

13. Патент України на корисну модель № 37579 Спосіб підвищення активності мікробних препаратів / Іутинська Г.О., Титова Л.В., Валагурова О.В., Козирицька В.Є., Леонова Н.О., Петрук Т.В., Білявська Л.О. // Опубл. 10.12.2008. – Бюл. № 23.
14. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малашенко Ю.Р. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter sp.* // Микробиология, – 1997. – 66, № 3. – С. 335–340.
15. Tenner E.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов / под ред. В.К. Шильниковой. –М.: Дрофа, 2005. – 256 с.
16. Шерстобоева Е.В., Дудинова И.А., Крамаренко С.Н., Шерстобоев Н.К. Биопрепараты азотфиксирующих бактерий: проблемы и перспективы применения // Микробиол. журн. – 1997. – 59, № 4. – С. 109–117.
17. Dommergues Y.R., Diem H.G., Divies C. Polyacrylamide-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – 37, N 4. – P. 779–781.
18. Elegba M.S., Rennie R.J. Effect of different inoculant adhesive agent on rhizobial survival, nodulation and nitrogenase (acetylene-reducing) activity of soybeans (*Glycine max (L.) Merrill*) // Can. J. Soil Science. – 1984. – 64, N 4. – P. 631–636.
19. Grula M., Huang May-Lin, Sewell G. Interactions of certain polyacrilamides with soil bacteria // Soil Sci. – 1994. – 158, N 4. – P. 291–300.
20. Jawson M.D., Franzluebbbers A.J., Berg R.K. *Bradyrhizobium japonicum* survival in and soybean inoculation with fluid gels // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – 55, N 3. – P. 617–622.
21. Jung G., Mugnier J., Diem H.G., Dommergues Y.R. Polymer-entrapped rhizobium as an inoculant for legumes // Plant Soil. – 1982. – 65, N 2. – P. 219–231.
22. Kremer R.J., Peterson H.L. Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – 45, N 6. – P. 1790–1794.
23. Martin J.P. Decomposition and binding action of polysaccharides in soil // Soil. Biol. Biochem. – 1971. – 3, N 1. – P. 33–41.

Отримано 13.09.2011

УДК 577.152.32

**Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д 03680, Украина*

## **ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗЫ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* 1001**

*Из культуральной жидкости *Styrtococcus albidus* 1001 фракционированием сульфатом аммония, хроматографией на TSK-гелях Toyopearl HW-60 и Fractogel DEAE-650-s, а также на Sepharose 6B выделена  $\alpha$ -L-рамнозидаза. Фермент очищен в 42 раза, его выход 0,7 %. Ферментный препарат не содержал других гликозидазных (кроме  $\beta$ -D-глюкозидазной) и протеолитической активностей. Молекулярная масса фермента по данным гель-фильтрации на Sepharose 6B составила 50 кДа.  $\alpha$ -L-Рамнозидаза стабильна в течение 2 суток при 20 °С. рН-Оптимум составил 4,0-5,0, термооптимум 60 °С.*

*Ключевые слова: *Styrtococcus albidus* 1001,  $\alpha$ -L-рамнозидаза,  $\beta$ -D-глюкозидаза, очистка, рН- и термооптимум, рН- и термостабильность.*

$\alpha$ -L-Рамнозидаза ( $\alpha$ -L-рамнозид-рамногидролаза – К.Ф. 3.2.1.40) гидролитически отщепляет концевые невосстановленные  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,4 и  $\alpha$ -1,6 связанные остатки L-рамнозы в  $\alpha$ -L-рамнозидах: гликолипидах, гликозидах, камедях, пигментах, смолах, специфических иммунополисахаридах, гетерополисахаридах бактериальных клеточных стенок, биофлаваноидах [2].  $\alpha$ -L-Рамнозидазу синтезируют некоторые млекопитающие, растения, грибы и бактерии. Изучены бактериальные продуценты  $\alpha$ -L-рамнозидаз среди фитопатогенных бактерий *Corticium rolfsii*, представителей кишечной микрофлоры человека — *Bacteroides*, *Sphingomonas sp.* и природных изолятов, например, *Clostridium stercorarium*, выделенного из геотермального

© Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец, 2012

источника. [18]. Из грибных продуцентов  $\alpha$ -L-рамнозидаз в промышленности используются ферментные препараты *Penicillium decumbens* и *Aspergillus niger*.

Несмотря на то, что микробные  $\alpha$ -L-рамнозидазы широко используются для улучшения аромата вин и уменьшения горечи в цитрусовых соках, о наличии этой ферментативной активности у дрожжей известно мало. Вместе с тем дрожжи с технологической точки зрения являются наилучшими продуцентами, поскольку характеризуются высокой скоростью роста, устойчивостью к посторонней микрофлоре, способны усваивать любые источники питания и, в отличие от грибов, не загрязняют воздух спорами. Так, низкие уровни рамнозидазной активности были обнаружены у *Saccaromyces cerevisiae* Tokaj 7, *Hansenula anomala*, *Debaryomyces polymorphus* [14], *Aureobasidium pullulans*, *Candida guilliermondii* и *Pichia angusta* X349 [18]. Однако все эти продуценты синтезируют внутриклеточные  $\alpha$ -L-рамнозидазы, что значительно затрудняет работу с ними.

Ранее [7] в результате скрининга дрожжевых музейных культур отдела физиологии промышленных микроорганизмов ИМВ НАН Украины, был отобран перспективный штамм *Cryptococcus albidus* 1001, продуцент внеклеточной  $\alpha$ -L-рамнозидазы, изучены его трофические особенности, отработана оптимальная среда и условия культивирования с использованием математических методов планирования эксперимента [8].

В данной статье приводятся результаты исследований по выделению, очистке, а также изучению ряда физико-химических свойств  $\alpha$ -L-рамнозидазы *C. albidus* 1001.

**Материалы и методы.** Объектом исследования был штамм *Cryptococcus albidus* 1001 (Saito) Skinner IMB Y-5039 – продуцент внеклеточной  $\alpha$ -L-рамнозидазы, изолированный из филосферы кукурузы, 1968 г., Украина.

*C. albidus* культивировали глубинным способом на среде следующего состава, г/л: рамноза – 1, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 3, мальтэкстракт – 3, рН- 6; при температуре 28 °С на качалке со скоростью вращения 220 об/мин в течение 4 суток. По окончании ферментации биомассу отделяли центрифугированием при 5000 g, 30 мин.

$\alpha$ -L-Рамнозидазную активность определяли по методу Davis [9], используя в качестве субстрата нарингин. За единицу активности энзима принимали такое его количество (концентрация белка 1 мг/мл), которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за минуту в условиях опыта. Реакционная смесь содержала 0,1 мл раствора энзима в 0,1 М фосфат-цитратном буфере (ФЦБ), рН 5,2, 0,1 мл 2,5 мМ раствора субстрата. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°С. Реакцию останавливали добавлением 3 мл 4 М раствора NaOH. Через 30 мин измеряли интенсивность окрашивания реакционной смеси при длине волны 310 нм на спектрофотометре СФ26. Удельную активность рассчитывали как количество единиц активности, отнесенное к 1 мг белка.

При определении активности гликозидаз в качестве субстратов использовали следующие нитрофенильные производные (*n*-НФ) углеводов («Sigma», USA): *n*-НФ- $\beta$ -Д-галактопиранозид, *n*-НФ-2-ацетиамидо-2-дезоксид- $\beta$ -Д-галактопиранозид моногидрат, *n*-НФ- $\beta$ -Д-ксилопиранозид, *n*-НФ- $\beta$ -Д-глюкопиранозид, *n*-НФ-2-ацетиамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -Д-глюкопиранозид, *n*-НФ-*N*-ацетил- $\beta$ -Д-глюкозаминид, *n*-НФ- $\beta$ -Д-глюкоронид, *n*-НФ- $\alpha$ -Д-маннопиранозид, *n*-НФ- $\alpha$ -Д-фукопиранозид, *n*-НФ- $\alpha$ -Д-ксилопиранозид.

Для определения активности гликозидаз к 0,1 мл раствора ферментного препарата добавляли 0,2 мл 0,1 М фосфат-цитратного буфера (ФЦБ) рН 5,2 и 0,1 мл 0,01 М раствора соответствующего субстрата в ФЦБ. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при температуре 37°С. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 1 М раствора бикарбоната натрия. К контрольной пробе добавляли те же компоненты, однако, в обратном порядке. Количество *n*-нитрофенола, который образуется в результате гидролиза, определяли колориметрическим методом по поглощению при 400 нм [1]. За единицу активности исследуемых гликозидаз (Е) принимали такое его количество, которое гидролизует 1 мкмоль соответствующего субстрата (“Sigma”, США) за минуту в условиях опыта.

Для выделения ферментного препарата к супернатанту культуральной жидкости добавляли сухой сульфат аммония до концентрации 30 % насыщения под контролем рН (~6,0). Смесь выдерживали в течение 10-12 ч при температуре 4 °С, центрифугировали при 5000 g, 30 мин. Осадок отбрасывали, к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до 90 % насыщения. Смесь выдерживали в течении 6 ч при 4 °С, центрифугировали при тех же условиях.

Осадок, полученный в результате фракционирования сульфатом аммония, центрифугировали, растворяли в 1,5 объеме 0,01 М фосфатного буфера pH 7,0. Образец (приблизительно 30 мг белка) наносили на колонку (2,5 x 90 см) с TSK-Toyopearl HW-60 «Тоюо Soda», (Япония), уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,0. Элюцию проводили тем же буфером, скорость потока 90 мл/ч. Фракции, в которых выявляли  $\alpha$ -L-рамнозидазную активность, собирали, объединяли, концентрировали упариванием под вакуумом (до 9-10 мл, 5-10 мг белка) и наносили на колонку (3x35 см) с Fractogel DEAE-TSK-650-s «Merck» (Германия), уравновешенную 0,01 М трис-HCl буфером pH 6,0. Элюцию проводили в линейном градиенте NaCl (0-1 М), скорость 24 мл/ч. Рехроматографию проводили на колонке (1,3x52 см) с Sepharose 6B, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, pH 6,0. Элюцию осуществляли тем же буфером с 0,1 М NaCl со скоростью 60 мл/ч. На колонку наносили 2 мл образца (~3 мг белка).

Определение общей протеолитической активности проводили по методу Ансона в модификации Петровой [5].

Содержание белка на всех этапах исследования регистрировали на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 280 нм, его количественное содержание определяли методом Lowry et al. [11]. Содержание нуклеиновых кислот определяли методом Спирина [6], нейтральных моносахаридов – методом Dubois et al. [10].

Молекулярную массу фермента оценивали методом гель-фильтрации на колонке с Sepharose 6B (1,3x52 см) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 6,0. Калибровочную кривую для расчета молекулярной массы строили с помощью низкомолекулярных белков-маркеров («Pharmacia», Швеция): рибонуклеаза (13,7 кДа), протеиназа К (25 кДа), овальбумин куриный (43 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа).

Исследование влияния на ферментативную активность температуры проводили в интервале от 0 до 80 °С и значениях pH от 2,0 до 11,0, последний создавали с использованием 0,01 М универсального фосфатного буфера (УФБ). Термостабильность препарата определяли при температуре 37 °С (время экспозиции 90 мин), pH-стабильность – при значениях pH реакционной смеси 4,0; 5,0; 6,0 и 7,0 (время экспозиции 24 часа). После истечения срока действия на фермент того или иного фактора отбирали аликвоты по 0,1 мл и определяли активность, как описано выше.

Результаты всех исследований статистически обрабатывали, используя критерий Стьюдента [4].

**Результаты и их обсуждение.** Получение высокоактивных ферментов в гомогенном состоянии – очень сложная задача, поскольку на многих его этапах необходимо контролировать изменение их активности, чтобы избежать значительных потерь. В то же время для каждого продуцента необходима своя, индивидуальная последовательность этапов получения высокоочищенного препарата фермента. Поскольку бактериальные и особенно грибные продуценты есть полиферментными,  $\alpha$ -L-рамнозидаза, как правило, синтезируется в комплексе с другими гликозидазами [2].

Изучение спектра гликозидазных активностей ( $\beta$ -галактозидазной,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ксилозидазной,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидазной,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозаминидазной,  $\beta$ -глюкоронидазной,  $\alpha$ -маннозидазной,  $\alpha$ -фукозидазной) в культуральной жидкости *S. albidus* 1001 показало, что кроме  $\alpha$ -L-рамнозидазной (0,3 ед/мг белка), выявлено только  $\beta$ -D-глюкозидазную активность (0,1 ед/мг белка).

Для выделения и очистки ферментного препарата  $\alpha$ -L-рамнозидазы *S. albidus* 1001 использовали фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию и рехроматографию на сефарозе 6B. Результаты очистки приведены в таблице.

В результате фракционирования сульфатом аммония активность  $\alpha$ -L-рамнозидазы была повышена в 1,13 раза, а  $\beta$ -D-глюкозидазы в 1,2 раза, а в результате гель-фильтрации 90 % сульфата аммония на TSK-HW-60 была получена фракция I (рис. 1), в которой в 16,6 раза была повышена активность  $\alpha$ -L-рамнозидазы и в 20 раз  $\beta$ -D-глюкозидазы.

Последующая очистка ионообменной хроматографией фракции I на Fractogel DEAE-TSK-650-s с использованием градиента NaCl (0-1 М) (рис. 1) привела к дальнейшему повышению удельной активности обоих ферментов (в 22 и 21 раза по сравнению с исходной) соответственно для  $\alpha$ -L-рамнозидазы и  $\beta$ -D-глюкозидазы (рис. 2). Рехроматографией на сефарозе 6B ферментный препарат был очищен от остаточных сопутствующих белков (рис. 3, I), что дало

возможность повысить активность  $\alpha$ -L-рамнозидазы и  $\beta$ -D-глюкозидазы в 42 и 39 раза, соответственно (рис. 3; II а, II б).

Однако, при помощи использованных методов очистки не удалось избавиться от  $\beta$ -D-глюкозидазы, активность которой составляет 3,9 ед/мг.

Ферментный препарат был свободен от нуклеиновых кислот и содержал приблизительно 5 % углеводов. В препарате не выявлено протеазной активности.

Таблица

Основные этапы очистки ферментного препарата *C. albidus* 1001

Стадии очистки	Фракция	Общее содержание белка, мг	Общая активность*, Е	Выход, %	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Содержание нуклеиновых кислот, мг	Содержание углеводов, мг
Культуральная жидкость	-	390	а-120 б- 40	100	а-0,3 б-0,1	0	67	1260
Фракционирование 90% сульфатом аммония	-	30	а-10,2 б-3,1	7,7	а-0,34 б-0,12	1,13 1,2	31	504
Гель-фильтрация на Тоуорепл HW-60	I	5,46	а-27 б-8,7	1,4	а-5,0 б-2,0	16,6 20	15	76
Анионообменная хроматография на Fractogel DEAE-650-s	I а I б	3,3	а-33 б-10,2	0,85	а-6,6 б-2,1	22 21	0	34
Рехроматография на Sepharose 6B	II а II б	2,8	а-35,2 б-11	0,7	а-12,5 б-3,9	42 39	0	5

\*Примечание: «а» -  $\alpha$ -L-рамнозидазная активность; «б» -  $\beta$ -D-глюкозидазная активность.

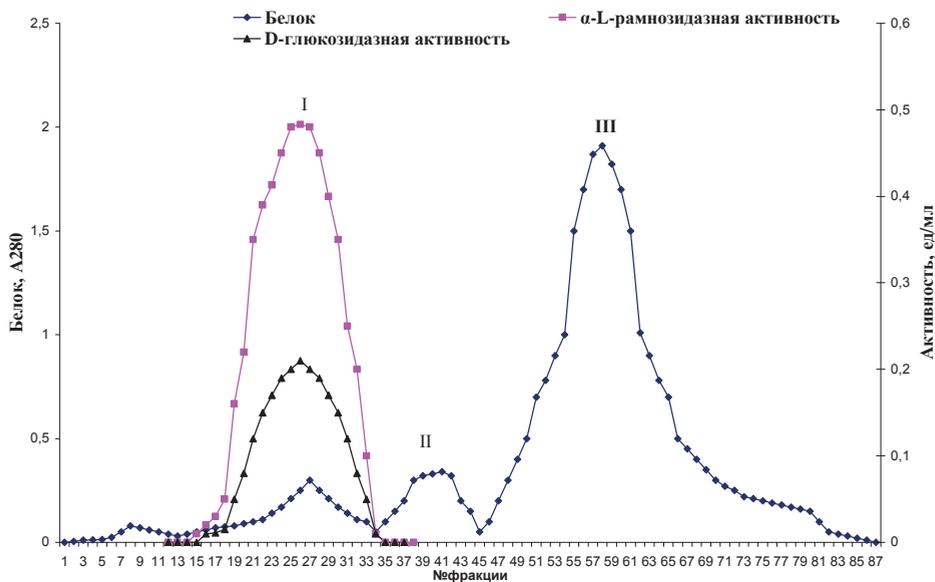


Рис. 1. Профиль элюции комплексного ферментного препарата *C. albidus* 1001 на TSK-HW-60

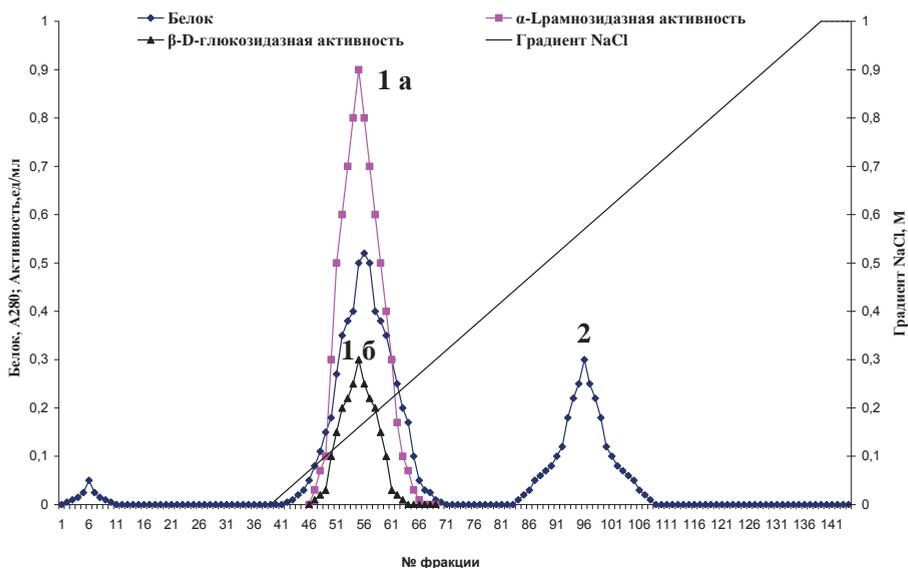


Рис. 2. Профиль элюции ферментного препарата *C. albidus* 1001 на Fractogel DEAE-650-s в градиенте NaCl (0-1 М)

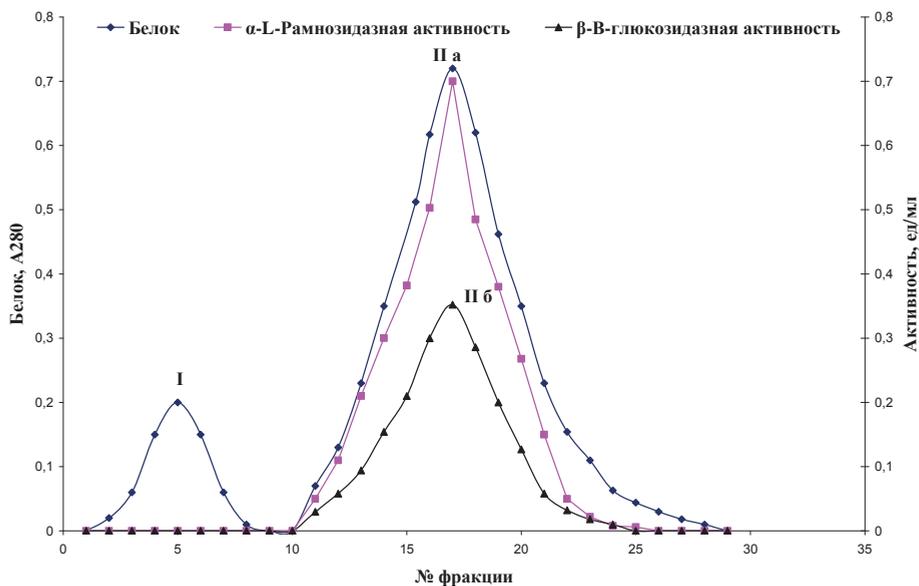
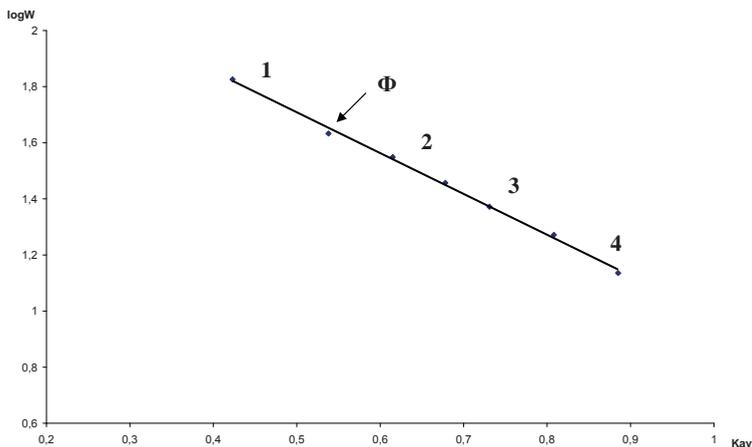


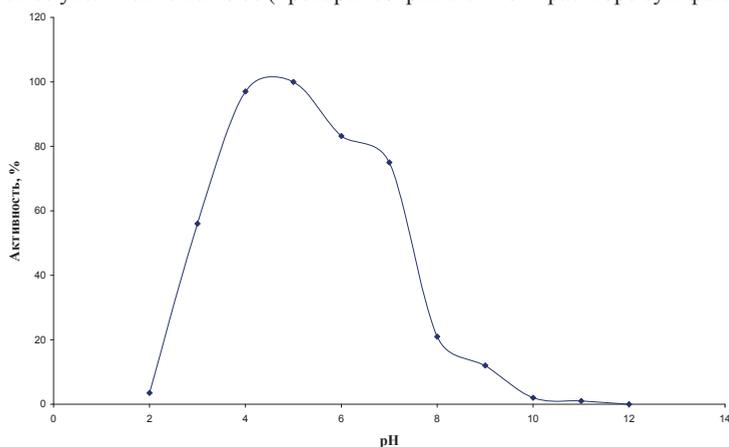
Рис. 3. Профиль элюции ферментного препарата *C. albidus* 1001 на сефарозе 6В

Молекулярная масса ферментного препарата, определенная с помощью гель-фильтрации на сефарозе 6В, составляла 50 кДа (рис. 4). Согласно данным литературы [14] диапазон молекулярных масс  $\alpha$ -L-рамнозидаз различного происхождения очень широкий и разнообразный. Так, молекулярная масса фермента из грибных продуцентов составляла от 70 до 96 кДа, из бактериальных – от 95 до 240 кДа.



**Рис. 4. Молекулярная масса ферментного препарата *C. albidus* 1001 (Ф).  
Маркеры молекулярных масс: 1 – рибонуклеаза (13,7 кДа), 2 – протениназа К (25 кДа),  
3 – овалбумин куриный (43 кДа), 4 – бычий сывороточный альбумин (67 кДа)**

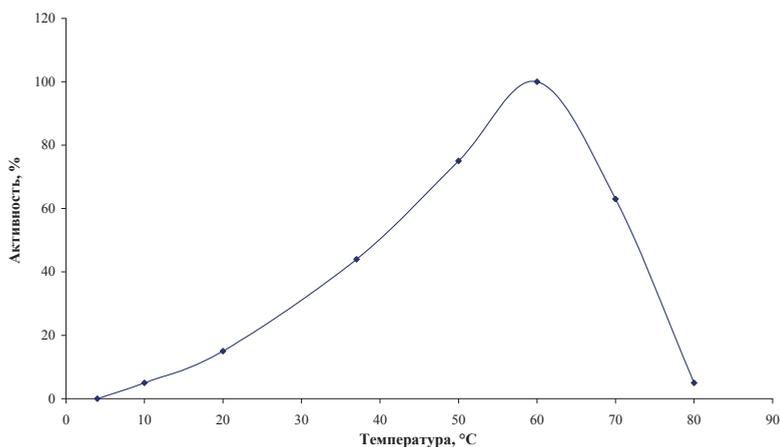
pH-Оптимум  $\alpha$ -L-рамнозидазы *C. albidus* составлял 4,0-5,0, а в диапазоне значений pH от 4,0 до 6,0 сохранялось до 70-80 % от максимальной активности (рис. 5). Ферментный препарат характеризовался высокой стабильностью в данном диапазоне значений pH. В течение 12 мес. при pH 5,0 (4 °C) не только сохранялась исходная активность  $\alpha$ -L-рамнозидазы *C. albidus*, но и наблюдалось ее увеличение на 10 % (препарат сохранялся в 3М растворе сульфата аммония).



**Рис. 5. pH-Оптимум действия  $\alpha$ -L-рамнозидазы *C. albidus* 1001  
(в процентах от максимальной активности)**

По литературным данным [15,16,17,18], показатели pH-оптимумов и pH-стабильностей грибных гликозидаз находятся в интервале значений 4,0-6,0. Так,  $\alpha$ -L-рамнозидаза *A. niger* стабильна в интервале pH 3,0-5,0 на протяжении 8 ч при 30 °C [15]. Фермент *A. terreus* сохранял более 95 % активности при pH 4,0-6,5. При pH > 6,5 активность фермента прогрессивно снижалась, а при pH 8,5 составляла только 10 % от максимальной [16].  $\alpha$ -L-Рамнозидаза *A. aculeatus* стабильна при pH 3,0-5,0, а *A. nidulans* – при pH 4,5 на протяжении 24 ч [17]. Фермент, выделенный из *P. paucimobilis*, был стабилен при pH 5,5-9,0 [14].

Как правило, скорость реакции, которую катализируют ферменты, увеличивается до оптимального значения при увеличении температуры до точки, в которой фермент инактивируется. Было определено, что термооптимум активности  $\alpha$ -L-рамнозидазы *C. albidus* находится при 60 °C (рис. 6). Известно [15], что температурный оптимум действия большинства грибных  $\alpha$ -L-рамнозидаз составляет 60-65 °C, очищенной  $\alpha$ -L-рамнозидазы *A. nidulans* – 60 °C; при снижении температуры до 30 °C ее активность составляла 30 %, а до 20-25 °C – только 15 % исходной максимальной активности.



**Рис. 6. Термооптимум дії препарату α-L-рамнозидази *C. albidus* 1001 (в процентах від максимальної активності)**

Важким показателем для ферментних препаратів є їх термостабільність. Відомо [3], що α-L-рамнозидази різного походження відрізняються термостабільністю: грибові та бактеріальні α-L-рамнозидази зберігають активність на протязі 4-6 год при умові зберігання їх в температурному режимі 20-40 °C. Фермент, виділений з *A. terreus*, був стабілізований після 24 год інкубації при 20 °C. Відомо також, що після заморожування до -20 °C α-L-рамнозидаза *P. raucimobilis* залишалася стабільною на протязі декількох місяців при оптимальних значеннях pH [2,12,13].

Нами показана висока термостабільність досліджуваного ферменту *C. albidus*. Так, спостерігалося повне збереження активності α-L-рамнозидази при 20 °C впродовж двох діб, а при 37 °C – впродовж 90 хв. Підтверджено висока стабільність препарату при зберіганні його в насиченому розчині сульфату амонію (3М) при 4 °C впродовж 1,5 років та ліофілічно висушеного препарату – впродовж 6 міс. Заморожування препарату не знижувало його активності.

Таким чином, з культуральної рідини *C. albidus* виділено та очищено ферментний препарат, який проявляв α-L-рамнозидазну та β-глюкозидазну активності (12,5 та 3,9 од/мг білка відповідно), що трохи вище удільної активності препаратів нарингінази відповідної ступеня очищення, випускаємих зарубіжними фірмами («Sigma» та «Aldrich»), в складі яких також присутній β-D-глюкозидаза. Так, активність комерційних препаратів нарингінази з *Penicillium decumbens* та *Penicillium sp.* становить не більше 10 од/мг білка, а гесперидинази з *A. niger* – 0,5 од/мг білка.

Штамм-продуцент любезно наданий нам з колекції мікроорганізмів відділу фізіології промислових мікроорганізмів, канд. біол. наук С.С. Нагорної, за що виражаємо їй щирою вдячність.

**О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець**

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

## **ОЧИСТКА ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ α-L-РАМНОЗИДАЗИ – CRYPTOCOCCUS ALBIDUS 1001**

### **Резюме**

З культуральної рідини *Cryptococcus albidus* 1001 фракціонуванням сульфатом амонію, хроматографією на TSK-гелях Тоуорелл HW-60 і Fractogel DEAE-650-s та Sepharose 6B виділено α-L-рамнозидазу. Фермент очищений в 42 рази, його вихід 0,7 %. Ферментний препарат не містив глікозидазних (крім β-D-глюкозидазної) і протеолітичної активності. Молекулярна маса ферменту за даними гель-фільтрації на Sepharose 6B складала 50 кДа. α-L-Рамнозидаза стабільна протягом 2 діб при 20°C. pH-оптимум склав 4,0-5,0, термооптимум при 60°C.

Ключові слова: *Cryptococcus albidus* 1001, α-L-рамнозидаза, β-D-глюкозидаза, очистка, pH- і термооптимум, pH- і термостабільність

**PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES  
OF *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* 1001  $\alpha$ -L- RHAMNOSIDASE**

Summary

A scheme of isolation and purification of the enzyme with  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity from culture liquid *Cryptococcus albidus* 1001 has been developed. It included fractionation by ammonium sulfate and chromatography on TSK-gels Toyopearl HW-60, Fractogel TSK DEAE-650-s and Sepharose 6B. The enzyme was purified 42 times with the yield of 0.7 %. The enzyme preparation did not contain any glycosidase (except of  $\beta$ -D-glucosidase) and proteolytic activity. Molecular mass of the  $\alpha$ -L-rhamnosidase preparation by the data of Sepharose 6B gel-filtration was 50 kDa. The enzyme preparation was stable during 48 hours at 20 °C, its pH and thermal optimum were 4.0-5.0 and 60 °C, correspondingly.

The paper is presented in Russian.

**К е у в о р д с:** *Cryptococcus albidus* 1001,  $\alpha$ -L-rhamnosidase,  $\beta$ -D-glucosidase, purification, pH-and thermal optimum, pH- and thermal stability.

**The a u t h o r ' s a d d r e s s:** Gudzenko O.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Борзова Н.В., Маланчук В.Н. Скрининг продуцентов  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидазы среди микроорганизмов различных таксономических групп // Микробиол. журн. – 2000. – **62**, №5. – С.34–41.
2. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010. – 437 с.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – 816 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа. – 1990. – 352с.
5. Петрова И.С., Винционайте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохим. и микробиол. –1966. – **2**, №1. – С. 322–327.
6. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509 с.
7. Рзасва О.М., Варбанець Л.Д., Нагорна С.С., Скрининг продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази серед дріжджів //Мікробіол. журн. – 2010. – **72**, №6. – С.11–17.
8. Рзасва О.М., Варбанець Л.Д., Гудзенко О.В. Оптимізація умов культивування дріжджів *Cryptococcus albidus* продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази // Там само. – 2010. – **72**, №1. – С. 11–16.
9. Davis W.B. Determination of flavonones in citrus fruits // Anal. Chem. – 1947. –**19**, № 7. – P. 476–478.
10. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Ibid. – 1956. – **28**, N 3. – P. 350–356.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J. Protein measurement with folinphenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 2. – P. 265–275.
12. Manzanares P, van den Broeck H.C., de Graff L.H., Visser J. Purification and characterization of two different  $\alpha$ -L-rhamnosidases, Rha A and Rha B, from *Aspergillus aculeatus* // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – **67**, N 5. – P. 2230 – 2234.
13. Manzanares P, Orejas M., Ibanez E., Valles S. et al. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans* // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – **31** – P. 198–202.
14. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M.  $\alpha$ -L-rhamnosidase: old and new insights //Industrial Enzymes. – Springer, 2007. – P. 117–140.
15. Monti D., Pisvejcova A., Kren V., Lama M., Riva S. Generation of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products // Biotechnol. Bioengin. – 2004. – **87**, N 6. – P. 765–771.
16. Soares N. F., Hotchkiss J.H. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice // J. Food. Sci. – 2002. – **34**. – P. 461–465.
17. Spagna G., Barbagallo R.N., Martino A., Pifferi P.G. A simple method for purifying glycosydases:  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine // Enzyme Microbiol. Technol. – 2000. – **27**. – P. 522–530.
18. Takaaki Y, Michikatsu S. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Pichia angusta* X 349 // Biosci. Biotechnol. Biochem. –2000. – **64**. – P. 2179–2185.
19. Terada Y, Kometani T., Nishimura T., Takii H., et al. Prevention of hesperidin crystal formation in canned mandarin orange syrup and clarified orange juice by hesperidin glycosides // Food Sci. Technol. Int. – 1995. – **1**. – P. 29–33.

Отримано 13.09.2011