 2010, 45(8), 1226–1235.
3. Romero C., Manjon A., Bastida J. A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase. *Anal. Biochem*. 1985, 149(2), 566–571.
4. Davis D. W. Determination of flavonones in citrus juice. *Anal. Biochem*. 1947, 19(1), 46–48.
5. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951, 193(1), 265–275.
6. Lakin G. F. Biometrics. Moscow: Vysshaya shkola. 1990, 325 p. (In Russian).
7. Yadav S., Yadav R. S. S., Yadav K. D. S.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Aspergillus awamori* MTCC-2879 and its role in debittering of orange juice. *Int. J. Food Sci. Technol*. 2013, 48(5), 927–923.
8. Yadav V., Yadav K. D. S. New fungal for  $\alpha$ -L-rhamnosidase an important enzyme used in the synthesis of drugs and drug precursors. *Appl. Biochem. Microbiol*. 2010, 48(3), 295–301.
9. Jang I. S., Kim D. H. Purification and characterization of alpha-L-rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium. *Biol. Pharmaceut. Bul*. 1996, 19(1), 1546–1549.
10. Park S., Kim J., Kim D. Purification and characterization of quercitrin-hydrolyzing alpha-L-rhamnosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal bacterium. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2005, 15(3), 519–524.
11. Hashimoto W., Murata K.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1998, 62(6), 1068–1074.
12. Rodriguez M. E., Lopes C. A., Broock M. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J. Appl. Microbiol*. 2004, 96(1), 84–95.
13. Yanai T., Sato M. Purification and Characterization of  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2000, 64(10), 2179–2185.
14. Varbanets L. D., Borzova N. V. Glycosydases of microorganisms and methods of their investigations. Kyiv: Naukova dumka. 2010. 437 p. (In Ukrainian).
15. Gerstorfenova D., Flidrova B., Halada P., Marhola P., Kena V., Weignerov La. Recombinant  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin. *Proc. Biochem*. 2012, 47(5), 828–835.
16. Manzanares P., Orejas M., Gil J. V. Construction of a Genetically Modified Wine Yasts Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus rhaA* Gene, Encoding and  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of Enological Interest. *Appl. Envir. Microbiol*. 2003, 69(12), 7558–7562.
17. Tamayo-Ramos J., Flipphi M., Pardo E. L-Rhamnose induction of *Aspergillus nidulans*  $\alpha$ -L-rhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA-independent mechanism acting at the level of inducer uptake. *Microb. Cell Fact*. 2012, V. 11, P. 11–26.
18. Orrillo A. G., Ledesma P., Delgado O. D. Cold-active  $\alpha$ -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-

- Antarctic ecosysteme. *Enz. Microb. Technol.* 2007, 40(2), 236–241.
19. Koseki T., Mese Y., Nishibori N. Characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 80(6), 1007–1013.
20. Gudzenko E. V., Varbanets L. D. Purification and physico-chemical properties of *Eupenicillium erubescens*  $\alpha$ -L-rhamnosidase. *Mikrobiol. zh.* 2012, 74(2), 14–21. (In Russian).
21. Monti D., Pisevcova A., Kren V. Generation of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. *Biotechnol. Bioengin.* 2004, 87(6), 763–771.
22. Varbanets L. D., Gudzenko E. V.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase microorganisms. Abstracts of the I All-Russian Conference «Fundamental glycobiology», Kazan, 20–24 June 2012. (In Russian).

***Penicillium* sp. — ПРОДУЦЕНТ  
ВНЕКЛЕТОЧНОЙ  $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗЫ**

*E. V. Гудзенко  
Л. Д. Варбанец  
И. Н. Курченко  
Л. Т. Наконечная*

Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

Целью работы было исследовать  $\alpha$ -L-рамнозидазу, которая гидролитически отщепляет концевые невосстановленные  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-связанные остатки L-рамнозы, которые присутствуют как в синтетических, так и в природных гликозидах, олиго-, полисахаридах и различных гликоконъюгатах: производных флавоноидов (рутин, неогесперидин, гесперидин, нарингин, кверцитрин), сапонинов, терпеновых гликозидах. Эти свойства энзима могут быть использованы для нужд пищевой, фармацевтической и химической промышленности: улучшения качества напитков (уменьшения горечи соков, усиления аромата вин), в производстве пищевых добавок, лекарственных препаратов, а также рамнозы.

В результате скрининга, проведенного среди 9 штаммов микромицетов, способность синтезировать  $\alpha$ -L-рамнозидазу выявлена только у *Penicillium* sp. 2918. Из супернатанта культуральной жидкости этого микромицета осаждением сульфатом аммония (90% насыщения) получен комплексный энзимный продукт и изучены его некоторые физико-химические свойства, такие как pH- и термооптимум, pH- и термостабильность, а также субстратная специфичность. Установлено, что этот продукт имеет оптимум pH 6,0, а термооптимум — 60 °C. Препарат *Penicillium* sp. 2918 наряду с  $\alpha$ -L-рамнозидазой проявляет также  $\beta$ -D-глюкозидазную,  $\beta$ -D-галактозидазную и  $\beta$ -D-глюкозаминидазную активность.

**Ключевые слова:** *Penicillium* sp. 2918,  $\alpha$ -L-рамнозидаза, микромицеты, энзимный комплекс, субстратная специфичность.

***Penicillium* sp. — PRODUCER OF  
EXTRACELLULAR  $\alpha$ -L-RHAMNOSIDASE**

*E. V. Gudzenko  
L. D. Varbanets  
I. M. Kurchenko  
L. T. Naconechnaya*

Institute of Microbiology and Virology  
of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

The purpose of this work was to investigate  $\alpha$ -L-rhamnosidase that hydrolytically cleaves the terminal unreduced  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- and  $\alpha$ -1,6-linked rhamnose residues in both synthetic and natural glycosides, oligo-, and polysaccharides, various glycoconjugates: flavonoid derivatives such as rutin, neohesperidin, hesperidin, naringin, quercitrin, saponins, terpene glycosides. These properties of the enzyme could be used for the needs of food industry, pharmaceutical and chemical industry: to improve the quality of beverages (reduction of bitterness, flavor enhancing wines), for production of food additives, medicine preparations and rhamnose.

As a result of screening conducted among 9 strains of micromycetes, ability to synthesize  $\alpha$ -L-rhamnosidase was revealed only in *Penicillium* sp. 2918. Complex enzyme preparation was obtained from culture supernatant of this micromycete by fractionation with ammonium sulfate (90% saturation) and its physico-chemical properties such as pH- and thermo optimum, pH- and thermal stability and substrate specificity were studied as well. It is shown that enzyme has pH optimum is about 6.0 and thermo optimum is about 60 °C. Preparation of *Penicillium* sp. 2918 with  $\alpha$ -L-rhamnosidase reveals  $\beta$ -D-glucosidase,  $\beta$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-glucosaminidase activity.

**Key words:** *Penicillium* sp. 2918,  $\alpha$ -L-rhamnosidase, micromycetes, physical and chemical properties, substrate specificity.