

О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
буль. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна*

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *PENICILLIUM TARDUM* – ПРОДУЦЕНТА α -L-РАМНОЗИДАЗИ

*Вивчення впливу деяких технологічних параметрів на процес біосинтезу позаклітинної α -L-рамнозидази *Penicillium tardum* показало, що для максимального продукування ферменту оптимальними джерелами вуглецю та азоту були рамноза (8 г/л), дріжджовий автолізат (2 г/л), температура вирощування 25°C та початкове рН середовища 5,0. Встановлено, що максимальний рівень α -L-рамнозидазної активності досягається на 4-ту добу культивування при значенні сульфітного числа 0,44. При вирощуванні в підібраних умовах синтез α -L-рамнозидази підвищився в чотири рази.*

*К л ю ч о в і с л о в а: *Penicillium tardum*, α -L-рамнозидаза, оптимізація умов культивування, джерела вуглецю та азоту.*

α -L-Рамнозидаза [К.Ф. 3.2.1.40] гідролітично відщеплює термінальні невідновлені залишки L-рамнози, що присутні як в синтетичних, так і в природних глікозидах, оліго-, полісахаридах, гліколіпідах і різних глікокон'югатах: похідних флавоноїдів - рутині, неогесперидині, гесперидині, нарингіні, кверцитрині; сапонінах - гінзенозидах; терпенових глікозидах - азіатикозидах. Такі властивості ферменту обумовлюють можливості його використання для створення на основі глікозидів рослинного походження, таких як рутин, кверцитрин, гесперидин, засобів для лікування серцево-судинних захворювань, препаратів із противірусною та імунотропною дією. Гідролізуючи терпенові глікозидази, α -L-рамнозидаза сприяє вивільненню ароматичних сполук, які підсилюють аромат виноградних соків і вин, тому фермент використовується і в харчовій промисловості.

Відомо, що α -L-рамнозидазу здатні синтезувати деякі ссавці [1], рослини [7], а також мікроорганізми - представники різних таксономічних груп. У першу чергу це мікроміцети, серед яких найбільша кількість продуцентів глікозидаз [6-10]. На сьогодні у промисловості використовуються ферментні препарати *Penicillium decumbens* і *Aspergillus niger*, які синтезують нарингінназу і гесперидиназу відповідно (Sigma-Aldrich, USA). Проте найбільш вивченими є бактеріальні продуценти α -L-рамнозидаз, які виявлені серед *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Bacillus* sp., *Clostridium stercorarium* [1, 7]. Але всі ці продуценти синтезують внутрішньоклітинні α -L-рамнозидази, що значно ускладнює їх виділення, що є економічно нерентабельним.

Оскільки більшість мікробних продуцентів має ряд серйозних недоліків, пошук нових, більш ефективних продуцентів продовжує залишатися актуальним питанням, враховуючи те, що в Україні продуценти α -L-рамнозидаз взагалі відсутні.

Досягнення найвищої продукції ферментів – одне з основних завдань наукових досліджень. Одним із шляхів збільшення активності є оптимізація умов культивування штаму-продуцента. Тому метою даної роботи була оптимізація умов культивування *Penicillium tardum* для підвищення синтезу позаклітинної α -L-рамнозидази.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень був штаб *P. tardum*, який був люб'язно наданий нам із колекції живих культур відділу фізіології і систематики мікроміцетів ІМВ НАН України. Штаб був відібраний внаслідок скринінгу серед 9 штамів мікроміцетів представників родів: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*.

Оптимізацію середовища росту здійснювали з використанням як базового середовища Чапека такого складу, г/л: NaNO_3 -2; KH_2PO_4 -1; KCl -0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; рамноза – 10, рН-6,0.

Культуру *P. tardum* вирощували в глибинних умовах за температури 25 °С в колбах Ерленмейера (750 мл), які містили 100 мл поживного середовища. Як джерело вуглецю використовували: ксилозу, арабінозу, глюкозу, галактозу, рамнозу, манозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маніт (в концентрації 10 г/л в перерахунку на вуглець). У цьому випадку як джерело азоту в середовище додавали нітрат натрію.

Як джерело азоту (в концентрації 2 г/л в перерахунку на азот) використовували нітрат натрію, хлорид амонію, сульфат амонію, ацетат амонію, дріжджовий автолізат, дріжджовий екстракт, пептон, сечовину, соєву муку, гліцин.

Вплив умов культивування (рН, температура, аерація) вивчали на середовищі, оптимізованому за джерелами вуглецю і азоту. Вплив рН на активність ферменту вивчали, вирощуючи *P. tardum* за вихідних значень рН середовища: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0.

Для вивчення впливу аерації на синтез ферменту культуру *P. tardum* вирощували у колбах Ерленмейера (750 мл), які містили різні об'єми середовища: 50, 100, 150, 200, 250 мл живильного середовища за швидкості обертання качалки 160 і 250 об/хв.

Посівний матеріал у колби вносили в концентрації 2, 3, 5, 10 і 15 % від об'єму живильного середовища.

Для визначення α -L-рамнозидазної активності до 0,1 мл розчину ферменту додавали 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буферу (ФЦБ) рН 5,2 та 0,1 мл 0,01 М розчину субстрату 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 [1]. За одиницю активності ферменту приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах дослідження.

Визначення активності проводили, використовуючи синтетичний субстрат *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозид ("Sigma-Aldrich", США).

Білок визначали за методом Лоурі [5]. Калібрувальну криву будували з використанням як стандарту бичачого сироваткового альбуміну.

Питома активність – кількість одиниць активності на 1 мг білка (од/мг білка).

Усі дослідження проводили у 5-8 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводився шляхом їх статистичної обробки методами варіаційної та кореляційної статистики з використанням *t*-критерію Стюдента [2]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ($M \pm m$). Значення при $P < 0,05$ розглядали як достовірні. Результати, що подані графічно, обробляли за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

Результати та їх обговорення. Рівень активності позаклітинного ферменту при періодичному режимі культивування значною мірою залежить від тривалості вирощування продуцента [1, 3, 9, 10]. Проведені дослідження свідчать, що концентрація позаклітинних білків збільшувалася у міру вирощування культури *P. tardum*. Максимальну секрецію α -L-рамнозидази штамом-продуцентом реєстрували з досягненням стаціонарної фази (рис. 1) на четверту добу культивування.

Одержані нами результати не узгоджуються з даними деяких дослідників [11], які повідомляють про максимальний синтез нарингінази *Aspergillus niger* МТСС-1344 на восьму добу культивування.

Результати дослідження впливу параметрів культивування (рис. 2) свідчать, що найбільш ефективним для синтезу α -L-рамнозидази *P. tardum* було використання середовища з початковим значенням рН 5,0, в той час як при початкових значеннях рН 3,0 та вище рН 7,0 активність ферменту суттєво гальмувалася. Під час росту культури значення рН суттєво не змінювалось.

Подібні результати були отримані для α -L-рамнозидаз *P. angusta* Х349 [7], *A. fumigatus* МТСС-3376 [1] і *P. commune* [3], які вирощували при початковому рН середовища 4,5-5,5.

Таким чином, одержані оптимальні значення рН для *P. tardum*, близькі до тих, що наводяться в літературі.

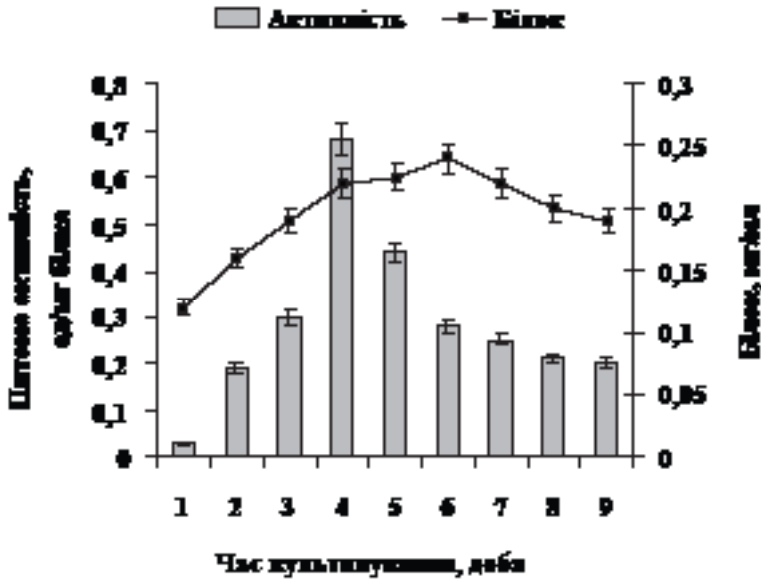


Рис. 1. Динаміка синтезу α -L-рамнозидази *P. tardum*

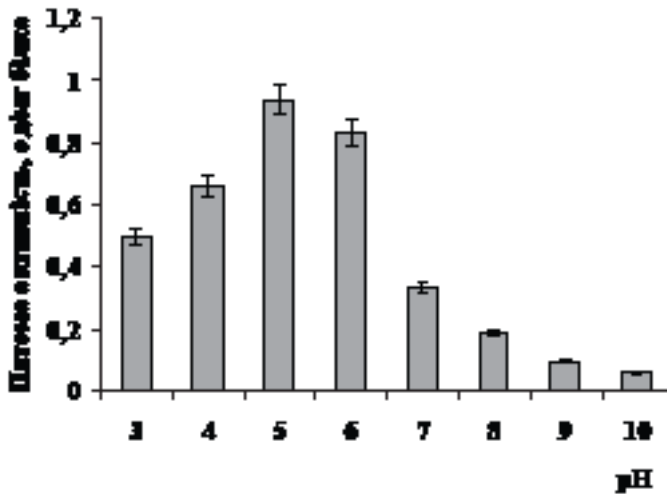


Рис. 2. Вплив початкового значення рН на синтез α -L-рамнозидази *P. tardum*

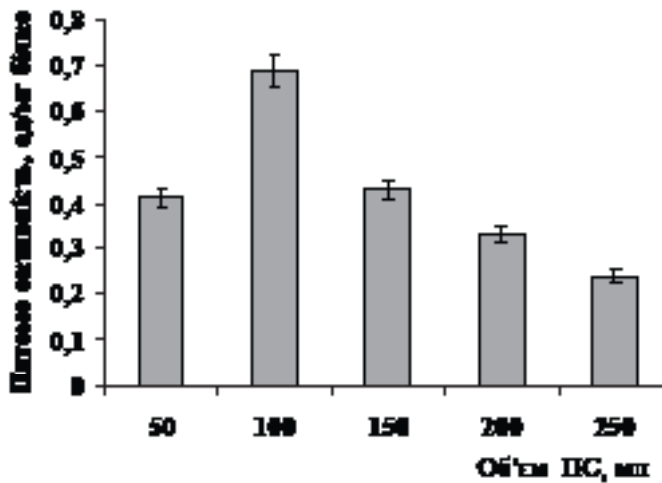


Рис. 3. Вплив об'єму поживного середовища на синтез α -L-рамнозидази *P. tardum*

Суттєвий вплив на синтез ферментів проявляє також температура вирощування продуцента. Дослідження впливу температури показало, що оптимальною для синтезу α -L-рамнозидази *P. tardum* була температура 25 °С (табл. 1).

При оптимальній температурі здійснювали відпрацювання оптимальної кількості посівного матеріалу. Встановлено (табл. 1), що максимальний рівень активності ферменту досягався при внесенні 10 % інокулюма. Внесення ж більшої (15-25 %) або меншої (5 %) кількості посівного матеріалу не призводило до зростання α -L-рамнозидазної активності у досліджених штамів. Подібні результати були отримані D. Monti зі співавторами [8], які спостерігали максимальний синтез грибних α -L-рамнозидаз за концентрації інокулюму 10 %. Однак отримані дані не узгоджуються з результатами V. Kumar [10], який відзначив позитивний вплив на синтез α -L-рамнозидази *A. niger* MTCC-1344 15 % інокулюму.

Важливу роль у прояві ферментативної активності відіграє також вік інокулюму. Так, засів трьохдобовим інокулюмом (табл. 1) дає найкращі результати.

Таблиця 1

**Оптимальні параметри глибинного культивування
P. tardum – продуцента α -L-рамнозидази**

Параметри культивування:	
Вік інокулюму, діб	3
Кількість посівного матеріалу, %	10
pH	5,0
Температура, °С	25
Тривалість, доба	4
Сульфітне число, г О ₂ /(л/год)	0,44

При вивченні впливу інтенсивності аерації на продукцію α -L-рамнозидази показано, що більші об'єми живильного середовища в колбах, які знижують швидкість розчинення кисню, спричиняють незначне зменшення активності α -L-рамнозидази. Максимальний рівень α -L-рамнозидазної активності спостерігали за значень сульфітного числа 0,44 (табл. 1), що відповідає 100 мл поживного середовища в колбі (рис. 3). Тобто, для досягнення максимальної α -L-рамнозидазної активності потрібна ефективна аерація.

При оптимізації середовища росту *P. tardum* використовували такі концентрації джерел вуглецю і азоту, які наводяться іншими авторами при вивченні їх впливу на синтез α -L-рамнозидаз [1, 3, 8-11].

При вирощуванні *P. tardum* з різними джерелами азоту показано (рис. 4), що найбільш оптимальним для біосинтезу α -L-рамнозидази є використання дріжджового автолізу.

Дослідження впливу деяких вуглецьвмісних сполук (у концентрації 10 г/л) на синтез α -L-рамнозидази *P. tardum* показало (рис. 5), що арабіноза, ксилоза, маноза, маніт, мальтоза, глюкоза, лактоза, сахароза, галактоза не забезпечували синтезу ферменту. Найкращим джерелом вуглецю виявилась рамноза. Це узгоджується з літературними даними [3, 7-11], згідно з якими такі джерела вуглецю як нарингін, рутин і рамноза індують синтез α -L-рамнозидази, в той час як арабіноза, ксилоза, арабіногалактан, фруктоза, пектин, целюлоза, ксилан та арабани не впливають на синтез ферменту.

Вивчення впливу рамнози (рис. 6) на синтез α -L-рамнозидази свідчить, що найвищий рівень α -L-рамнозидазної активності в культуральній рідині *P. tardum* спостерігається в разі використання L-рамнози в концентрації 8 г/л. Ці результати узгоджуються з більшістю літературних даних [3, 6-11], за якими продуценти досягли найвищих показників синтезу α -L-рамнозидази при концентрації 5-10 г/л рамнози у середовищі культивування.

Таким чином, внаслідок проведених досліджень оптимізовано умови культивування продуцента, а саме склад живильного середовища (в г/л): рамноза – 8, дріжджовий автолізат – 2; KH_2PO_4 – 1; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015 та відпрацьовані параметри культивування, зокрема вік інокулюма - 3 добовий; 10 % посівного матеріалу, початкове pH середовища 5,0; температура вирощування 25 °С, тривалість культи-

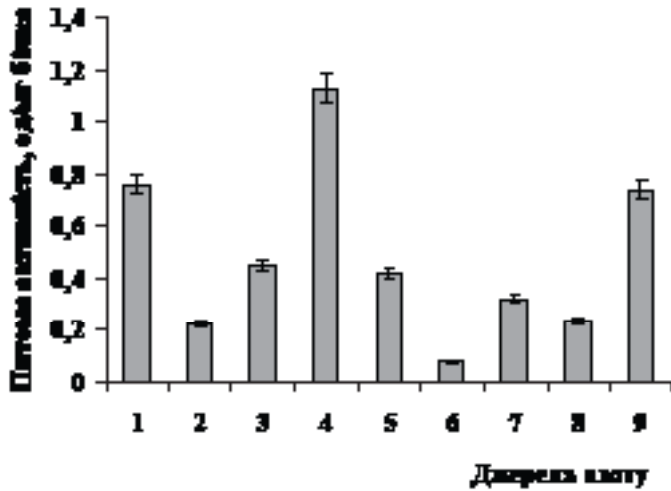


Рис. 4. Вплив різних джерел азоту: NaNO_3 (1), NH_4Cl (2), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3), дріжджовий автолізат (4), пептон (5), сечовина (6), соєве борошно (7), NH_4NO_3 (8), дріжджовий екстракт (9) на α -L-рамнозидазну активність *P. tardum*

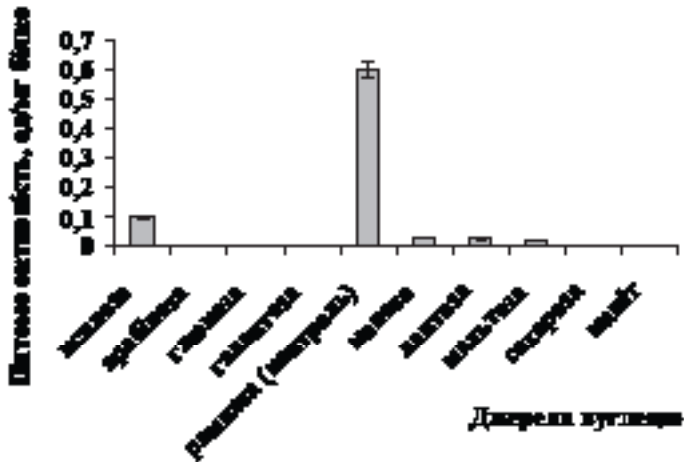


Рис. 5. Вплив різних джерел вуглецю на α -L-рамнозидазну активність *P. tardum*

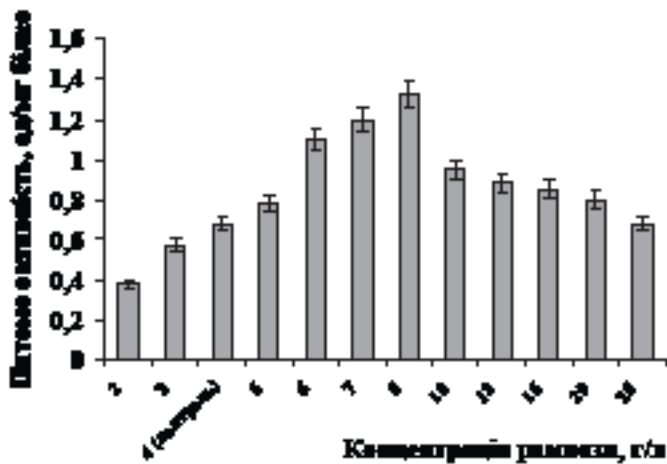


Рис. 6. Вплив різних концентрацій рамнози на α -L-рамнозидазну активність *P. tardum*

вування - 4 доби. Вирощування в підібраних умовах привело до збільшення в чотири рази синтезу α -L-рамнозидази в культуральній рідині *P. tardum*, активність якої складала 1,6 од/мг білка.

*Автори висловлюють щире подяку співробітникам відділу фізіології і систематики мікроміцетів ІМВ НАН України докт. біол. наук., зав. відділу Курченко І.М., пров. інж. Наконечній Л.Т. за люб'язно наданий для досліджень штам *P. tardum*.*

Гудзенко Е.В., Варбанець Л.Д.

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

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PENICILLIUM TARDUM* – ПРОДУЦЕНТА α -L-РАМНОЗИДАЗЫ

Резюме

Изучение влияния некоторых технологических параметров культивирования на процесс биосинтеза внеклеточной α -L-рамнозидазы *Penicillium tardum* показало, что для максимального биосинтеза оптимальными источниками углерода и азота являются рамноза (8 г/л), дрожжевой автолизат (2 г/л), температура 25 °С, исходное рН среды 5,0. Установлено, что максимальный уровень α -L-рамнозидазной активности достигается на четвертые сутки культивирования при значении сульфитного числа 0,44. При выращивании в отработанных условиях синтез α -L-рамнозидазы повысился в четыре раза.

Ключевые слова: *Penicillium tardum*, α -L-рамнозидаза, оптимизация, источники углерода и азота.

Gudsenko O.V., Varbanets L.D.

*Institute of microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS OF *PENICILLIUM TARDUM* – THE α -L- RHAMNOSIDASE PRODUCER

Summary

The influence of some technological cultivation parameters of *Penicillium tardum* to synthesize of the extracellular α -L-rhamnosidase were studied. It was shown that rhamnose (0,8 %), yeasts autolysate (0,2 %), temperature of the cultivation 25 °C, pH 5,0 are necessary for maximal α -L-rhamnosidase production. The enzyme reaches the maximal activity level in 96 hours with sulphitic number equal 0,44. At cultivation of *P. tardum* in the picked up conditions the α -L- rhamnosidase synthesis has raised in 4 times.

Key words: *Penicillium tardum*, α -L-rhamnosidase, the optimization of the cultivation conditions, carbon and nitrogen sources.

1. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. - Київ: Наук. думка, 2010. - 437 с.
2. Лакін Г.Ф. Биометрия // М.: Высш. школа. – 1990. – 325 с.
3. Рзаєва О.М., Варбанець Л.Д. Оптимізація умов культивування *Penicillium palitans* штамму 266, що синтезує α -L-рамнозидазу // Мікроб. журнал. – 2006. – **68**, № 6. – С.10–20.
4. Davis W.B. Determination of flavonones in citrus fruits // Anal. Chem. – 1947. – **19**, № 7. – P. 476–478.
5. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
6. Manzanares P, van den Broeck H.C., de Graff L.H., Visser J. Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, Rha A and Rha B, from *Aspergillus aculeatus* // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – **67**, №5. – P. 2230–2234.

7. *Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M.* α -L-rhamnosidase : old and new insights // *Industrial Enzymes*, Springer, 2007. – P. 117–140.
8. *Monti D., Pisvejcova A., Kren V., Lama M., Riva S.* Generation of an α -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products // *Biotechnol. Bioengin.* – 2004. – **87**, № 6. – P. 765–771.
9. *Puri M., Banerjee A., Banerjee U.C.* Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC-1344 // *Process Biochemistry*. – 2005. – **40**, № 1. – P.195–201.
10. *Vinoth Kumar V.* Comparative studies on inducers in the production of naringinase from *Aspergillus niger* MTCC 1344 // *African J. of Biotechnol.* – 2010. – **9**, № 45. – P.7683–7686.
11. *Yadav S., Yadav K.D.S.* Secretion of α -L-rhamnosidases by some indigenous fungal strains // *J. of Scientific and Industrial Research*. – 2004, **63**. – P.439–443.

Отримано 11.06.2014