

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗЫ *CRYPTOCOCCUSALBIDUS* В БИОТЕХНОЛОГИИ

Гликозидазы микроорганизмов представляют обширную группу энзимов, которые все чаще находят свое применение в различных биотехнологических процессах.  $\alpha$ -L-Рамнозидаза (КФ 3.2.1.40) является на сегодняшний день наиболее перспективным и востребованным энзимом в производстве соков и вин [1]. Природными субстратами для энзима могут служить такие производные флавоноидов как рутин, неогесперидин, нарингин, кверцитрин, гесперидин, а также гинзенозиды и азиатикозиды. Такие свойства позволяют использовать  $\alpha$ -L-рамнозидазы в самых разных отраслях. Гидролизую терпеновые гликозиды – рутинозиды, энзим способствует высвобождению ароматических соединений, усиливающих аромат соков и вин. Расщепление биофлавоноида нарингина позволяет избавиться от горечи цитрусовых соков, особенно грейпфрутовых. Широко используется  $\alpha$ -L-рамнозидаза в химической промышленности для получения рамнозы и натуральных гликозидов [3]. Во всех этих процессах очень важно, чтобы использовались энзимы, стабильные при высоких температурах.

Дрожжи с технологической точки зрения являются наилучшими продуцентами, поскольку характеризуются высокой скоростью роста, устойчивостью к посторонней микрофлоре, способны усваивать широкий круг источников питания и, в отличие от грибов, не загрязняют воздух спорами. Ранее [3] в результате скрининга дрожжевых музейных культур отдела физиологии промышленных микроорганизмов ИМВ НАН Украины, был отобран перспективный штамм *Cryptococcusalbicus* 1001, продуцент внеклеточной  $\alpha$ -L-рамнозидазы. Из супернатанта культуральной жидкости *C. albicus* был получен очищенный энзимный препарат [4].

Целью нашей работы было провести сравнительное изучение термостабильности препаратов  $\alpha$ -L-рамнозидазы *C. albicus*, полученных в результате выращивания на различных источниках углерода и установить некоторые закономерности процесса их термоинактивации.

В работе были использованы 2 препарата  $\alpha$ -L-рамнозидаз, полученные из культуральной жидкости продуцента *C. albicus*. В качестве источника углерода были использованы рамноза (5 г/л) или нарингин

(5 г/л). Препараты  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus*:  $\alpha$ -L-RhamR (полученная на среде с рамнозой в качестве единственного источника углерода) и  $\alpha$ -L-RhamN (полученная на среде с нарингином в качестве единственного источника углерода).

Сравнительное изучение свойств и процесса термоинактивации этих  $\alpha$ -L-рамнозидаз показало, что индуктор синтеза не влияет на эффективность гидролиза нарингина энзимом, однако вносит изменения в термостабильность протеиновой молекулы. Гидрофобные взаимодействия и остатки цистеина участвуют в поддержании активной конформации молекулы  $\alpha$ -L-рамнозидазы. Также стабилизируют дрожжевую  $\alpha$ -L-рамнозидазу 0,5 % бычий сывороточный альбумин и 0,25 % глутаровый альдегид.

В результате исследований было установлено, что термостабильность  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* находится в прямой зависимости как от степени очистки энзима, так и от индуктора синтеза. Хотя в целом следует отметить большой потенциал  $\alpha$ -L-RhamN. Значительный вклад в стабилизацию структуры обеих форм энзима вносят гидрофобные взаимодействия и остатки цистеина. Показано, что  $\alpha$ -L-рамнозидаза *C. albidus* эффективно гидролизует нарингин в достаточно высоких концентрациях и при повышенных температурах. Присутствие нейтрального белка 0,5 % и глутарового альдегида 0,25 % стабилизирует дрожжевую  $\alpha$ -L-рамнозидазу независимо от способа получения. Полученные результаты позволяют рекомендовать данный энзим для биотехнологических процессов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Puri M. Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects. *Appl. Microb. and Biotechnol.* 2012. – 93, N 1. – P. 49–60.
2. 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.
3. Рзаева О.М., Варбанец Л.Д., Нагорна С.С. Скринінг продуцентів  $\alpha$ -L-рамнозидази серед дріжджів // *Мікробіол. журнал.* 2010. – 72, N 6. – С.11-17.
4. Гудзенко Е.В., Варбанец Л.Д. Очистка и физико-химические свойства  $\alpha$ -L-рамнозидазы *Cryptococcus albidus* 1001 // *Мікробіол. журнал.* 2012. – 74, N6. – С.16-23.