

## ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PENICILLIUM* SP. 27 НА АКТИВНОСТЬ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗЫ

*Е.В. Гудзенко, Н. В. Борзова, Л.Д. Варбанец*

*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина  
e-mail: ov\_gudzenko@bigmir.net*

**Цель.** Изучить влияние некоторых параметров культивирования на процесс биосинтеза внеклеточной  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27. **Методы.** Оптимизацию среды роста проводили на базовой среде Чапека следующего состава, г/л:  $\text{NaNO}_3$  – 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{KCl}$  – 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; рамноза – 4, рН 6,0. В качестве источника углерода использовали ксилозу, арабинозу, глюкозу, галактозу, рамнозу, маннозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маннит. Источником азота служили нитрат натрия, хлорид аммония, сульфат аммония, ацетат аммония, дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, пептон, мочевины, соевая мука.  $\alpha$ -L-Рамнозидазную активность определяли методом Romero, белок — методом Lowry. **Результаты.** Исследование влияния некоторых параметров культивирования на  $\alpha$ -L-рамнозидазную активность *Penicillium* sp. 27 показало, что для максимального биосинтеза оптимальными источниками углерода и азота были рамноза (8 г/л) и пептон (2 г/л), температура 25°C, исходное рН среды 5,0. Установлено, что максимальный уровень  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности достигается на седьмые сутки культивирования. **Выводы.** При выращивании штамма *Penicillium* sp. 27 в подобранных условиях  $\alpha$ -L-рамнозидазная активность в супернатанте культуральной жидкости была повышена в семь раз и составила 4,5 ед./мг белка.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -L-рамнозидаза, параметры культивирования, *Penicillium* sp. 27, источники углерода и азота.

В последние годы внимание исследователей привлекают гликозидазы, одним из представителей которых является  $\alpha$ -L-рамнозидаза ( $\alpha$ -L-рамнозид-рамногидролаза – К.Ф. 3.2.1.40), которая гидролитически отщепляет концевые невосстановленные  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,4 и  $\alpha$ -1,6-связанные остатки L-рамнозы в  $\alpha$ -L-рамнозидах. Изучение  $\alpha$ -L-рамнозидаз представляет интерес в связи с возможностью их широкого использования в пищевой, фармацевтической и химической промышленности. Так, при производстве соков из цитрусовых использование  $\alpha$ -L-рамнозидаз микроорганизмов приводит к эффективному устранению горечи из грейпфрутовых и апельсиновых соков [1]. В виноделии они используются для усиления аромата вин [2]. В фармацевтической промышленности  $\alpha$ -L-рамнозидазы используют для получения многих лекарственных препаратов, а также их предшественников. В химической промышленности использование данного энзима связано с удешевлением производства рамнозы.

Однако, несмотря на значительный промышленный интерес, в настоящее время только ряд неочищенных препаратов  $\alpha$ -L-рамнозидаз из *Aspergillus niger* и *Penicillium decumbens* (гесперидиназа и нарингиназа

соответственно) выпускаются “Sigma-Aldrich”, USA.

Ранее [3] в результате скрининга музея живых культур отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины был отобран перспективный штамм *Penicillium* sp. 27 – продуцент внеклеточной  $\alpha$ -L-рамнозидазы.

В данной статье приводятся результаты исследований трофических особенностей и условий культивирования *Penicillium* sp. 27 для увеличения синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы.

**Материалы и методы.** Объектом исследований был штамм *Penicillium* sp. 27 - продуцент внеклеточной  $\alpha$ -L-рамнозидазы, изолированный из грунта, 1997 г., Украина.

Оптимизацию среды роста проводили на базовой среде Чапека следующего состава, г/л:  $\text{NaNO}_3$  – 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{KCl}$  – 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; рамноза – 4, pH 6,0.

Культуру *Penicillium* sp. 27 выращивали глубинным способом при температуре 25°C в колбах Эрленмейера (750 мл), которые содержали 100 мл питательной среды. В качестве источника углерода использовали: ксилозу, арабинозу, глюкозу, галактозу, рамнозу, маннозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маннит, (в концентрации 10 г/л в перерасчете на углерод). В этом случае как источник азота в среду добавляли нитрат натрия.

В качестве источника азота (в концентрации 2 г/л в перерасчете на азот) использовали: нитрат натрия, хлорид аммония, сульфат аммония, ацетат аммония, дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, пептон, мочевины, соевую муку.

Влияние условий культивирования (pH, температура, аэрация) изучали на среде, оптимизированной по источникам углерода и азота. Влияние pH на активность фермента изучали, выращивая *Penicillium* sp. 27 при исходных значениях pH среды: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0.

Для изучения влияния аэрации на ферментативную активность культуры *Penicillium* sp. 27 выращивали в колбах Эрленмейера (750 мл), которые содержали разные объемы питательной среды: 50, 100, 150, 200, 250 мл, скорость вращения качалки 145, 232 и 250 об/мин.

Посевной материал в колбы вносили в концентрации 2, 3, 5, 10, 15, 20 и 25 % от объема питательной среды.

По окончании ферментации биомассу отделяли фильтрованием и в супернатанте культуральной жидкости определяли ферментативную активность. Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляли 0,2 мл 0,1 М фосфат-цитратного буфера (ФЦБ) pH 5,0 и 0,1 мл 0,01 М раствора соответствующего субстрата в ФЦБ. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при температуре 37°C. 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 [4]. За единицу  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности принимали такое количество энзима, которое гидролизует 1 мкмоль *n*-нитрофенил- $\alpha$ -L-рамнопиранозиды (“Sigma-Aldrich”, США) за мин в условиях опыта. Удельную активность рассчитывали как количество единиц активности, отнесенное к 1 мг белка.

Содержание белка определяли методом Lowry. [5]. Калибровочную кривую строили с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина.

Все исследования проводили в 5-7 повторностях. Анализ полученных результатов проводили путем их статистической обработки методами вариационной и корреляционной статистики, используя t-критерий Стьюдента [6]. В работе высчитывали средние значения величин и стандартные погрешности ( $M \pm m$ ). Результаты, которые поданы графически, получали с помощью программы Microsoft Excel 2007.

**Результаты.** Изучение динамики синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27 показало (рис.1), что максимальная ферментативная активность наблюдается на седьмые сутки культивирования. Биосинтез  $\alpha$ -L-рамнозидазы начинается с четвертых суток выращивания продуцента, а после восьми суток выращивания стремительно падает.



Рис. 1. Динамика синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27

Результаты исследований влияния различных параметров культивирования (табл. 1, рис.2) показали, что наиболее эффективным для синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27 было использование среды с исходным значением pH 5,0. Достаточно эффективным был уровень активности также и при pH 4,0 и 6,0 (наблюдалось снижение только на 12%). В то время как в более кислой (pH 3,0), так и более щелочной (pH 7,0 и выше) среде синтез значительно снижался.

Существенное влияние на синтез ферментов оказывает также температура выращивания продуцента. Так, показано, что 25°C является оптимальной для синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27, в то время как ее повышение негативно влияет на биосинтез  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27 (табл. 1). Поэтому отработку оптимальных параметров глубинного культивирования *Penicillium* sp. 27: количества посевного материала, его возраст, скорость перемешивания, температуру и объем среды выращивания осуществляли при температуре 25°C (табл. 1).

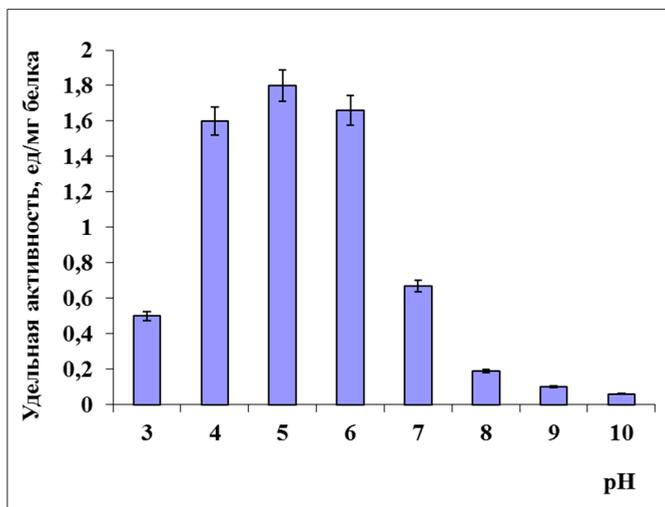


Рис. 2. Влияние исходного значения pH на синтез  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27

Таблица 1  
Оптимальные параметры глубинного культивирования *Penicillium* sp. 27 – продуцента  $\alpha$ -L-рамнозидазы

Параметры культивирования		Активность (ед./мг белка) в зависимости от времени культивирования, сутки								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
Температура, °С	25	0,05	0,1	0,3	0,83	1,7	4,5	3,5	0,5	0,03
	28	0,03	0,08	0,27	0,75	1,5	3,9	2,9	0,7	0,05
	42	0,01	0,03	0,05	0,09	1,1	2,1	1,1	0,05	0,03
Возраст инокулюма, сутки	2	0,05	0,09	0,29	0,75	1,8	3,8	2,9	1,9	0,6
	3	0,05	0,1	0,3	0,83	1,7	4,5	3,5	0,5	0,03
	4	0,03	0,09	0,29	0,8	1,6	4,3	3,7	0,7	0,05
	5	0,03	0,07	0,32	0,9	1,9	3,7	1,9	0,7	0,06
	6	0,02	0,06	0,31	1,3	2,1	3,2	2,2	0,45	0,07
	7	0,01	0,08	0,27	1,9	2,2	3,5	2,3	0,9	0,03
	8	0,01	0,05	0,23	1,5	1,7	2,9	2,5	0,6	0,03
	10	0,01	0,03	0,21	1,2	1,4	1,9	2,1	0,5	0,03
Количество посевного материала, %	2	0,02	0,03	0,1	0,34	0,9	1,7	1,95	2,4	1,1
	3	0,01	0,05	0,2	0,67	1,2	2,2	3,2	2,2	1,3
	5	0,02	0,1	0,25	0,73	1,4	2,3	1,9	2,1	0,9
	10	0,05	0,1	0,3	0,83	1,7	4,5	3,5	0,5	0,03
	15	0,03	0,08	0,2	0,4	0,7	1,2	1,1	0,8	0,05
	20	0,02	0,07	0,15	0,37	0,8	1,4	1,3	0,9	0,7
	25	0,04	0,08	0,23	0,48	0,56	0,9	0,8	0,5	0,3
Объем среды в колбе, мл	50	0,3	0,15	0,4	1,2	3,5	3,3	2,9	0,7	0,05
	100	0,05	0,1	0,3	0,83	1,7	4,5	3,5	0,5	0,03
	150	0,03	0,1	0,29	0,74	1,4	3,1	2,9	0,9	0,05
	200	0,02	0,07	0,19	0,3	0,19	0,07	0,04	0,03	0,01
	250	0,01	0,05	0,2	0,21	0,3	0,19	0,15	0,05	0,01
Скорость перемешивания, об/мин	145	0,02	0,05	0,1	0,5	1,1	1,9	2,1	0,07	0,03
	232	0,04	0,08	0,2	0,65	1,6	4,3	3,3	0,9	0,08
	250	0,05	0,1	0,3	0,83	1,7	4,5	3,5	0,5	0,03

Установлено, что максимальный уровень активности фермента наблюдается при внесении 10% инокулюма. Внесение большего (15–25%) или меньшего (5%) количества посевного материала не приводило к увеличению  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности у исследуемого штамма.

Наибольший синтез фермента происходил при использовании трехсуточного инокулюма.

Исследование эффективности перемешивания показало (табл. 1), что максимальная  $\alpha$ -L-рамнозидазная активность наблюдается при культивировании на качалке при 250 об/мин.

При изучении влияния интенсивности аэрации на продукцию  $\alpha$ -L-рамнозидазы было показано, что большие объемы питательной среды в колбах, которые снижают скорость растворения кислорода, вызывают незначительное снижение активности  $\alpha$ -L-рамнозидазы. Максимальный уровень  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности наблюдали (табл. 1) при 100 мл питательной среды в качалочной колбе на 0,75 л.

Данные по влиянию источников азота на  $\alpha$ -L-рамнозидазную активность *Penicillium* sp. 27 (рис.3) показали, что оптимальным источником азота является пептон (2.4 ед./мг белка), вместе с тем достаточно высокие уровни активности наблюдались на среде с сульфатом аммония (2.0 ед./мг белка) и дрожжевым автолизатом (1.8 ед./мг белка). Обращает на себя внимания тот факт, что на среде с нитратом аммония ферментативная активность была минимальной (0.2 ед./мг белка).

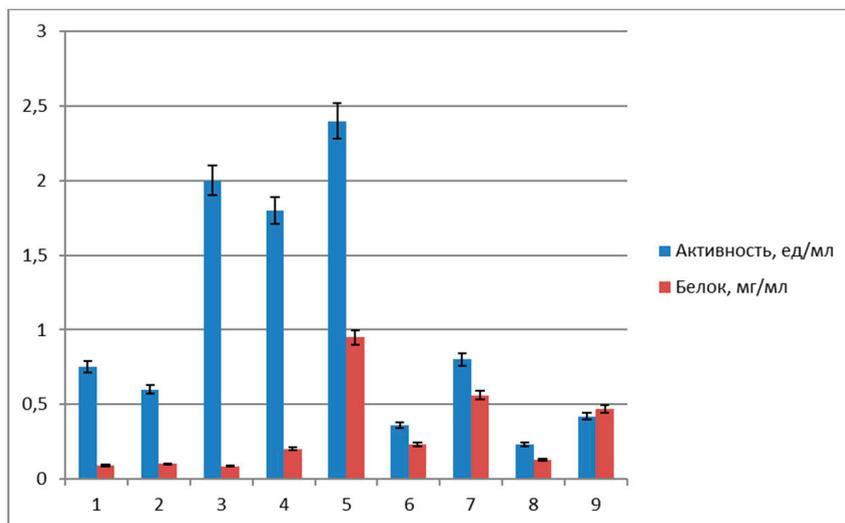


Рис. 3. Влияние различных источников азота на  $\alpha$ -L-рамнозидазную активность *Penicillium* sp. 27

Примечание: 1 – NaNO<sub>3</sub>, 2 – NH<sub>4</sub>Cl, 3 – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 – дрожжевой автолизат, 5 – пептон, 6 – мочевина, 7 – соевая мука, 8 – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 9 – дрожжевой экстракт

Результаты исследований по влиянию источников углерода на  $\alpha$ -L-рамнозидазную активность *Penicillium* sp. 27 (рис. 4) свидетельствуют о том, что наиболее высокий уровень ферментативной активности в культуральной жидкости наблюдается на среде с рамнозой (1,6 ед./мг белка). Хотя арабиноза, ксилоза, манноза, маннит, мальтоза, глюкоза, лактоза,

сахароза, галактоза и влияли положительно на рост культуры, вместе с тем они не способствовали синтезу  $\alpha$ -L-рамнозидазы.

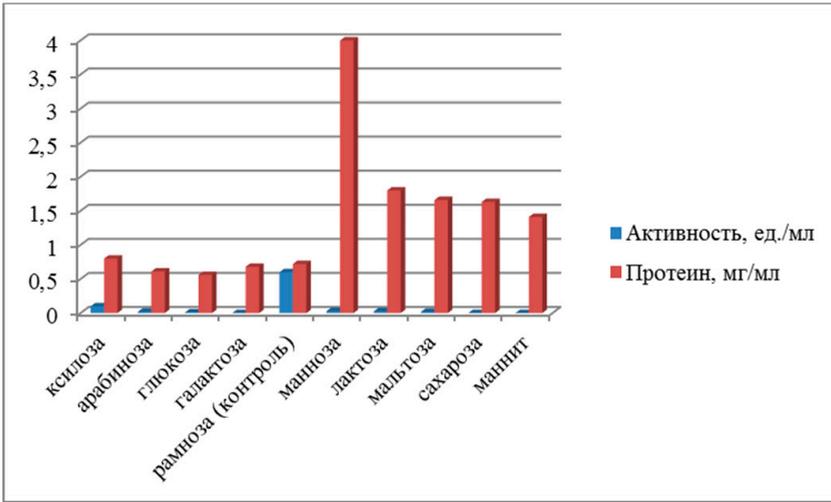


Рис. 4. Влияние источников углерода на  $\alpha$ -L-рамнозидазную активность *Penicillium* sp. 27

Поскольку установлено (рис. 4), что при культивировании *Penicillium* sp. 27 на рамнозе ферментативная активность была значительно выше, чем на других источниках углеродного питания, в дальнейших исследованиях было изучено влияние различных концентраций рамнозы на синтез  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27. Показано (рис.5), что максимальный синтез фермента (1,8 ед./мг белка) происходит при концентрации рамнозы 8 г/л.

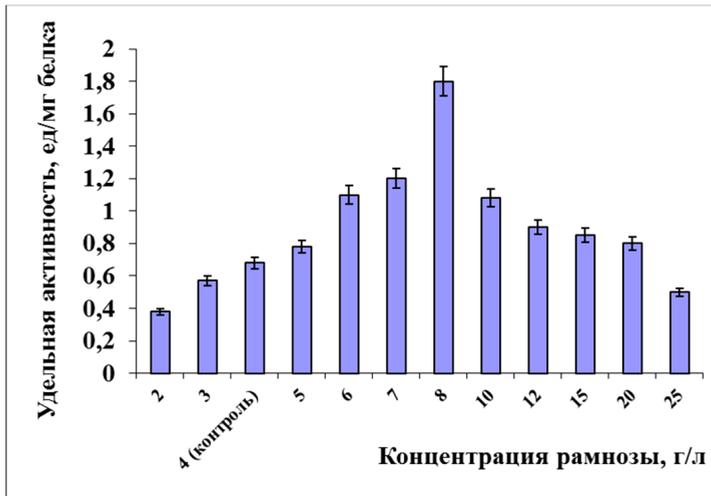


Рис. 5. Влияние различных концентраций рамнозы на  $\alpha$ -L-рамнозидазную активность *Penicillium* sp. 27

**Обсуждение.** Важнейшие тенденции развития промышленности сегодня – это снижение себестоимости, увеличение ассортимента и повышение качества выпускаемой продукции. В связи с этим возникает необходимость разработки и внедрения способов, направленных на оптимизацию основных технологических стадий и улучшение качества сырья без значительных затрат материальных и топливно-энергетических ресурсов. Создание биотехнологического производства представляет собой сложную многоступенчатую задачу, предполагающую выполнение нескольких этапов: составление технологической цепочки процесса, определение параметров процесса наработки культуры, режима выделения и концентрирования продукта. Некоторые из этих стадий сами по себе представляют комплекс задач, требующих решения. Так, например, процесс культивирования включает в себя выбор источников питания, количества посевного материала, оптимальных условий роста (значения температуры, pH среды, режима аэрации и т.д.). Конечная стоимость продукта будет складываться из суммы всех затрат на каждую стадию процесса, а также расходов на электроэнергию, пар, воду, воздух для аэрации культуры. Для снижения себестоимости готового продукта решение каждого этапа по планированию производства должно проводиться с учетом экономической целесообразности.

Известно, что уровень активности внеклеточного фермента значительно зависит от времени культивирования продуцента [1, 2, 7]. Нами показано, что *Penicillium* sp. 27 проявляет максимальный синтез  $\alpha$ -L-рамнозидазы на седьмые сутки культивирования. Результаты этих исследований согласуются с данными, приведенными в работе S.Yadav i K. D. S. Yadav [8], а также рядом других исследователей [1, 2, 7], которые показали, что оптимальным временем выращивания грибных продуцентов являются 6–10 сутки культивирования.

Нами установлено, что более целесообразным для синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27 было использование среды с начальным значением pH 5,0. Аналогичные данные были получены ранее, как нами для *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens* [9] и *Penicillium tardum* [10], так и рядом авторов для  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Pichia angusta* X349 [11], *A. fumigatus* МТСС-3376 [12] и *P. commune* [1], которые выращивали при исходных значениях pH среды 4,5-5,5.

Существенное влияние на синтез энзимов имеет также температура выращивания продуцентов. Наши исследования полностью согласуются с данными [1], свидетельствующими о том, что наибольшая секреция гликозидаз происходит при оптимальной температуре роста продуцента.

Установленный нами факт о том, что максимальный уровень активности фермента достигался при внесении 10 % инокулюма, подтвердил данные, полученные D. Monti с соавт. [13], которые наблюдали максимальный синтез грибных  $\alpha$ -L-рамнозидаз при концентрации инокулюма 10%. Вместе с тем Kumar V. [7] установил, что для оптимального синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы *A. niger* МТСС-1344 необходимо использование 15% инокулюма.

При изучении влияния интенсивности аэрации на продукцию  $\alpha$ -L-рамнозидаз нами показано, что большие объемы питательной среды в колбах способствуют снижению  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности.

Результаты наших исследований согласуются с данными, установленными для большинства гликозидаз [1], и свидетельствующие о необходимости активной аэрации.

Согласно полученным результатам оптимальным источником азота для синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Penicillium* sp. 27 является пептон. В то же время ранее было показано, что для синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* и *E. erubescens* [9] оптимальным источником азота является нитрат аммония, тогда как для *P. tardum* – дрожжевой автолизат [10]. Puri M. с соавт. [14] также установили, что наиболее эффективным источником азота для биосинтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы микромицетов является нитрат аммония, а при культивировании продуцента на среде с сульфатом аммония  $\alpha$ -L-рамнозидазная активность в культуральной жидкости отсутствует вообще на фоне нормального роста и развития продуцента. Столь резкие расхождения лишней раз указывают на то, что отношение микромицетов к источникам азота строго индивидуально и определяется физиологическими особенностями культуры.

Как и ряд других гликозидаз, расщепляющих углеводные субстраты,  $\alpha$ -L-рамнозидаза является индуцибельным ферментом [1, 2]. Имеются сообщения о том [1, 2, 12-15], что индукторами синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидаз может служить рамноза, нарингин и рутин, причем их активирующий эффект не зависит от принадлежности микроорганизмов к той или иной таксономической группе. Нами показано, что наиболее высокий уровень  $\alpha$ -L-рамнозидазной активности в культуральной жидкости наблюдается на среде с рамнозой. Аналогичные данные были получены ранее нами для *C. albidus*, *E. erubescens* [9] и *P. tardum* [10], а также другими исследователями, которые показали [15], что биосинтез  $\alpha$ -L-рамнозидаз микромицетов заметно увеличивается в присутствии рамнозы, в то время как арабиноза, ксилоза, арабиногалактан, фруктоза, пектин, целлюлоза, ксиланы и арабаны являются малоэффективными источниками углерода для синтеза фермента.

Изучение влияния различных концентраций рамнозы показало, что максимальный уровень активности в культуральной жидкости *Penicillium* sp. 27 наблюдается при использовании 8 г/л. Результаты исследований согласуются как с литературными [1, 2, 13, 15], так и с полученными нами ранее данными для *P. tardum* [10], свидетельствующими о том, что продуценты достигают наилучших показателей синтеза  $\alpha$ -L-рамнозидаз при концентрации рамнозы в среде культивирования 5-10 г/л.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что наиболее эффективным источником углерода для биосинтеза  $\alpha$ -L-рамнозидазы исследуемого микромицета является рамноза, а наиболее эффективным источником азота – пептон.

Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизированы условия культивирования продуцента  $\alpha$ -L-рамнозидазы *P. tardum*, а именно состав питательной среды (в г/л): рамноза – 8, пептон – 3;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $\text{KCl}$  – 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, и подобраны параметры культивирования: возраст инокулюма 3 суток; 10% посевного материала, исходное рН среды 5,0; температура выращивания 25°C, срок культивирования 7 суток. Ферментативная

активність в супернатанте культуральної жидкості підвищилась в 7 раз і складала 4,5 од./мг білка.

*Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины: доктору. биол. наук., зав. отделом Курченко И.Н. и вед. инж. Наконечной Л.Т. за любезно предоставленный для исследований штамм *Penicillium* sp. 27.*

## ВПЛИВ ПАРАМЕТРІВ КУЛЬТИВУВАННЯ *PENICILLIUM* SP. 27 НА АКТИВНІСТЬ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗИ

**О.В. Гудзенко, Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанець**

*Інститут мікробіології і вірусології НАН України,  
буль. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна;*

### Резюме

**Мета.** Вивчити вплив деяких параметрів культивування на процес біосинтезу позаклітинної  $\alpha$ -L-рамнозидази *Penicillium* sp. 27. **Методи.** Оптимізацію середовища росту проводили на базовому середовищі Чапека наступного складу, г/л:  $\text{NaNO}_3$  – 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{KCl}$  – 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; рамноза – 4, рН 6,0. Як джерело вуглецю використовували ксилозу, арабінозу, глюкозу, галактозу, рамнозу, манозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маніт. Джерелом азоту були нітрат натрію, хлорид амонію, сульфат амонію, ацетат амонію, дріжджовий автолізат, дріжджовий екстракт, пептон, сечовина, соєве борошно.  $\alpha$ -L-Рамнозидазну активність визначали методом Romero, білок – методом Lowry. **Результати.** Дослідження впливу деяких параметрів культивування на процес біосинтезу  $\alpha$ -L-рамнозидази штамом *Penicillium* sp. 27 показало, що для максимального біосинтезу оптимальними джерелами вуглецю і азоту були рамноза (8 г/л), пептон (3 г/л), температура 25°C, вихідне рН середовища 5,0. Встановлено, що максимальний рівень  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності досягається на сьому добу культивування. **Висновки.** При вирощуванні штаму *Penicillium* sp. 27, в підібраних умовах синтез  $\alpha$ -L-рамнозидази підвищився в 7 разів. Ферментативна активність в супернатанті культуральної рідини склала 4,5 од./мг білка.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -L-рамнозидаза, параметри культивування, *Penicillium* sp. 27, джерела вуглецю і азоту.

## THE INFLUENCE OF CULTIVATION PARAMETERS OF *PENICILLIUM* SP. 27 ON THE $\alpha$ -L-RHAMNOSIDASE ACTIVITY

**O. V. Gudzenko, N.V. Borzova, L.D. Varbanets**

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

### Summary

**The aim.** Study of the influence of some parameters of cultivation on the process of biosynthesis of extracellular  $\alpha$ -L-rhamnosidase by the *Penicillium* sp. 27. **Methods.** Optimization of the growth medium was carried out on the Czapek base medium of the

following composition, g / l:  $\text{NaNO}_3$ -2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1;  $\text{KCl}$ -0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015; rhamnose - 4, pH - 6.0. As a carbon sources were used: xylose, arabinose, glucose, galactose, rhamnose, mannose, lactose, maltose, sucrose, mannitol. The sources of nitrogen were sodium nitrate, ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium acetate, yeast autolysate, yeast extract, peptone, urea, soybean flour. The  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity was determined by the Romero method, and the protein by the method of Lowry et al. **Results.** Investigation of the influence of some parameters of cultivation on the process of biosynthesis of  $\alpha$ -L-rhamnosidase by *Penicillium* sp. 27 showed that for maximal biosynthesis the optimum sources of carbon and nitrogen were rhamnose (8 g / l) and peptone (3 g / l), temperature 25 ° C , the initial pH of the medium was 5.0. It was established that the maximum level of  $\alpha$ -L-rhamnosidase activity is reached on the seventh day of cultivation. **Conclusions.** When the *Penicillium* sp. 27 was grown under suitable conditions, the synthesis of  $\alpha$ -L-rhamnosidase increased seven-fold. The activity of the enzyme in the supernatant of the culture liquid was 4.5 U / mg protein.

*Keywords:*  $\alpha$ -L-rhamnosidase, parameters of cultivation, *Penicillium* sp. 27, sources of carbon and nitrogen.

1. Varbanets L.D., Borzova N.V. [Glycosidases of microorganisms and research methods]. Kyiv: Nauk. Dumka; 2010 . Ukrainian.
2. Gudzenko O. V., Varbanets L.D. [Microbial  $\alpha$ -L-rhamnosidases producers, properties, practical use] *Biotechnologia Acta*. 2012; 5(6):9-26. Ukrainian
3. Gudzenko O.V., Varbanets LD., Kurchenko IM., Naconechnaya LT. [Screening of the producents  $\alpha$ -L-rhamnosidases amongst representatives of *Penicillium*]. *Microbiol Z*. 2016; 78(2):33-42. Ukrainian.
4. Romero C., Manjon A., Bastida J. A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase. *Analytical Biochemistry*. 1985; 149(2):566–571.
5. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J. Protein measurement with fo-linphenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 193(2):265-275.
6. Lakyn H. F. *Byometryia*. Moscow: Vysshaya Shkola; 1990. Russian.
7. Kumar V. Comparative studies on inducers in the production of naringinase from *Aspergillus niger* MTCC 1344. *African J. of Biotechnol*. 2010, 9(45):7683–7686.
8. Yadav V., Yadav K.D.S. New fungal for  $\alpha$ -L-rhamnosidase an important enzyme used in the synthesis of drugs and drug precursors. *Appl. Biochemistry and Microbiol*. 2010; 48(3):295–301.
9. Gudzenko OV, Varbanets LD [Optimization of cultivation conditions of  $\alpha$ -L-rhamnosidases producers – representatives of different taxonomic groups of microorganisms]. *Microbiol Z*. 2011; 73(3):46-52. Ukrainian.
10. Gudzenko OV, Varbanets LD [Optimization of cultivation conditions of *Penicillium tardum* –  $\alpha$ -L-rhamnosidase producer]. *Microbiol Z*. 2015; 77(4):26-31. Ukrainian.
11. Puri M. Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects // *Appl. Microb. and Biotechnol*. 2012; 93(1):49–60.
12. Yadav V., Yadav P. K., Yadav S., Yadav K. D. S.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: A review. *Process Biochemistry*. 2010; 45(8):1226–1235.
13. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M.  $\alpha$ -L-rhamnosidase: old and new insights. *Industrial Enzymes*: Springer; 2007. p. 117-140.

14. 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):195–201.
15. Yadav S., Yadav K. D. S. Secretion of  $\alpha$ -L-rhamnosidases by some indigenous fungal strains. *J. of Scientific and Industrial Research*. 2004; 63:439–443.

Отримано 20.04.2018