

**О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

## **ОЧИСТКА ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗИ *PENICILLIUM TARDUM***

*Фракціонуванням сульфатом амонію, хроматографією на TSK-гелях Toyopearl HW-60 та Fractogel DEAE-650-s із супернатанта культуральної рідини *Penicillium tardum* IMB F-100074 виділено і очищено у 23 рази фермент з  $\alpha$ -L-рамнозидазною активністю, вихід якого складав 3,12 %. Питома активність ферменту складала 27,7 од/мг білка, молекулярна маса 67 кДа, температурний і рН-оптимум - 60 °С і рН 5,0 відповідно. Показана висока рН- і термостабільність очищеного препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum*, яка може бути обумовлена наявністю вуглеводного компоненту, який складав 12 %.*

*Ключові слова: *Penicillium tardum*,  $\alpha$ -L-рамнозидазна активність, очистка, рН- і термооптимум, рН- і термостабільність.*

Однією з важливих проблем сучасної біотехнології є використання ферментів мікробного походження. Це обумовлено тим, що клітини мікроорганізмів можна вирощувати в значній кількості на дешевих поживних середовищах, що дає можливість впливати на продукцію біологічно активних речовин шляхом зміни умов культивування. Такі дослідження дозволяють у декілька разів підвищити вихід цільового продукту. Найбільш перспективними для широкого використання є гідролітичні ферменти, зокрема  $\alpha$ -L-рамнозидаза ( $\alpha$ -L-рамнозид-рамногідролаза - КФ 3.2.1.40), яка характеризується специфічністю щодо термінальних залишків рамнози, присутніх у природних глікокон'югатах та синтетичних глікозидах. Це обумовлює можливості використання  $\alpha$ -L-рамнозидаз у харчовій промисловості для підвищення засвоєння флавоноїдів при гідролізі нарингіну, гесперидину та інших ароматичних сполук, що покращує якість продуктів, які їх містять; у фармацевтичній промисловості – у процесах ензиматичного гідролізу рамнозидів, а також у хімічній промисловості – як попередники для хімічного синтезу рамнози [1, 2, 13].

Отримання високоактивних ензимів у гомогенному стані – надзвичайно складне завдання, тому що містить низку етапів, на яких необхідно контролювати зміни їх активності, щоб уникнути значних втрат. Поряд з цим, для кожного продуцента потрібно розробляти свою, індивідуальну послідовність етапів отримання очищеного препарату ензиму.

Раніше [5] було показано, що *Penicillium tardum* IMB F-100074 синтезує  $\alpha$ -L-рамнозидазу в максимальній кількості на четверту добу культивування у глибинних умовах. Враховуючи перспективність практичного застосування  $\alpha$ -L-рамнозидаз у певних галузях промисловості, метою роботи було виділення і очищення даного ензиму із супернатанту культуральної рідини штаму-продуцента, а також вивчення його фізико-хімічних властивостей.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження була позаклітинна  $\alpha$ -L-рамнозидаза штаму *Penicillium tardum*, задепонованого в Українській колекції мікроорганізмів за номером IMB F-100074.

*P. tardum* IMB F-100074 культивували в рідкому поживному середовищі, оптимізованому нами раніше [5], що містило, г/л: рамноза – 5; дріжджовий автолізат – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015; рН 5,0. Вирощування проводили у колбах Ерленмейєра (750 мл), які містили 100 мл рідкого середовища, на кругових качалках при 220 об/хв при температурі 25 °С протягом 4 діб.

Препарат  $\alpha$ -L-рамнозидази одержували із супернатанту культуральної рідини *P. tardum* після відокремлення біомаси фільтруванням через 4 шари марлі, а також осадження сульфатом амонію до 90 % насичення. Суміш витримували 12-16 год. при температурі 4 °С і центрифугували при 5000 g упродовж 30 хв. Осад збирали, розчиняли у 1,5 об'ємах 0,01 М фосфатного буфера рН 7,0. Зразок (близько 20-30 мг білка) наносили на колонку (2,5×90 см) з нейтральним TSK-гелем – Тоуорелл HW-60 фірми “Тоуо Soda”, Японія, урівноважену 0,01 М фосфатним буфером рН 7,0. Фракції елюювали тим же буфером зі швидкістю 90 мл/год. Вміст білка реєстрували на СФ-26 при 280 нм. Фракції, що містили  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність, збирали, об'єднували та концентрували (у 5 разів) упарюванням під вакуумом. Отримані зразки (4-5 мл, 7-10 мг білка) наносили на колонку (3×35 см) з Fractogel DEAE-650-s “Merck”, Німеччина, урівноважену 0,01 М Трис-НСІ буфером рН 7,8. Елюцію проводили в лінійному градієнті  $\text{NaCl}$  (0 – 1 М, по 200 мл) зі швидкістю 24 мл/год.

Для визначення активності глікозидаз до 0,1 мл розчину ензиму додавали 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера (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 [16]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв. в умовах досліду.

Визначення глікозидазних активностей проводили, використовуючи відповідні синтетичні субстрати: *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -D-глюкопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -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).

При визначенні  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності з використанням природного субстрату нарингину використовували метод Davis [9].

Вміст білка на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм, його кількість визначали за методом Lowry et al. [12]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали при довжині хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

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

Термостабільність препарату визначали при температурах 15-70 °С (час експозиції 90 хв.), рН-стабільність — при показниках рН середовища 4,0; 5,0; та 6,0 (час експозиції 90 хв.). Після вичерпання часу дії на

ензимний препарат відповідного фактору відбирали аліквоти по 0,1 мл і визначали активність, як описано вище.

Визначення молекулярної маси ферменту проводили у нативній системі за допомогою гель-фільтрації на колонці (1,3×50 см) з Sepharose 6B. Вільний об'єм колонки, який був встановлений із застосуванням блакитного декстрану 2000, становив 13 мл. Колонку було урівноважено 0,01 М фосфатним буфером рН 6,0. На колонку наносили 1 мл розчину ферменту (10 мг), збільшивши попередньо густину розчину додаванням сахарози в кінцевій концентрації 0,5 М. Елюцію проводили тим же буфером з 0,1 М NaCl. Швидкість елюції — 0,1 мл/хв. Калібрувальну криву для розрахунку молекулярної маси будували за допомогою білків-маркерів фірми "Pharmacia" (Швеція): рибонуклеази (13,7 кДа), протеїнази К (25,0 кДа), овальбуміну курячого (43,0 кДа), бичачого сироваткового альбуміну (67,0 кДа).

Кількість вуглеводів визначали за Dubois et al. [10]: реакційна суміш містила 0,5 мл досліджуваного розчину ферменту, 0,5 мл 5 % фенолу і 2,5 мл сірчаної кислоти (концентрованої). Витримували суміш при кімнатній температурі протягом 40 хв., вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 490 нм. Кількість вуглеводів визначали відповідно до стандартної кривої, побудованої за глюкозою.

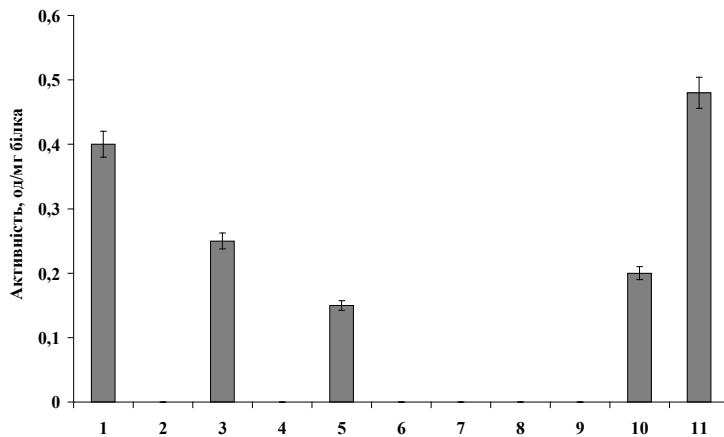
Усі досліди проводили у 5-7 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводився шляхом їх статистичної обробки методами варіаційної та кореляційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента [6]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ( $M \pm m$ ). Значення при  $P < 0,05$  розглядали як достовірні. Результати, що подані графічно, обробляли за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

**Результати та обговорення.** Відомо [1, 13, 18], що мікроміцети здатні синтезувати позаклітинні глікозидази широкого спектру дії. Це пов'язано з тим, що їх природним середовищем існування є рослинні відходи, які містять значну кількість оліго- і полісахаридів, а також складних вуглецьмісних сполук.

Раніше [5] було показано, що *P. tardum* IMB F-100074 синтезує  $\alpha$ -L-рамнозидазу в максимальній кількості на четверту добу культивування в глибинних умовах. Тому, відповідно до умов максимального синтезу, шляхом осадження сульфатом амонію білка з супернатанта культуральної рідини, було отримано комплексний ензимний препарат. Вивчення спектру глікозидазних активностей (рис. 1) 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.

Подібний спектр глікозидазних активностей було виявлено нами раніше [3] в супернатанті культуральної рідини *Eupenicillium erubescens*, який, крім *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду, гідролізував *n*-нітрофеніл- $\beta$ -N-ацетилгалактозамінід, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -N-ацетил-глюкозамінід і *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид.

Шляхом осадження сульфатом амонію супернатанту культуральної рідини *P. tardum*, було отримано комплексний ензимний препарат, який розділяли методом гель-фільтрації на колонці з нейтральним гелем Toyopearl HW-60, використовуючи 0,01 М фосфатний буфер рН 7,0. Показано, що

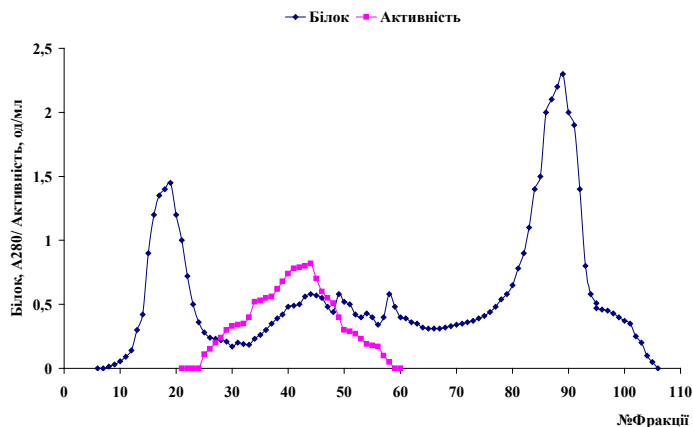


**Рис. 1.** Спектр глікозидазних активностей супернатанту культуральної рідини *P. tardum* IMB F-100074. Субстрати: *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид – 1, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-глюкопіранозид – 2, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид – 3, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-галактопіранозид – 4, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозид – 5, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-ксилопіранозид – 6, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-ксилопіранозид – 7, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-манопіранозид – 8, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-фукопіранозид – 9, *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкозамінід – 10, нарингін – 11

фракція з  $\alpha$ -L-рамнозидазною активністю виходить одним широким піком (рис. 2). Встановлено, що зібрана фракція, поряд з  $\alpha$ -L-рамнозидазною, містила також незначну  $\beta$ -D-глюкозидазну активність.

Подальшу очистку препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази проводили іонообмінною хроматографією на зарядженому TSK-гелі, Fractogel DEAE 650-s (рис. 3). Показано, що, за умов використання 0,01 М трис-НСІ буферу рН 7,8, фракція з  $\alpha$ -L-рамнозидазною активністю виходить в градієнті NaCl. Це дало можливість підвищити  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність у 23 рази завдяки позбавленню супутніх білкових домішок, у тому числі і  $\beta$ -D-глюкозидази.

Отже, із супернатанту культуральної рідини *P. tardum* IMB F-100074 було виділено  $\alpha$ -L-рамнозидазу. Вихід цього ензиму в результаті дво-стадійної очистки становить 3,12 % (табл. 1), питома  $\alpha$ -L-рамнозидазна активність складає 27,7 од/мг білка. У складі  $\alpha$ -L-рамнозидази визна-



**Рис. 2.** Профіль елюції на TSK-HW-60 комплексного ферментного препарату *P. tardum* IMB F-100074

чено 12 % вуглеводів. Наявність вуглеводів в очищених препаратах  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* і *E. erubescens* була виявлена нами раніше [3, 4] і складала 5 та 1 % від маси препаратів відповідно.

Для визначення молекулярної маси частіше використовують такі методи, як гель-хроматографія та гель-електрофорез в нативних і денатурованих умовах [8]. Ці методи дозволяють точно встановити не тільки молекулярну масу білка, але й показати наявність або відсутність субодиничної структури молекули ензиму. Препарат  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum* IMB F-100074 (2 мг білка/мл) наносили на колонку із Sepharose 6B (рис. 4). Колонка попередньо була калібрована за білками-маркерами певної молекулярної маси.  $\alpha$ -L-Рамнозидаза *P. tardum* виходила з колонки одним піком з молекулярною масою 67 кДа.

Відомо [1, 18], що молекулярна маса більшості досліджених  $\alpha$ -L-рамнозидаз становить від 40 до 240 кДа, у той же час зустрічаються

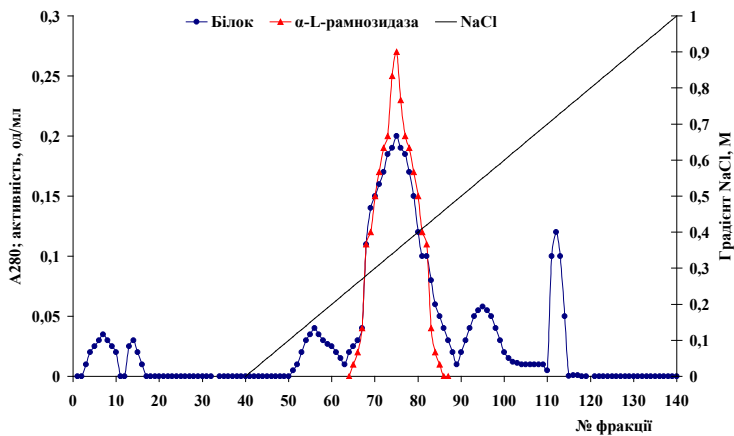


Рис. 3. Профіль елюції на Fractogel DEAE-650-s (у градiєнті NaCl (0-1 М)) фракції, одержаної після гель-фільтрації на TSK-HW-60 ферментного препарату *P. tardum* IMB F-100074

Таблиця 1  
Основні етапи очистки ферментного препарату *P. tardum* IMB F-100074

Стадії очистки	Загальний вміст білка, мг	Загальна активність, од/мл	Вихід, %	Питома активність, од/мг білка	Ступінь очистки
Супернатант культуральної рідини	250	300	100	1,2	0
Осадження 90 % сульфатом амонію	185	40	74	0,216	0,18
Гель-фільтрація на Toyopearl HW-60	12	108	4,8	9	7,5
Аніонообмінна хроматографія на Fractogel DEAE-650-s	7,8	216	3,12	27,7	23

олігомерні форми з молекулярною масою 500 кДа. На відміну від рослинних глікозидаз, які звичайно представлені двома формами (високо- та низькомолекулярними), для глікозидаз грибного і тваринного походження характерною є наявність лише однієї високомолекулярної форми, хоча у *Aspergillus aculeatus* вона мала два мономери з  $\alpha$ -L-рамнозидазною активністю (92 і 85 кДа відповідно) [13]. Бактеріальні та дріжджові ензими нерідко складаються з двох, трьох, чотирьох мономерних одиниць і мають відповідно більшу молекулярну масу [1, 2, 14, 15].

Важливою характеристикою будь-яких ферментних препаратів є їх оптимальні умови дії, які в першу чергу визначаються залежністю активності і стабільності ензимів від рН і температури. Було показано, що очищений ензимний препарат *P. tardum* IMB F-100074 активний в інтервалі значень рН від 3,0 до 6,0 (рис. 5), але оптимум його дії знаходиться при рН 5,0.

$\alpha$ -L-Рамнозидази раніше вивчених нами штамів *C. albidus* та *E. erubescens* [3, 4] були активні в інтервалі значень рН від 3,0 до 9,0. У той же час рН-оптимум для обох ферментів також знаходився в інтервалі рН 4,0–5,0.

Аналогічні дані одержані і іншими дослідниками [1, 2], які показали, що  $\alpha$ -L-рамнозидази як грибних, так і бактеріальних продуцентів характеризуються різними значеннями рН оптимуму дії. Але на відміну від бактеріальних ензимів, які діють в області, близькій до нейтральної або лужної, грибні  $\alpha$ -L-рамнозидази діють у кислій області.

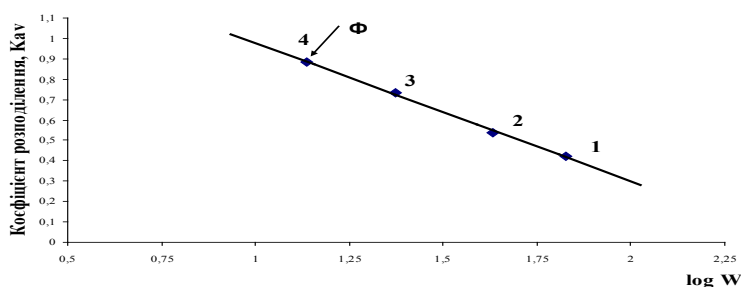


Рис. 4. Молекулярна маса  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum* IMB F-100074 в нативних умовах

Маркери молекулярних мас: рибонуклеаза (13,7 кДа) (1), протеїназа К (25 кДа) (2), овальбумін курячого яйця (43 кДа) (3), бичачий сироватковий альбумін (67 кДа) (4), Ф – ферментний препарат *P. tardum*.

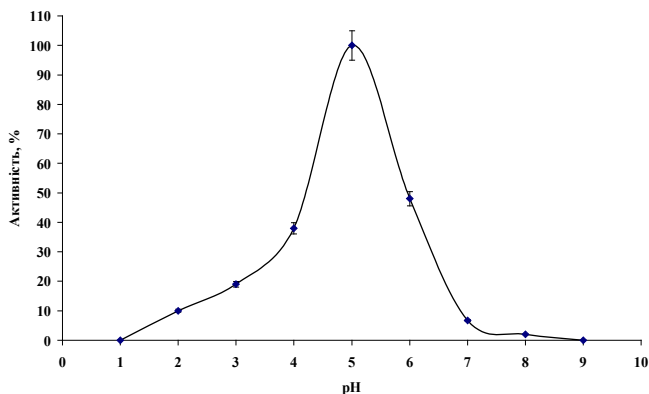


Рис. 5. рН-оптимум препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum* IMB F-100074

Дослідження температурного оптимуму  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum* IMB F-100074 показало, що, як і у раніше досліджених  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* [3, 4], він становить 60 °C (рис. 6), хоча в діапазоні температурних значень від 4 до 70 °C ензими також проявляли активність. Встановлено [1, 2, 14], що температурний оптимум дії більшості  $\alpha$ -L-рамнозидаз становить 40-80 °C, винятком є бактеріальна  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Pseudoalteromonas* sp., яка проявляла активність при 4 °C [14]. Температурний оптимум для очищеної  $\alpha$ -L-рамнозидази *Aspergillus kawachii* становив 60 °C, у таких умовах фермент зберігав 80 % від максимальної активності протягом 1 години [15].

$\alpha$ -L-Рамнозидаза *P. tardum* IMB F-100074 характеризується досить високою стабільністю в дослідженому діапазоні як рН, так і температур. Так, за значень рН 4,0–6,0 при 37 °C протягом 90 хв. інкубації зберігається до 90–100 % від вихідної активності ферменту (рис. 7).

Препарат  $\alpha$ -L-рамнозидази стабільний також у діапазоні температур від 15 до 60 °C (рис. 8). При підвищенні температури до 70 °C протягом перших 10 хв. активність знижується на 70 %, а після години інкубації в цих умовах залишається лише 5 % від вихідної активності. Крім того,  $\alpha$ -L-рамнозидаза *P. tardum* стабільна протягом 4 діб при 20 °C. Таким чином, з супернатанту культуральної рідини *P. tardum* IMB F-100074 було отримано очищений ферментний препарат з питомою активністю 27,7 од/мг білка, молекулярною масою 67 кДа, температурний і рН-оптимум якого становить 60 °C та рН 5,0 відповідно. Показано високу рН- і термостабільність очищеного препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum*, яка може бути обумовлена наявністю вуглеводного компоненту, який становив 12 %. Отримані дані щодо досить високої стабільності ферменту при температурах від 15 до 60 °C, а також за нейтральних і слабо кислих значень рН є вагомими щодо подальших перспектив застосування препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum* у харчовій промисловості.

Автори висловлюють подяку зав. відділу фізіології і систематики мікроміцетів д.б.н. І.М. Курченко та пров. інженеру Л.Т. Наконечній за люб'язно наданий штам-продуцент *P. tardum* IMB F-100074.

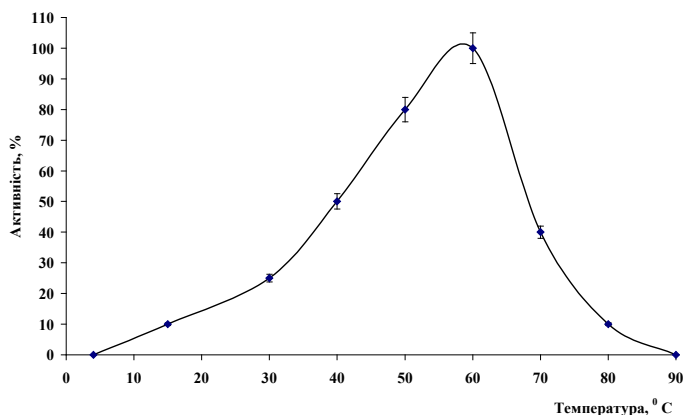


Рис. 6. Термооптимум препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum* IMB F-100074

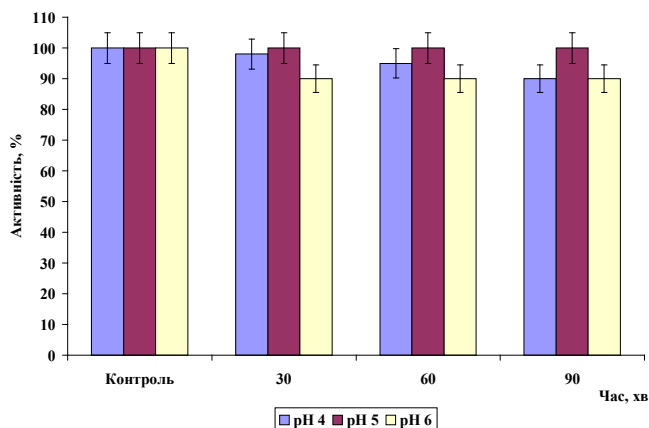


Рис. 7. рН- стабільність препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum* IMB F-100074

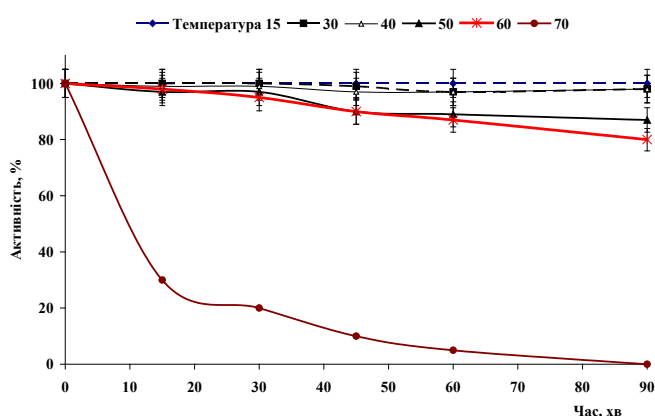


Рис. 8. Термостабільність препарату  $\alpha$ -L-рамнозидази *P. tardum* IMB F-100074

**Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

## ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗЫ *PENICILLIUM TARDUM*

### Резюме

Фракционированием сульфатом аммония, хроматографией на TSK-гелях Toyopearl HW-60 и Fractogel DEAE-650-s из супернатанта культуральной жидкости *Penicillium tardum* IMB F-100074 выделен и очищен в 23 раза фермент с  $\alpha$ -L-рамнозидазной активностью, выход которого составлял 3,12 %. Удельная активность фермента составляла 27,7 ед/мг белка, молекулярная масса 67 кДа, температурный и рН-оптимум – 60 °С и рН 5,0 соответственно. Показана высокая рН- и термостабильность очищенного препарата  $\alpha$ -L-рамнозидазы *P. tardum*, которая может быть обусловлена наличием углеводного компонента, который составлял 12 %.

**Ключевые слова:** *Penicillium tardum*,  $\alpha$ -L-рамнозидазная активность, очистка, рН- и термооптимум, рН- и термостабильность.



**PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF *PENICILLIUM  
TARDUM*  $\alpha$ -L- RHAMNOSIDASE**

**S u m m a r y**

By ammonium sulfate fractionation and chromatography on TSK-gels Toyopearl HW-60 and Fractogel TSK DEAE-650-s from supernatant of cultural liquid of *Penicillium tardum* IMB F-100074 was isolated and purified in 23 times preparation of enzyme with  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity with yield of 3.12 %. The specific activity was 27.7 U/mg of protein, molecular mass 67 kDa, thermo- and pH optimum – 60 °C and pH 5.0 respectively. It was shown high pH- and thermostability of purified *P. tardum*  $\alpha$ -L-rhamnosidase which may be due to presence of 12 % of carbohydrate component.

**К е у w o r d s:** *Penicillium tardum*,  $\alpha$ -L-rhamnosidases activity, purification, pH-and thermooptimum, pH- and thermostability.

1. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010. – 437 с.
2. Гудзенко О.В., Варбанець Л.Д. Мікробні  $\alpha$ -L-рамнозидази: продуценти, властивості, практичне використання // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 6. – С. 9–26.
3. Гудзенко Е.В., Варбанець Л.Д. Очистка и физико-химические свойства  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Eurpenicillium erubescens* // Мікробіол. журнал. – 2012. – 74, № 2. – С. 14–21.
4. Гудзенко Е.В., Варбанець Л.Д. Очистка и физико-химические свойства  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Cryptococcus albidus* // Мікробіол. журн. – 2012. – 74, № 6. – С. 16–23.
5. Гудзенко О.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація умов культивування *Penicillium tardum* – продуцента  $\alpha$ -L-рамнозидази // Мікробіол. журн. – 2015. – 77, № 4. – С.
6. Лакін Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990. – 325 с.
7. Рзаєва О.М.  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Penicillium commune* 266: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : 03.00.07. / Рзаєва Ольга Миколаївна; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. – К.: [б. в.], 2007. – 21 с.
8. Andrews P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration // Biochemical Journal. – 1964. – 91, № 2. – P. 222–233.
9. Davis D. W. Determination of flavonones in citrus juice // Anal. Biochemistry. – 1947. – 19, N 1. – P. 46–48.
10. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal.Chem. – 1956. – 28, N 3. – P. 350–356.
11. Gerstorfenova D., Fliedrova B., Halada P. et al. Recombinant  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin // Process Biochemistry. – 2012. – 47, N 5. – P. 828–835.
12. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265–275.
13. Manzanares P., Orejas M., Gil J.V. et al. Construction of a Genetically Modified Wine Yeasts Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus rhaA* Gene, Encoding and

- $\alpha$ -L-Rhamnosidase of Enological Interest // Appl. Envir. Microbiol. – 2003. – **69**, N 12. – P. 7558 – 7562.
14. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M.  $\alpha$ -L-rhamnosidase: old and new insights // Industrial Enzymes, Springer. – 2007. – P. 117–140.
  15. Puri M. Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects // Appl. Microb. and Biotechnol. – 2012. – **93**, N 1. – P. 49–60.
  16. Romero C., Manjon A., Bastida J. A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase // Analytical Biochemistry. – 1985. – **149**, N 2. - P. 566–571.
  17. Tamayo-Ramos J., Flipphi M., Pardo E. et al. 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 // Microbial. Cell. Factories. – 2012. – **11**. - P. 11–26.
  18. Yadav V., Yadav P.K., Yadav S., Yadav K.D.S.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: A review // Process Biochemistry. – 2010. – **45**, N 8. – P. 1226–1235.
  19. 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. Biochemistry and Microbiol. - 2010. – 48, N 3. – P. 295–301.
  20. Yadav S., Yadav R.S.S., Yadav K.D.S.  $\alpha$ -L-Rhamnosidae from *Aspergillus awamori* MTCC-2879 and its role in debittering of orange juice // Int. J. Food Science & Technol. – 2013. – 48, N 5. – P. 927–923.

Отримано 07.09.2015