

β-МАННАНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ В АНТАРКТИКЕ

Борзова Н.В., Гладка Г.В., Варбанец Л.Д., Таширев А.Б.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного 154, Киев, 03143, Украина
e-mail: nv_borzova@bigmir.net

Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы Антарктики известны как продуценты энзимов с уникальными свойствами, в частности, устойчивостью к экстремальным условиям среды. **Цель работы** – установить видовую принадлежность трех антарктических дрожжевых культур и изучить их гликозидазную активность. **Методы.** Для изучения энзиматической активности дрожжей были использованы синтетические и природные субстраты: *p*-нитрофенил-гликозиды, галактоманнан гуара, МК-целлюлоза, растворимый крахмал. Выделение геномной ДНК проводили из клеточных суспензий. Фрагмент гена 26S рРНК у штаммов U5 и U8 был ПЦР-амплифицированный с использованием праймеров NL1 и NL4, у штамма S181 фрагмент гена 18S рРНК ПЦР-амплифицированный с использованием праймеров NS3 и NS6. Полученные последовательности генов дрожжевых изолятов сравнивали с таковыми микроорганизмов, депонированных в базе данных GenBank, используя программный пакет BLASTN. Филогенетический анализ проводили с помощью программ ClustalX 2.1, Mega 6.06 (Neighbour-Joining). **Результаты.** В супернатанте культуральной жидкости всех культур были выявлены экзо- α -рамнозидазная и эндо- β -маннаназная активности. Показано, что максимумы β -маннаназной активности и продуктивности двух психротолерантных штаммов приходились на третьи сутки, а у одного — на вторые сутки культивирования и коррелировали с синтезом протеина. Выращивание культур при 15°C обеспечивало более высокие показатели внеклеточной β -маннаназной активности. Оптимальными источниками азота были хлорид и сульфат аммония, а углерода – галактоманнан гуара и рамноза. В результате филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей генов 26S рРНК или 18S рРНК было установлено, что изученные штаммы относятся к видам *Cryptococcus victoriae* и *Cryptococcus terricola*. **Выводы.** Впервые показаны высокая β -маннаназная активность антарктических штаммов *C. victoriae* и *C. terricola* и перспектива использования их в качестве продуцентов маннан-деградующих энзимов.

Ключевые слова: психротолерантные дрожжи, *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus terricola*, β -маннаназа.

Антарктический регион, как показано в последние годы, является источником экстремофильных микроорганизмов с уникальными свойствами [1]. Исследования живых организмов этой экосистемы пополняют наши знания как о функционировании макро- и микроорганизмов в условиях низких температур в целом, так и о свойствах их энзиматических систем в частности. Энзимы, которые синтезируются экстремофильными продуцентами, демонстрируют повышенную активность и стабильность при высоких (или низких) температурах, повышенной щелочности, кислотности

сти, давлении, концентрации солей, а также устойчивость одновременно к нескольким критическим факторам [1, 2].

Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы широко распространены в природе, поскольку более 80 % биосферы и гидросферы Земли занимают области с температурой окружающей среды $< 5^{\circ}\text{C}$. Поэтому изучение продуцируемых ими энзимов представляет значительный как теоретический, поскольку их структурно-функциональные исследования позволяют получать информацию о механизмах приспособления микроорганизмов к функционированию при низких температурах, так и практический интерес. В частности, протеазы, липазы, амилазы, другие полимер-деградирующие энзимы, активно осуществляющие гидролиз при низких температурах, чрезвычайно привлекательны для использования в бумажной и пищевой промышленности, а также в производстве детергентов, поскольку позволяют значительно сократить расходы энергии в технологических процессах. Использование психрофильных гидролаз в пищевой промышленности позволяет значительно снизить вязкость сырья при низких температурах и повысить качество продукции [3]. Об этом свидетельствуют и успехи последних лет в области изучения и внедрения энзимов психрофилов.

Характерной чертой таких энзимов является сочетание высокой активности при низких температурах с низкой термостабильностью, что связано с более высокой подвижностью молекулы по сравнению с протеинами мезо- и термофильных микроорганизмов, однако описаны и исключения из этого правила [4, 5].

Одним из промышленно важных энзимов является β -маннаназа (1,4- β -D-маннан манногидролаза, КФ 3.2.1.78), катализирующая гидролиз β -маннозидной связи в основной цепи гемицеллюлозы, а также глюко- и галактоманнанах с образованием манноолигосахаридов, маннозы, глюкозы и галактозы. Растущий интерес к этому энзиму связан с его огромным потенциалом в области биоконверсии агропромышленных остатков, а также в пищевой, кормовой и деревообрабатывающей отраслях, газо- и нефтедобыче, производстве детергентов и биотоплива [6, 7]. На сегодняшний день имеется ряд работ, посвященных изучению дрожжевых продуцентов энзимов маннан-деградирующего комплекса, демонстрирующих широкие возможности использования этой группы микроорганизмов для получения промышленно важных энзимов [5, 8, 9].

Наши исследования посвящены выделению и идентификации психротолерантных штаммов дрожжей антарктического региона и сравнительному изучению их β -маннаназной активности в зависимости от некоторых параметров культивирования.

Материалы и методы. В работе были использованы 3 дрожжевых штамма из коллекции живых культур отдела биологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Культуры были выделены из образцов, отобранных на биогеографическом полигоне о. Галиндез (Аргентинский архипелаг, Антарктика) во время сезонных экспедиций 2008 и 2010 гг., хранятся при $+5^{\circ}\text{C}$.

Образцы почвы, травы, мхов и лишайников из Антарктики были помещены в стерильные контейнеры и транспортированы при +5°C в лабораторию. Подготовку образцов для посева проводили стандартными методами. Десятикратные разведения образцов рассеивали на агаризованное солодовое сусло (СА) и инкубировали при 5 °C и 30 °C (5-15 суток). Для выделения чистых культур использовали доминирующие в образцах микроорганизмы. Для этого с чашек, где общее количество колоний не превышало 50-ти, отбирали единичные колонии. Для получения чистых культур их трижды реизолировали и микроскопировали. Для выращивания дрожжей использовали агаризованное солодовое сусло (СА) или жидкое солодовое сусло (рН 5,0-5,5).

Для идентификации дрожжевых культур выделение геномной ДНК проводили из клеточных суспензий. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью коммерческого набора ДНК-сорб В (АмплиСенс, Россия) по прилагаемым к наборам инструкциям производителя с небольшими модификациями [10].

Для филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей генов 18S рРНК или 26S рРНК у дрожжей предварительно проведены следующие этапы: 1. Фрагмент гена 26S рРНК у штаммов U5, U8 был ПЦР-амплифицированный с использованием олигонуклеотидных праймеров NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') [11], как описано в работе [12]. Очистка и секвенирование ПЦР-продуктов 26S рРНК дрожжей были выполнены Masrogen Inc. (Южная Корея). 2. Фрагмент гена 18S рРНК в штамме S181 был ПЦР-амплифицированный с использованием олигонуклеотидных праймеров NS3 (5'-3': GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC) и NS6 (5'-3': GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC). Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск).

Полученные последовательности генов 18S рРНК или 26S рРНК дрожжевых изолятов сравнивали с таковыми микроорганизмов, депонированных в базе данных GenBank, используя пакет программы BLAST. Филогенетическое положение определяли построением дендрограмм, показывающих положение изучаемого штамма среди близкородственных и типовых видов (пакеты программ ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) с использованием метода ближайших соседей.

Для изучения спектра гликозидазных активностей культуры дрожжей выращивали на среде следующего состава (г/л): $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,25; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,5; дрожжевой автолизат – 0,15; мальтоза – 1,0; соевая мука – 20,0; в пробирках на качалках при температуре 15°C в течение 48 часов.

Культивирование дрожжей для изучения β-маннаназной активности проводили на жидкой среде сусло с добавлением 1% гуаровой камеди в глубинных условиях в пробирках, содержащих 10 мл питательной среды, при 15 и 30°C и скорости вращения качалки 244 об/мин на протяжении 4-5 суток.

Для исследования влияния различных источников углерода на β-маннаназную активность дрожжей использовали среду следующего состава (в г/л): KH_2PO_4 – 1,6; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,75; KCl – 0,3; мочевины – 1,0;

дрожжевой автолизат – 0,3. В качестве источников углерода использовали галактоманнан гуара, соевую муку, сахарозу, рамнозу, галактозу, мальтозу в концентрации 10,0 г/л.

Для исследования влияния различных источников азота на β -маннаназную активность дрожжей использовали среду следующего состава (в г/л): KH_2PO_4 – 3,0; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,75; Na_2HPO_4 – 6,0 г/л; галактоманнан гуара – 0,5 %. В качестве источников азота использовали мочевины, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в концентрации 1,0 г/л, а также пептон – 5,0 г/л.

Культивирование дрожжей для исследования влияния различных источников углерода и азота проводили в глубинных условиях в колбах Эрленмейера (750 мл) на качалке (скорость вращения 241 об/мин, уровень аэрации 16,76 мг O_2 /л \times ч) при 15 °С в течение 5 суток. Засев питательной среды проводили 5 % двухсуточным инокулюмом. Определение активности проводили в супернатанте культуральной жидкости, полученном после осаждения клеток центрифугированием (5000 g, 20 мин).

Определение маннаназной активности проводили динитросалициловым методом, в качестве субстрата использовали галактоманнан камеди гуара (β -маннаназная активность) и галактоманнан дрожжей (α -маннаназная активность) [13]. Реакционную смесь, содержащую 0,5 мл культуральной жидкости (КЖ) и 0,5 мл 1 % галактоманнана в 0,1 М фосфатно-цитратном буфере pH 5,2, инкубировали 20 мин при 45°С, затем добавляли 1 мл динитросалицилового реактива (ДСР) и кипятили 10 мин. Интенсивность окраски оценивали спектрофотометрически при 540 нм. В качестве стандарта использовали маннозу.

Исследование целлюлазной и амилазной активности проводили аналогичным образом, используя в качестве субстрата МК-целлюлозу (1 %) и растворимый крахмал (1 %) соответственно.

Исследование гликозидазных активностей дрожжевых культур также проводили при помощи синтетических нитрофенильных субстратов: *n*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозид, *n*-нитрофенил- α - и β -D-глюкопиранозид; *n*-нитрофенил- α - и β -D-галактопиранозид; *n*-нитрофенил-N-ацетил- α - и β -D-глюкозаминид; *n*-нитрофенил-N-ацетил- β -D-галактозаминид; *n*-нитрофенил- β -D-глюкуроид; *n*-нитрофенил- α - и β -D-ксилопиранозид; *n*-нитрофенил- α -D-маннопиранозид; *n*-нитрофенил- α -D-фукопиранозид (“Sigma-Aldrich”, США) [14].

За единицу активности энзимов принимали такое их количество, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин в условиях опыта.

Концентрацию протеина в супернатанте культуральной жидкости определяли методом Лоури [15].

Все эксперименты проводили не менее чем в 3–5 повторностях. Статистическую обработку результатов экспериментальных серий осуществляли стандартными методами с использованием *t*-критерия Стьюдента при 5 % уровне значимости.

Результаты. Из психротолерантных и мезофильных накопительных культур, полученных из наземных экосистем Антарктики, были изолированы штаммы дрожжей: U5, U8 и S181, из которых первые два выделены при температуре 5 °С, а последний – при 30 °С (табл. 1).

Таблица 1

Летальные дозы УФ облучения и способность роста при различных концентрациях NaCl и температурах дрожжей, выделенных из наземных экосистем Антарктики

№ штамма	Источник выделения	t °С при изоляции	УФ, ЛД _{99,99} Дж/м ²	Рост в диапазоне	
				NaCl, %	t, °С
U5	Лишайник с илом, отобранный на дне высохшего пресного озера, окружённого скалами	5	550	0-15	5-30
U8	Трава <i>Deschampsia antarctica</i> , растущая на почве (с ракушками) между камней		500		
S181	Биопленка обрастания скалы (клифа)	30	750	0-15	5-30

Известно, что микроорганизмы, выделяемые из экстремальных экосистем, обладают физиологическими свойствами, которые способствуют их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды. К таким свойствам относятся психро- и галотолерантность, устойчивость к УФ-излучению, а также способность продуцировать спектр энзиматических активностей [2]. Ранее [16] было установлено, что исследуемые штаммы относятся к психротолерантным микроорганизмам. Как нами показано (табл. 1), они также галотолерантны и устойчивы к действию ультрафиолета.

Изучение широкого спектра (17) гликозидазных активностей (α -L-рамнозидазной, α - и β -D-глюкозидазной; α - и β -D-галактозидазной; α - и β -N-ацетил-D-глюкозаминидазной; N-ацетил- β -D-галактозаминидазной; β -D-глюкуронидазной; α - и β -D-ксилозидазной; α -D-маннозидазной; α -D-фукозидазной, целлюлазной, амилазной, α - и β -маннаназной) показало, что исследуемые штаммы проявляли незначительную α -L-рамнозидазную и достаточно высокую β -маннаназную активность при глубинном культивировании в жидком сусле как при 15 °С, так и при 30 °С (рис. 1). При культивировании на синтетической среде отмечалась только β -маннаназная активность. Внеклеточная β -маннаназная активность штамма U5 не зависела от температуры выращивания культуры, а для двух других штаммов показана повышенная β -маннаназная активность при более низкой температуре. Другие гликозидазные активности в условиях опыта не были обнаружены.

Активность энзимов зависит также от других параметров: времени культивирования, источников углерода и азота. Так, показано (рис. 2), что длительность периода культивирования для проявления β -маннаназной активности зависела от температуры культивирования: при более высокой температуре (30 °С) максимум активности для всех трех штаммов приходился на 2-ые сутки выращивания, тогда как на третьи сутки активность штаммов при 30 °С составляла всего лишь 24 и 12 % от максимальной соответственно, а на четвертые – падала более чем на 94 %. Активность штамма S181 при 15 и 30 °С достигала максимума на 48 ч культивирования, однако, также как U5 и U8, проявляла тенденцию к быстрому снижению при выращивании штамма при 30 °С.

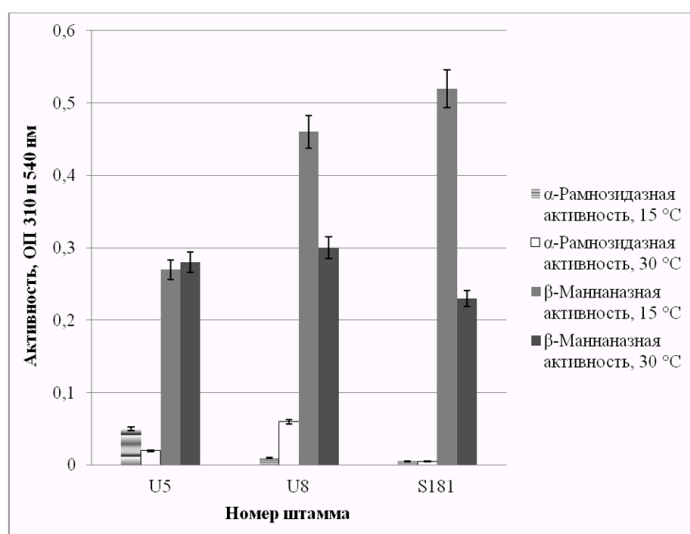


Рис. 1. α-L-Рамнозидазная и β-маннаназная активность исследуемых штаммов дрожжей при различных температурах культивирования

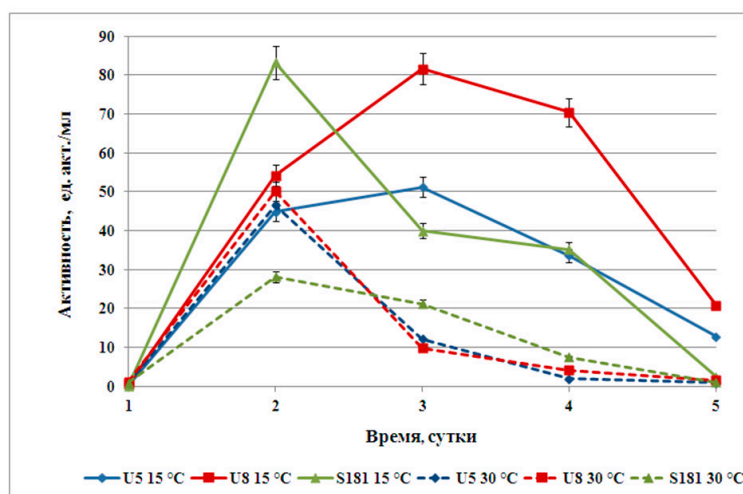


Рис. 2. Зависимость внеклеточной β-маннаназной активности дрожжей от времени и температуры культивирования

Поскольку температура 15 °C обеспечивала более высокие показатели маннаназной активности, далее все эксперименты проводили в этом температурном режиме. Было показано (рис. 3а, б, в), что пик β-маннаназной активности и продуктивности при 15 °C у культуры S181 наблюдается через 48 часов культивирования, а для штаммов U8 и U5 – через 72 часа. При более длительных периодах инкубации наблюдалось снижение активности и продуктивности, достигая минимума после 96-120 ч культивирования. Максимум β-маннаназной активности штаммов U8 и U5 приходился на стационарную, а S181 – фазу замедления роста. Концентрация растворимого протеина в культуральной жидкости прямо коррелировала

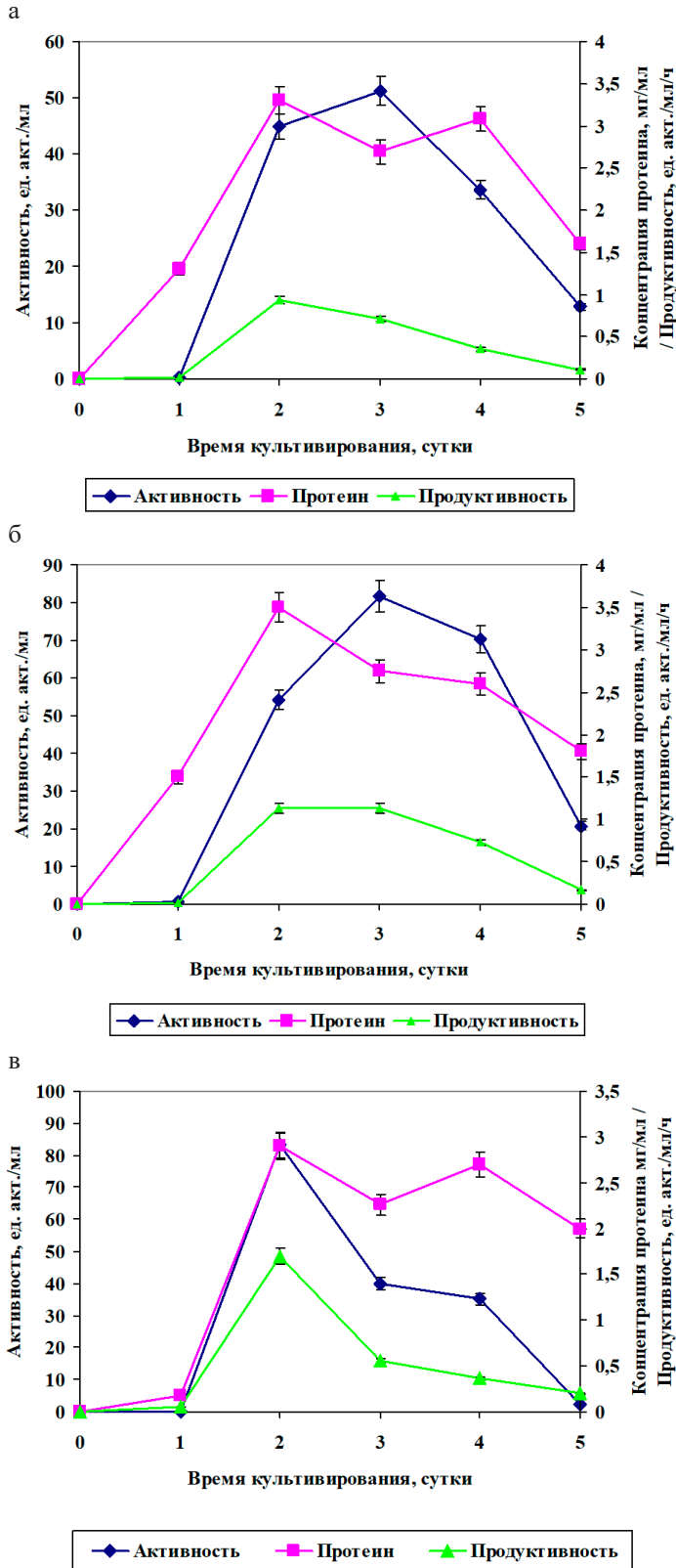


Рис. 3. β -Манназная активность, концентрация белка и продуктивность в процессе культивирования: а — штамма U5, б — штамма U8, в — штамма S181; (t 15 °C)

с уровнем активности. Снижение активности, по-видимому, наступало в связи с истощением питательных веществ и накоплением продуктов реакции, а также протеолитических энзимов, которые инициируют автолиз клеток [17, 18]. Значение pH, первоначально составлявшее 5,5, в процессе роста культуры медленно возрастало до 6,0. Для грибных маннааз, описанных в литературе, показано, что оптимальным является культивирование в течение 3–6 суток, а в некоторых случаях – до 11 [7, 8, 19, 20], а для бактериальных – от 24 ч для *Acinetobacter sp.* [21] и *Bacillus megaterium* [22], до 96 ч для *Bacillus sp* [18]. Дрожжевые психрофильные культуры выращивали в течение 48 – 96 ч, что обеспечивало максимальный выход энзимов в культуральную жидкость [23]. В целом период инкубации связан с физиологическими особенностями культуры и использованными источниками углеродного и азотного питания.

Показано (рис. 4а, б, в), что галактоманнан и рамноза во всех случаях обеспечивали β -маннаназную активность исследованных штаммов дрожжей в условиях опыта. Одновременное добавление в среду роста 0,5 % галактоманнана гуара и 1 % рамнозы способствовало проявлению максимальной активности всех трех культур. Также наблюдалось повышение внеклеточной активности (на 20-25 %) при внесении рамнозы (через 48 ч культивирования) в среду, содержащую галактоманнан. Отмеченное неспецифическое увеличение β -маннаназной активности при внесении рамнозы, возможно, обусловлено синергизмом действия β -маннаназ и α -рамнозидаз. Наименьшая активность наблюдалась в случае использования соевой муки, галактозы, мальтозы и сахарозы.

Выбор источника азотного питания также оказывал существенное влияние на проявление активности культур. Показано (рис. 5), что максимальная β -маннаназная активность штаммов U5 и U8 наблюдалась при использовании в качестве единственного источника азота хлорида аммония, а для культуры S181 – сульфата аммония. Другие исследователи указывали в качестве оптимального источника азотного питания для продукции β -маннаназ мочевины [22], нитрат натрия и сульфат аммония [25], дрожжевой экстракт и казитон [3], дрожжевой автолизат [20]. Выбор источника азота в целом продиктован сочетанием физиологических потребностей культуры и способностью обеспечить биосинтез требуемого метаболита и зависит от свойств штамма, а не вида микроорганизма.

В связи с тем, что изучаемые штаммы дрожжей являются перспективными для практического использования, необходимо было установить их видовую принадлежность. Чтобы выявить родственные для исследуемых изолятов виды, нуклеотидные последовательности их генов 18S рРНК или 26S рРНК сравнивали с таковыми микроорганизмов, депонированных в базе данных GenBank. На основании полученных данных были выявлены близкородственные виды для изучаемых дрожжей (таб. 2). Результаты показали, что штаммы дрожжей, доминирующие в фитоценозах острова Галиндез, имеют высокое родство (99,6% – 99,9%) с соответствующими видами.

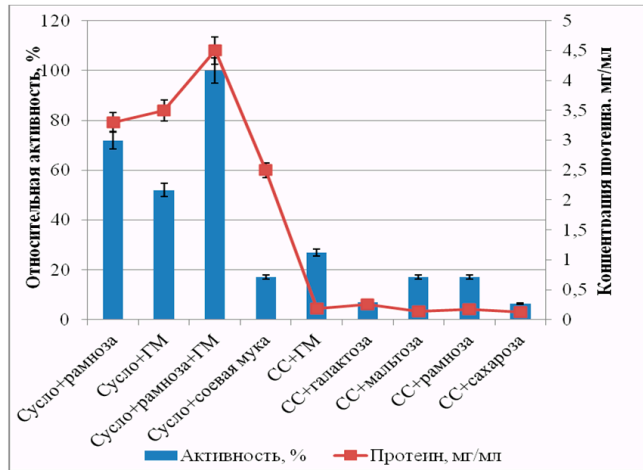
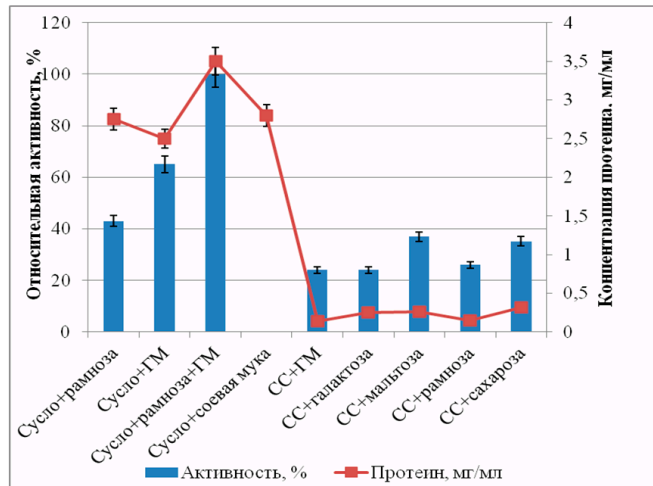
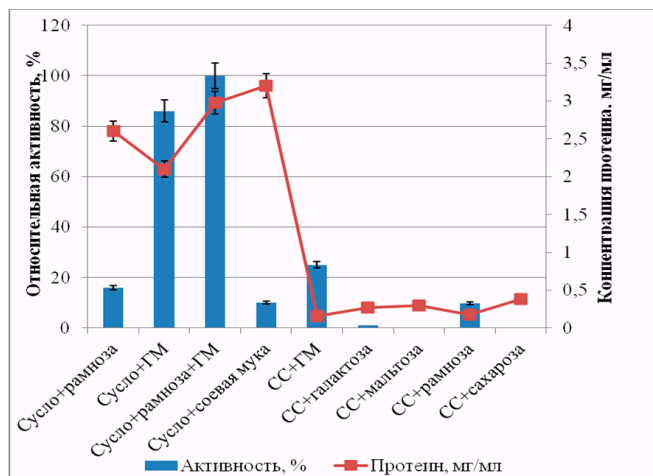
а**б****в**

Рис. 4. Зависимость β -маннаназной активности дрожжей (а - штамм U5, б - штамм U8, в - штамм S181) от состава среды и источника углерода

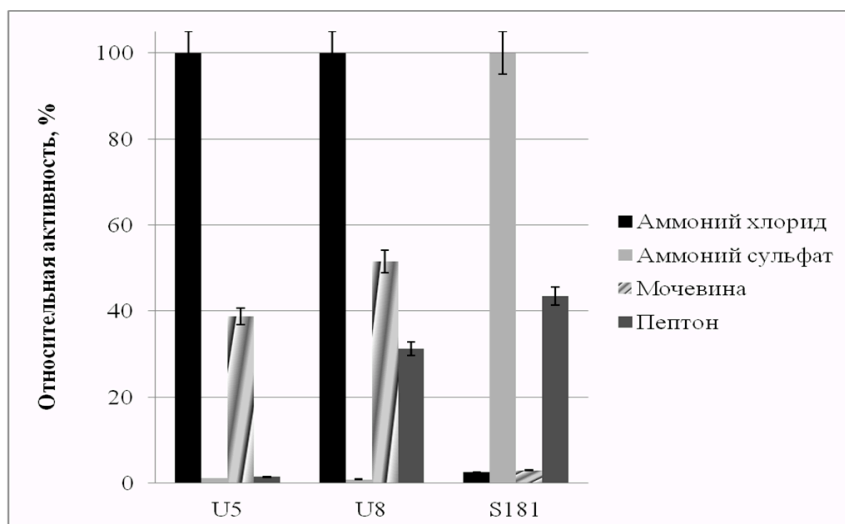


Рис. 5. Зависимость β -маннаназной активности дрожжей от источника азота (t 15 °С, источник углерода – галактоманнан гуара, 48 ч)

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности из базы данных, наиболее родственные последовательностям, полученным из ДНК чистых культур, выделенных из фитоценозов острова Галиндез

№ штамма	Длина, п.н.	Ближайший гомолог, № в NCBI	% сходства
U5	589	<i>Cryptococcus terricola</i> CCFEE 5627 (JX092254)	99,9
U8	589	<i>Cryptococcus victoriae</i> YM25140 (JQ964206)	99,8
S181	837	<i>Cryptococcus victoriae</i> CBS8685 (KF036661)	99,6

Для определения филогенетического статуса дрожжей были построены дендрограммы (рис. 6, 7), показывающие положение исследуемых штаммов среди близкородственных и типовых видов.

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей генов 18S рРНК или 26S рРНК штаммов дрожжей показал, что они являются представителями филума *Basidiomycota* (род *Cryptococcus*). Анализируемые нами последовательности штаммов U8 и S181 достоверно кластеризуются с последовательностями типовых штаммов, а также с другими штаммами *Cryptococcus victoriae* и могут быть отнесены к этому виду. На филогенетическом дереве (рис.6) штамм U5 кластеризуется с *Cryptococcus terricola*, что позволяет причислить данный штамм к этому виду. Полученные результаты подтверждают литературные данные [17], согласно которым представители дрожжей родов *Cryptococcus*, *Leucosporidiella* и *Dioszegia* являются наиболее многочисленными в различных антарктических биотопах, в том числе и в ризосфере *D. antarctica*. Полученные последовательности зарегистрированы в международной EMBL базе данных и им присвоены следующие номера: KF181971, KF181974, LT220855.

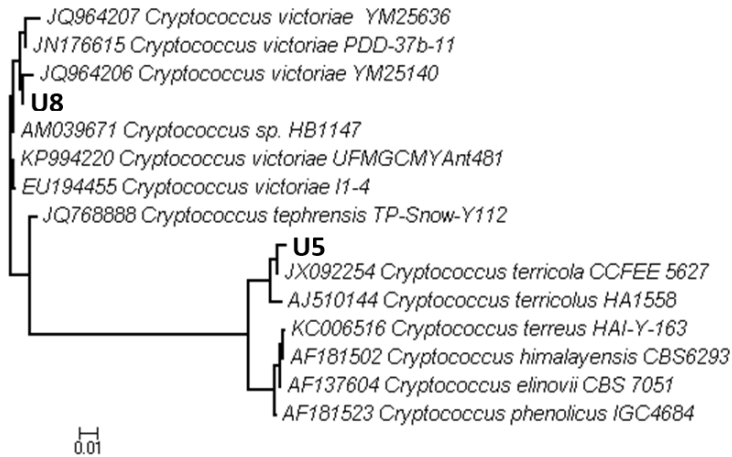


Рис. 6. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе анализа последовательностей фрагментов гена 26S рНК дрожжей, которая показывает положение штаммов U5, U8 среди близкородственных представителей *Basidiomycota*. Масштаб соответствует 1 замене на 100 пар нуклеотидов

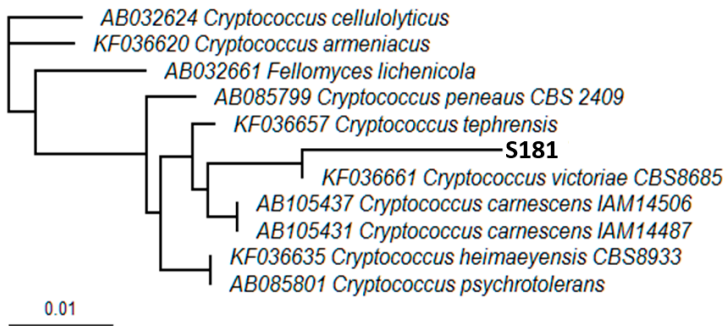


Рис. 7. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе анализа последовательностей фрагментов гена 18S рНК дрожжей, которая показывает положение штамма S181 среди близкородственных представителей *Basidiomycota*. Масштаб соответствует 1 замене на 100 пар нуклеотидов

Обсуждение. Используемые в работе микроорганизмы были выделены в оазисе, расположенном вблизи Украинской антарктической станции «Академик Вернадский» на о. Галиндез. Особенностью оазиса является высокое биоразнообразие наземных биотопов: ледовые и на скальные водорослево-бактериальные маты, орнитогенная почва, озера, лишайники, мхи, высшие растения (*Deschampsia antarctica*, *Colobanthus quitensis*), беспозвоночные животные, а также орнитофауна [16]. Несмотря на лимитирующее воздействие температуры и УФ-излучения, все эти субстраты активно колонизируются бактериями и грибами. И хотя бактерии являются доминирующими микроорганизмами антарктического региона, в последнее время появляется все больше данных о дрожжевых культурах, представленных практически во всех наземных антарктических биотопах. Способность микробной культуры колонизировать разнообразные, в том числе и бедные, природные субстраты во многом связана с ее способностью синтезировать гидролитические ферменты различной специфичности.

Нами выделены новые антарктические штаммы дрожжей с высокой β -маннаназной активностью, относящиеся к видам *C. victoriae* и *C. terricola*. Все три культуры относятся к психро- и галотолерантным микроорганизмам. Максимальная продукция внеклеточной β -маннаназы у двух штаммов (U8, S181) наблюдается при 15 °С и составляет 82 и 83 ед. акт./мл соответственно, а для штамма U5 практически не отличается при 15 и 30 °С (51 и 44 ед. акт./мл соответственно). Активный синтез энзимов, происходящий при низких температурах, является одним из механизмов адаптации организма к условиям окружающей среды. А наблюдаемое снижение активности при повышении температуры культивирования связано с увеличением скорости денатурации внеклеточного протеина. Аналогичные результаты наблюдаются у многих психрофилов, которые растут быстрее при более высоких температурах, но секретируемый энзим теряет активность во время культивирования.

В качестве источников углерода и(или) индукторов синтеза β -маннаназ могут использоваться как отдельные углеводы, так и растворимые и нерастворимые полимерные природные субстраты (галактоманнаны бобовых, пшеничные, рисовые и кукурузные отруби, кожура картофеля, маниоки, ананаса, семена акации, пальмовый, кокосовый и арахисовый жмых). Так, показано, что глюкоза и фруктоза обеспечивали активный синтез маннаназы у различных видов *Bacillus* [22], крахмал и галактоманнан гуара – у *Clostridium tertium*, *Aureobasidium pullulans*, *Flavobacterium sp.* [3, 20, 24], при твердофазном культивировании *Trichosporonoides oedocephalis* используется кожура ананаса и кассавы [25], для грибных культур – мякоть плодов масличной и кокосовой пальмы [19]. Также ранее [20] было показано, что из всех компонентов маннан-деградирующего комплекса микроорганизмов только синтез внеклеточной β -маннаназы и внутриклеточной β -маннозидазы может быть индуцирован полимерами маннозы. Такие полимеры, как галактоманнан в силу своих размеров не могут сами проникать через плазматическую мембрану, поэтому индукция маннан-деградирующих энзимов происходит за счет использования фрагментов галактоманнана. Последние образуются вследствие действия низких уровней конститутивных клеточных гидролаз. Установлено, что галактоманн гуара и рамноза индуцируют внеклеточную активность всех трех продуцентов. Индуцирующий эффект рамнозы требует дополнительного изучения, однако можно отметить проявление у изученных культур некоего синергизма действия между β -маннаназой и α -рамнозидазой.

Энзимы психротолерантных микроорганизмов, обладая ценными свойствами, особенно скоростью гидролиза при низких температурах, могут значительно повысить эффективность биотехнологических процессов в различных отраслях. Сравнительное изучение условий биосинтеза, параметров культивирования и свойств таких гликозидаз позволяет расширить область их применения и улучшить качество продукции, получаемой с их помощью.

Проявляемая активность изученных штаммов дрожжей свидетельствует о высоком потенциале для использования их в качестве продуцентов β -маннаназ, однако требует дополнительного изучения возможности модификации протеина, подбора индукторов биосинтеза энзимов и исследо-

вання путей експресії β -манназних генів для підвищення активності до рівня відомих суперпродукентів.

β -МАННАЗНА АКТИВНІСТЬ ДРІЖДЖІВ, ВИДІЛЕНИХ В АНТАРКТИЦІ

Борзова Н.В., Гладка Г.В., Варбанець Л.Д., Таширеєв О.Б.

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

Резюме

Психрофільні та психротолерантні мікроорганізми Антарктики відомі як продуценти ензимів з унікальними властивостями, а саме стійкістю щодо екстремальних умов середовища. **Метою роботи** було встановити видову приналежність трьох антарктичних дріжджових культур та дослідити їх глікозидазну активність. **Методи.** Для вивчення ензиматичної активності дріжджів були використані синтетичні і природні субстрати: *n*-нітрофеніл-глікозиди, галактоманан гуару, МК-целюлоза, розчинний крохмаль. Виділення геномної ДНК проводили із клітинних суспензій. Фрагмент гена 26S рРНК у штамів U5 і U8 був ПЛР-ампліфікований з використанням праймерів NL1 та NL4, у штама S181 фрагмент гена 18S рРНК ПЛР-ампліфікований з використанням праймерів NS3 і NS6. Отримані послідовності генів дріжджових ізолятів порівнювали з такими мікроорганізмів, що були депоновані в базі даних GenBank, використовуючи програмний пакет BLASTN. Філогенетичний аналіз проводили за допомогою програм ClustalX 2.1, Mega 6.06 (Neighbour-Joining). **Результати.** У супернатанті культуральної рідини всіх культур були виявлені екзо- α -рамнозидазна і ендो- β -манназна активності. Показано, що максимуми β -манназної активності і продуктивності двох психротолерантних штамів припадали на третю добу, а у одного – на другу добу культивування і корелювали з синтезом протеїну. Вирощування культур при 15°C забезпечувало більш високі показники позаклітинної β -манназної активності. Оптимальними джерелами азоту були хлорид і сульфат амонію, а вуглецю – галактоманан гуару і рамноза. В результаті філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей генів 26S рРНК або 18S рРНК було встановлено, що досліджені штами відносяться до видів *Cryptococcus victoriae* і *Cryptococcus terricola*. **Висновки.** Вперше показана висока β -манназна активність антарктичних штамів *C. victoriae* і *C. terricola* і перспектива використання їх як продуцентів манна-деградуєчих ензимів.

Ключові слова: психротолерантні дріжджі, *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus terricola*, β -манназа.

β-MANNANASE ACTIVITY OF YEASTS ISOLATED IN ANTARCTIC

Borzova N.V., Gladka G.V., Varbanets L.D., Tashyrev A.B.

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Psychrophilic and psychrotolerant microorganisms of the Antarctic are known as producers of enzymes with unique properties, in particular, resistance to extreme environmental conditions. **The aim of the work** was to establish the species affiliation of three antarctic yeast cultures and to study their glycosidase activity. **Methods.** To study the enzymatic activity of yeast, synthetic and natural substrates were used: *p*-nitrophenyl-glycosides, guar galactomannan, MC cellulose, soluble starch. Isolation of genomic DNA was derived from cell suspensions. Fragment of the 26S rRNA gene in strains U5 and U8 were PCR amplified using primers NL1 and NL4, in strain S181 fragment of the 18S rRNA gene PCR amplified using primers NS3 and NS6. The resulting sequences of genes of yeast isolates compared with those of microorganisms deposited in the database of GenBank, using the BLASTN software package. Phylogenetic analysis was performed with programs ClustalX 2.1, Mega 6.06 (Neighbor-Joining). **Results.** In the culture supernatant of strains *exo-α*-rhamnosidase and *endo-β*-mannanase activity were detected. It was shown that high of *β*-mannanase activity and productivity of two psychrotolerant strains occurred on the third day, and one on the second day of cultivation, and correlated with the synthesis of the protein. Growing cultures at 15° C provided higher rates of extracellular *β*-mannanase activity. The optimal sources of nitrogen were chloride and ammonium sulfate, and carbon – guar galactomannan and rhamnose. As a result of phylogenetic analysis of nucleotide sequences of 26S rRNA or 18S rRNA genes, it was established that the strains studied belong to the species *Cryptococcus victoriae* and *Cryptococcus terricola*. **Conclusions.** The high *β*-mannanase activity of antarctic strains of *C. victoriae* and *C. terricola* and the prospect of their use as producers of mannan-degrading enzymes are shown for the first time.

Keywords: psychrotolerant yeast, *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus terricola*, *β*-mannanase.

1. Morozkina EV, Slutskaia ES, Fedorova TV, Tugay TI, Golubeva LI, Koroleva OV. [Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review)]. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2010; 46(1): 5-20. Russian.
2. van den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. Curr Opin Microbiol. 2003; 6(3): 213-218.
3. Zakaria MM, Ashiuchi M, Yamamoto S, Yagi T. Optimization for *β*-mannanase production of a psychrophilic bacterium, *Flavobacterium sp.* Biosci Biotechnol Biochem. 1998; 62(4): 655-660.
4. Kumar L, Awasthi G, Singh B. Extremophiles: A novel source of industrially important enzymes. Biotechnol. 2011; 10: 121-135.
5. Parvizpour S, Razmara J, Ramli AN, Md Illias R, Shamsir MS. Structural and functional analysis of a novel psychrophilic *β*-mannanase from *Glaciozyma antarctica* PI12. J Comput Aided Mol Des. 2014; 28(6):685-698.

6. Srivastava PK, Kapoor M. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnol Adv.* 2017; 35(1):1–19.
7. Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N. Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(5):1817-1830.
8. Bhadra B, Rao RS, Singh PK, Sarkar PK, Shivaji S. Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. *Curr Microbiol.* 2008; 56(5):489–494.
9. Chi Z, Wang F, Chi Z, Yue L, Liu G, Zhang T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 82(5):793–804.
10. Lane DE. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stakebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* New York: Wiley; 1991. p. 115–47.
11. O'Donnell K. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW, editors. *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics.* Wallingford (UK): CAB International; 1993. P.225–33.
12. Gouliamova DE, Dimitrov RA, Stoilova-Disheva MM. DNA barcoding of yeasts from selected Bulgarian food products. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 2012; 26(1):32–34.
13. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem.* 1959; 31:426-428.
14. Chaplin ME, Kennedy JE. *Carbohydrate analysis.* Oxford: IRL Press, 1986. 228 p.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(2):265-275.
16. Vasileva-Tonkova E, Romanovskaya V, Gladka G, Gouliamova D, Tomova I, Stoilova-Disheva M et al. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica. *World J Microbiol .Biotechnol.* 2014; 30(4):1387-1398.
17. Vaz ABM, Rosa LH, Vieira MLA, Garcia V, Brandao LR, Teixeira LCR, et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Braz J Microbiol.* 2011; 42(5):937–947.
18. Meenakshi GS, Aditya B, Guriner SH. Solid state fermentation and characterization of partially purified thermostable mannanase from *Bacillus* sp. MG-33. *BioResources.* 2010; 5 (3):1689-1701.
19. Sae-Lee N. The production of fungal mannanase, cellulase and xylanase using palm kernel meal as a substrate. *Walailak J Sci Tech.* 2007; 4(1):67-82.
20. Kremnicky L, Biely P. β -Mannanolytic system of *Aureobasidium pullulans*. *Arch Microbiol.* 1997; 167(6):350–355.
21. Titapoka S, Keawsompong S, Haltrich D, Nitisinprasert S. Selection and characterization of mannanase producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008; 24(8):1425–1433.
22. Adebayo-Tayo B, Elelu T, Akinola G, Oyiloye I. Screening and innovative production of mannose by *Bacillus strains* isolated from fermented food condiments. *Romanian Food Biotechnol.* 2013; 13:53-62.

23. Gomes J, Gomes I, Steiner W. Thermolabile xylanase of the antarctic yeast *Cryptococcus adeliae* production and properties. *Extremophiles*. 2000; 4(4):227–235.
24. Kataoka N, Tokiwa Y. Isolation and characterization of an active mannanase producing anaerobic bacterium, *Clostridium tertium* KT-5A, from lotus soil. *J Appl Microbiol*. 1998; 84(3):357–367.
25. Olaniyi OO, Igbe FO, Ekunday TC. Optimization studies on mannanase production by *Trichosporonoides oedocephalis* in submerged state fermentation. *E3 J Biotechnol Pharm Res*. 2013; 4(7):110-116.

Отримано 24.05.2017