

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.15:577.152.3

## СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗ *Cryptococcus albidus* І *Eupenicillium erubescens*

О. В. ГУДЗЕНКО, Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;  
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Досліджено субстратну специфічність  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* та *Eupenicillium erubescens*. Показано, що ензими здатні гідролізувати синтетичні (п-нітрофенільні похідні моносахаридів) і природні (нарингін, неогесперидин) субстрати.  $\alpha$ -L-Рамнозидази діяли на природні субстрати досить ефективно, причому препарат, одержаний з *E. erubescens*, характеризується вищими значеннями  $V_{max}$ , ніж ензим *C. albidus*. Але  $\alpha$ -L-рамнозидаза *C. albidus* виявляє більшу спорідненість до нарингину і неогесперидину, ніж ензим *E. erubescens* ( $K_m$  0,77 і 3,3 мМ та 5,0 і 3,0 мМ відповідно). Щодо синтетичних похідних моносахаридів, то обидва ензими виявляють вузьку специфічність до природи глікону:  $\alpha$ -L-рамнозидаза *E. erubescens* — прискорює розщеплення тільки п-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду,  $K_m$  становить 1,0 мМ,  $V_{max}$  120 мкмоль/хв/мг протеїну), а *C. albidus* — лише п-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозиду ( $K_m$  = 10 мМ,  $V_{max}$  5 мкмоль/хв/мг протеїну). Отже, показано, що ензимним препаратам *E. erubescens* та *C. albidus* притаманна вельми вузька субстратна специфічність. Здатність препаратів  $\alpha$ -L-рамнозидаз *E. erubescens* і *C. albidus* гідролізувати природні субстрати: нарингін та неогесперидин свідчить про їхню специфічність дії до  $\alpha$ -1,2-зв'язаної L-рамнози. На основі цих даних можна прогнозувати використання  $\alpha$ -L-рамнозидаз *E. erubescens* і *C. albidus* в різних галузях промисловості, зокрема харчовій. Це підтверджується також тим, що досліджувані  $\alpha$ -L-рамнозидази є стабільними за 20%-ї концентрації етанолу та 500 мМ глюкози в реакційній суміші.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -L-рамнозидази *Cryptococcus albidus* і *Eupenicillium erubescens*, субстратна специфічність, нарингін, неогесперидин, вплив глюкози та етанолу на активність  $\alpha$ -L-рамнозидази.

Ензим  $\alpha$ -L-Рамнозидаза, ( $\alpha$ -L-рамнозид-рамногідролаза, 3.2.1.40) гідролітично відщеплює термінальні невідновлені  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- та  $\alpha$ -1,6-зв'язані залишки L-рамнози, що присутні в значній кількості в природних глікокон'югатах (флавоноїди, сапоніни, терпени та ін.), а також у синтетичних глікозидах. Розщеплення O-глікозидного зв'язку відбувається зі збереженням конфігурації аномерного атома вуглецю (C1 у циклічній формі моносахариду). Згідно з класифікацією глікозил-гідролаз (CAZy), основою на амінокислотній послідовності,  $\alpha$ -L-рамнозидази внесено до чотирьох родин glycosyl-hydrolase (GH): 28, 78, 106 та НК (не класифіковані) [1, 2]. Новий тип флавоноїдної  $\alpha$ -L-рамнозидази був ізольований з *Aspergillus niger* DLFCC-90 [3] і, базуючись на амінокислотній послідовності, ензим класифікований в глікозил-гідролази родини GH13.

$\alpha$ -L-Рамнозидази використовуються в харчовій промисловості для усунення гіркоти соків із citrusових, обумовленої наявністю нарингину, для видалення з апельсинових соків кристалів гесперидину та вивільнення 7-O- $\beta$ -D-глікозиду гесперидину, який є важливим попередником у виробництві підсолоджувачів, а також для покращення букета вин [4]. Деглікозилювання  $\alpha$ -L-рамнозидазою флавоноїдів *in vitro* є основою розвитку нової ери у створенні лікарських засобів [5]. Зокрема, в останні роки цей ензим привертає особливу увагу дослідників, які на основі глікозидів рослинного походження створюють засоби для лікування серцево-судинних захворювань, а також препаратів із противірусною та імуноотропною дією. Для виявлення біологічної дії деяких з цих препаратів необхідна наявність рамнози, інших — її відщеплення. Здатність рамнозидів та їхніх похідних до захисту організму відкрила ши-

роке поле для застосування  $\alpha$ -L-рамнозидаз у фармацевтичній промисловості [6–8]. Так, після глікозидазної обробки екстракти рослини *Ruscus aculeatus* набувають протизапальної [9] та цитостатичної [10] дії, що обумовлює можливість їх використання для лікування хронічної венозної недостатності [6, 7].

Застосування  $\alpha$ -L-рамнозидаз в хімічній промисловості пов'язане зі здешевленням виробництва рамнози. У зв'язку з тим, що рамноза не синтезується як вільний мономер, вона має бути одержана з  $\alpha$ -L-рамнозовмісних глікозидів або полісахаридів [11]. Останнім часом  $\alpha$ -L-рамнозидази використовують у промисловому виробництві ароматичних речовин. Оскільки рамноза у флавоноїдних глікозидах є зв'язаною різними типами зв'язків, важливою характеристикою  $\alpha$ -L-рамнозидаз є їхня субстратна специфічність, на основі якої можна прогнозувати їх подальше практичне використання в різних галузях.

Метою роботи було дослідження субстратної специфічності  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* і *Eupenicillium erubescens* та вивчення впливу глюкози та етанолу на їхню активність.

### Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штамми *Cryptococcus albidus* 1001 та *Eupenicillium erubescens* 248, одержані з колекції Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

*C. albidus* і *E. erubescens* вирощували глибинним способом впродовж чотирьох і восьми діб (відповідно) при температурі 28 °С, на качалках при 220 об./хв. *C. albidus* культивували на оптимізованому раніше [12] середовищі (г/л): рамноза – 2, пептон – 5, дріжджовий екстракт – 3, мальтекстракт – 3, рН – 6, а *E. erubescens* – на середовищі Чапека [12] (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015; рамноза – 3, рН – 6,0.

Препарати  $\alpha$ -L-рамнозидаз виділяли з культуральних фільтратів продуцентів шляхом осадження сульфатом амонію (до 90% насичення) з наступною хроматографією на заряджених і нейтральних TSK-гелях (DEAE-Toyoparl 650-s і Toyoparl HW-60 «Toya Soda» Японія відповідно) [13, 14].

Визначення глікозидазної активності проводили, використовуючи відповідні синтетичні субстрати: *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -D-галактопіранозид, *n*-нітрофеніл- $\alpha$ - та  $\beta$ -D-глюкопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкоронід; *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-ксилопіранозид;

*n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-манопіранозид; *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-фукопіранозид, *n*-нітрофеніл-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінід (Sigma-Aldrich, США).

Для визначення глікозидазної активності до 0,1 мл розчину ензиму (питома активність 12,5 і 120 од./мг протеїну відповідно для *C. albidus* і *E. erubescens*) 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 самі компоненти, але у зворотному порядку. Кількість *n*-нітрофенолу, який було відщеплено внаслідок гідролізу, визначали колориметричним методом за поглинанням при 400 нм на спектрофотометрі СФ-26 [15]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах дослідів.

Для визначення  $\alpha$ -L-рамнозидазної активності з використанням природних субстратів нарингину, неогесперидину (Sigma-Aldrich, США) використовували метод Davis [16]. У разі визначення активності ензиму до 1 мл розчину ензиму додавали 1 мл 0,05% нарингину в 0,1 М ФЦБ рН 5,2. Реакційну суміш інкубували протягом 60 хв при температурі 37 °С. Відбирали аліквоти по 0,2 мл, додавали по 10 мл діетиленгліколю, по 0,2 мл 4 М NaOH. Суміш витримували при кімнатній температурі 10 хв, інтенсивність жовтого забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 420 нм.

За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах дослідів.

Вміст протеїну на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм, кількість його визначали методом Lowry et al. [17]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали за довжини хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін. В препаратах *C. albidus* і *E. erubescens* визначали концентрацію протеїну.

Питома активність препаратів виражали в од./мг протеїну.

Максимальну швидкість ( $V_{\max}$ ) та константу Міхаеліса ( $K_m$ ) визначали за методом Лайнуївера-Берка [18] із кривих залежності оберненої швидкості ензимної реакції від оберненої концентрації субстрату.

Усі дослідів проводили у 5–8 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводився шляхом їх статистичної обробки метода-

ми варіаційної та кореляційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента [19]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ( $M \pm m$ ). Значення при  $P < 0,05$  розглядали як вірогідні. Результати, які подані графічно, отримували за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

### Результати та обговорення

Важливою характеристикою ензимів є їхня субстратна специфічність, на основі якої можна прогнозувати основні напрями щодо можливого їх практичного використання. Природними субстратами для  $\alpha$ -L-рамнозидаз із різних джерел є  $\alpha$ -L-рамнозовмісні флавоноїди та сапоніни рослин, глікопротеїни, камеді, смоли, пігменти. Ці речовини мають незначну різницю в структурі аглікону: рутин, неогесперидин, гесперидин, нарингін, кверцитрин є похідними флавоноїдів, тоді як гінзенозид – це сапонін, а азіатікозид – терпеновий глікозид. L-Рамноза безпосередньо зв'язана з агліконовою частиною тільки у кверцитрині, тоді як всі інші субстрати – це комплекси глікозидів, в яких L-рамноза зв'язана з  $\beta$ -D-глюкопіранозильною одиницею за допомогою різних типів глікозидних зв'язків:  $\alpha$ -1,2 в нарингіні, неогесперидині та гінзенозиді,  $\alpha$ -1,4 – в азіатікозиді,  $\alpha$ -1,6 – в рутині і гесперидині.

Субстратами для  $\alpha$ -L-рамнозидази можуть бути також рамнозовмісні дисахариди, що містять  $\alpha$ -D-ксилозу,  $\beta$ -D-фукозу,  $\alpha$ -D-галактозу і  $\alpha$ -N-ацетил-D-глюкозамін в редукованих терміналях: O- $\alpha$ -рамнопіранозил- $\alpha$ -1,3-D-ксилоза; O- $\alpha$ -L-рамнопіранозил- $\alpha$ -1,2-D-фукоза, O- $\alpha$ -L-рамнопіранозил- $\alpha$ -1,2-D-галактоза, O- $\alpha$ -L-рамнопіранозил- $\alpha$ -1,4-D-галактоза, O- $\alpha$ -L-рамнопіранозил- $\alpha$ -1,3-N-ацетил-D-глюкозамін, O- $\alpha$ -L-рамнопіранозил- $\alpha$ -1,6-N-ацетил-D-глюкозамін, O- $\alpha$ -L-рамнопіранозил- $\alpha$ -1,4-N-ацетил-D-глюкозамін.

Дослідження субстратної специфічності препаратів  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* проводили як на синтетичних *n*-нітрофенільних похідних моносахаридів, так і на природних субстратах, таких як нарингін та неогесперидин. Обидва ензими гідролізували природні субстрати досить ефективно, причому  $\alpha$ -L-рамнозидаза *E. erubescens* характеризується більшими значеннями  $V_{\max}$ , ніж ензим *C. albidus* (таблиця, рис. 1–4). Але  $\alpha$ -L-рамнозидаза *C. albidus* характеризується більшою спорідненістю до нарингину, ніж ензим *E. erubescens* ( $K_m$  0,77 і 5,0 мМ відповідно).

Що стосується синтетичних похідних моносахаридів, то обидва ензими виявляли вузьку специфічність до глікону:  $\alpha$ -L-рамнозидаза *E. erubescens* – тільки до *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду, а *C. albidus* – до *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозиду.

$\alpha$ -L-Рамнозидаза *C. albidus* гідролізує нарингін ( $K_m$  0,77 мМ), а також *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид ( $K_m = 10$  мМ) з дуже великою різницею значень  $K_m$ . Така суттєва різниця в значеннях  $K_m$  свідчить про високу спорідненість до нарингину і неспецифічну активність до *n*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозиду. Оскільки, як показано нами раніше [13, 14], на різних стадіях очистки піки  $\alpha$ -L-рамнозидазної і  $\beta$ -D-глюкозидазної активності збігаються, а за результатами електрофорезу спостерігається одна полоска, можна припустити, що це один ензим.

Препарат  $\alpha$ -L-рамнозидази *E. erubescens* виявляє більшу спорідненість до синтетичного субстрату – *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду (таблиця, рис. 4) ( $K_m$  становить 1,0 мМ,  $V_{\max}$  120 мкмоль/хв·мг протеїну), ніж до природних: нарингину та неогесперидину ( $K_m$  становить 5,0 та 3,0 мМ,  $V_{\max}$  50 та 25 мкмоль/хв·мг протеїну відповідно).

Більша спорідненість глікозидаз до синтетичних субстратів є характерною особливістю ензимів, виділених з мікроміцетів.

Згідно з даними літератури [20] значення  $K_m$  для  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Bacteroides* JY-6, *Pseudomonas paucimobilis* FP2001, *Fusobacterium* K-6, *Clostridium stercorarium*, *Pichia angusta* X349, *Aspergillus niger*, *A. aculeatus* знаходились в межах: 0,057–2,8 мМ – для *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнозиду, 0,021–1,9 мМ – нарингину, 0,02–1,3 мМ – гесперидину, 0,028–1,44 мМ – рутину, 0,077–0,89 мМ – кверцитрину, 0,02–0,93 мМ – понцирину. Вивчення субстратної специфічності  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Penicillium commune* [21] показало, що ензим 1 виявляє широку субстратну специфічність і здатний відщеплювати  $\beta$ -D-глюкозу,  $\beta$ -D-ксилозу,  $\alpha$ -D-манозу,  $\alpha$ -D-галактозу, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамін від відповідних *n*-нітрофенільних субстратів, в той час як  $\alpha$ -L-рамнозидаза 2 характеризується вузькою субстратною специфічністю, гідролізуючи тільки *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид. Обидва ензими виявляли високу спорідненість до природних субстратів: нарингину і неогесперидину. Так,  $K_m$  дорівнює 1,7 та 1,6 мМ для рамнозидази 1 та 1,32 і 1,95 мМ – для рамнозидази 2 відповідно для нарингину та неогесперидину. Але  $\alpha$ -L-рамнозидази 1 і 2 ви-

Субстратна специфічність препаратів  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens*

Субстрат	$\alpha$ -L-Рамнозидази					
	<i>C. albidus</i>			<i>E. erubescens</i>		
	Питома активність, од./мг протеїну	$V_{\max}$ , мкмоль/хв·мг протеїну	$K_m$ , мМ	Питома активність, од./мг протеїну	$V_{\max}$ , мкмоль/хв·мг протеїну	$K_m$ , мМ
<i>n</i> -Нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозид	—	0	—	120	120	1,0
<i>n</i> -Нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкоопіранозид	3,9	5	10	—	0	—
<i>n</i> -Нітрофеніл- $\alpha$ -D-галактозид	—	0	—	—	0	—
<i>n</i> -Нітрофеніл- $\beta$ -D-галактозид	—	0	—	—	0	—
<i>n</i> -Нітрофеніл-N-ацетил- $\alpha$ -D-глюкозамінід	—	0	—	—	0	—
<i>n</i> -Нітрофеніл-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінід	—	0	—	—	0	—
<i>n</i> -Нітрофеніл- $\alpha$ -D-глюкозид	—	0	—	—	0	—
<i>n</i> -Нітрофеніл- $\alpha$ -D-фукозид	—	0	—	—	0	—
<i>n</i> -Нітрофеніл- $\beta$ -D-ксилозид	—	0	—	—	0	—
<i>n</i> -Нітрофеніл- $\beta$ -D-манозид	—	0	—	—	0	—
Нарингін	12,5	36	0,77	120	50	5,0
Неогесперидин	6,8	10	3,3	20,3	25	3,0

являли меншу спорідненість до *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду порівняно з ензимом *E. erubescens*: значення  $K_m$  2,97; 2,81 і 1,0 мМ відповідно.

Новий тип флавоноїдної  $\alpha$ -L-рамнозидази, що гідролізує, крім нарингину і гесперидину, також і рутин, був ізольований з *A. niger* DLFCC-90 [3]. Цей ензим характеризується широкою субстратною специфічністю, гідролізує не тільки  $\alpha$ -1,2-, але і  $\alpha$ -1,6-зв'язану L-рамнозу.

Для того, щоб дати відповідь на питання, чому і як ензим діє на той чи інший субстрат, слід розглядати питання щодо специфічності дії на молекулярному рівні. Але, на жаль, взаємозв'язок між механізмом та специфічністю дії глікозидаз, з одного боку, будовою і властивостями їхніх активних

центрів, з іншого боку, значною мірою поки що залишається нез'ясованим.

З огляду на те, що встановлено здатність  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* та *E. erubescens* гідролізувати природні субстрати нарингін і неогесперидин, можна припустити можливості їх подальшого практичного використання. Так, оскільки  $\alpha$ -L-рамнозидазу застосовують для усунення гіркоти, обумовленої наявністю нарингину в цитрусових, які використовуються для одержання соків, в яких концентрація глюкози досягає 500 мМ, нами було проведено дослідження щодо виявлення впливу глюкози на  $\alpha$ -L-рамнозидазну активність (рис. 5).

Показано, що у разі наявності в реакційному середовищі до 500 мМ глюкози обидва ензими знижують активність на 20–22%. Згідно з даними літератури [22],  $\alpha$ -L-



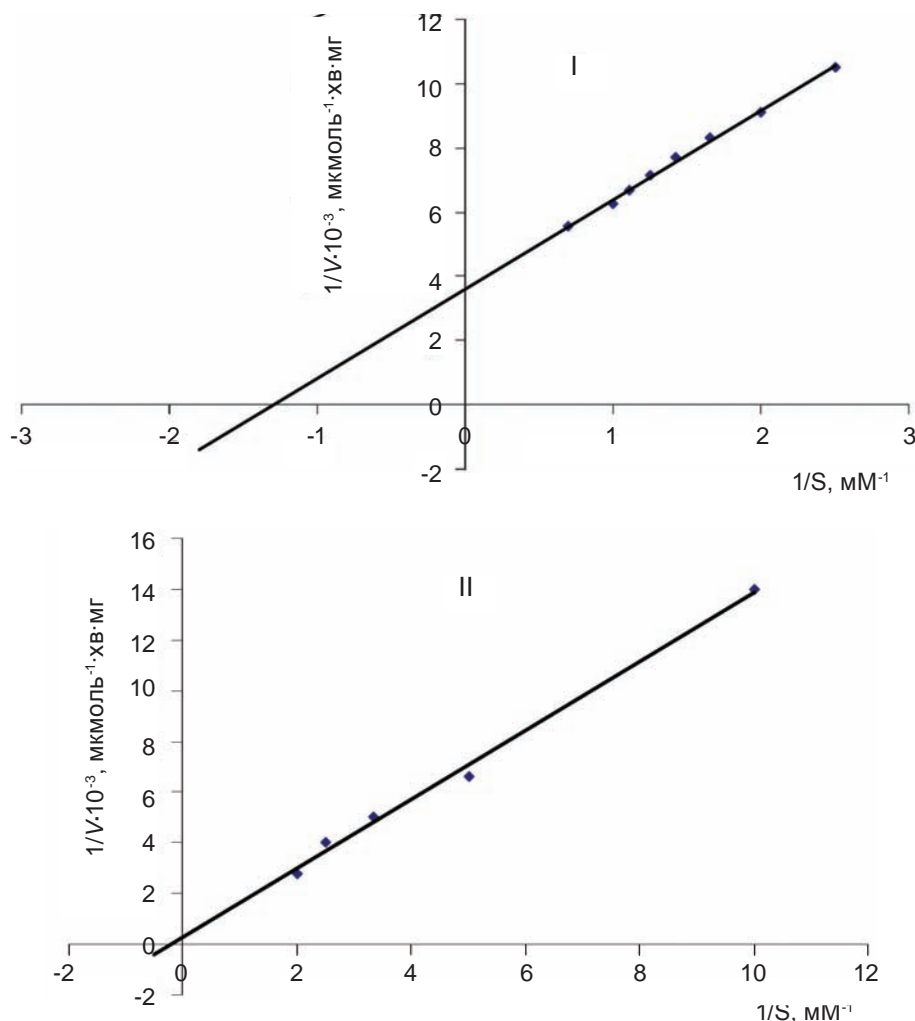


Рис. 1. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу нарингіну  $\alpha$ -L-рамнозидазами *C. albidus* (I) і *E. erubescens* (II)

рамнозидаза *Aspergillus terreus* зберігала лише 15% від початкової активності за вмісту в реакційному середовищі 300 мМ глюкози, тоді як  $\alpha$ -L-рамнозидаза *Pediococcus acidilactici* [23] зберігала 76% та 2,4% залишкової активності відповідно у разі 250 мМ вмісту глюкози. Таким чином, можна зробити висновок, що  $\alpha$ -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* мають високий потенціал використання в харчовій промисловості для усунення гіркоти цитрусових соків.

Однією з важливих характеристик якості вин є ароматичний букет, обумовлений присутністю монотерпенів, наявних у винограді, які мають бути гідролізовані  $\alpha$ -L-рамнозидазою. Оскільки у винах міститься певний відсоток етанолу, доцільним було перевірити його вплив на активність ензимів. Встановлено (рис. 6), що  $\alpha$ -L-рамнозидаза

*C. albidus* зберігає до 75% активності за наявності в реакційній суміші до 20% етанолу.

Аналогічні дані було одержано також для  $\alpha$ -L-рамнозидаз дріжджових продуцентів *Pichia angusta* [24] і *P. acidilactici* [23], які зберігали відповідно 31 і 73% активності у разі 12%-го вмісту етанолу.

Що стосується  $\alpha$ -L-рамнозидази *E. erubescens*, то вона виявилась стабільною до 20%-ї концентрації етанолу, більш того, за цієї концентрації етанолу він навіть активує дію ензиму (рис. 6, II), що показано нами вперше.

Таким чином, препарати  $\alpha$ -L-рамнозидаз *E. erubescens* і *C. albidus* здатні гідролізувати природні субстрати: нарингін та неогесперидин, що свідчить про їхню специфічність до  $\alpha$ -1,2-зв'язаної L-рамнози. Це становить безсумнівний інтерес, оскільки чим вузькішу специфічність виявляє ензим, тим більшу

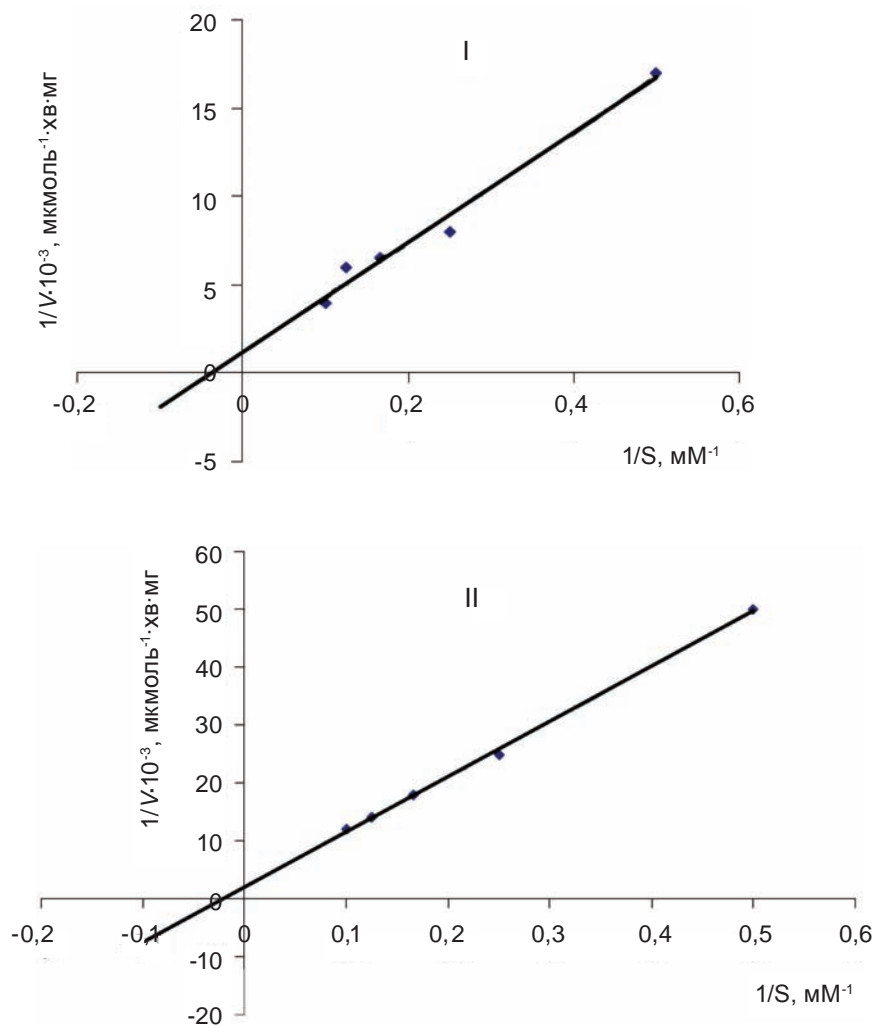


Рис. 2. Графіки Лайнуївера–Берка гідролізу неогесперидину  $\alpha$ -L-рамнозидазами *C. albidus* (I) і *E. erubescens* (II)

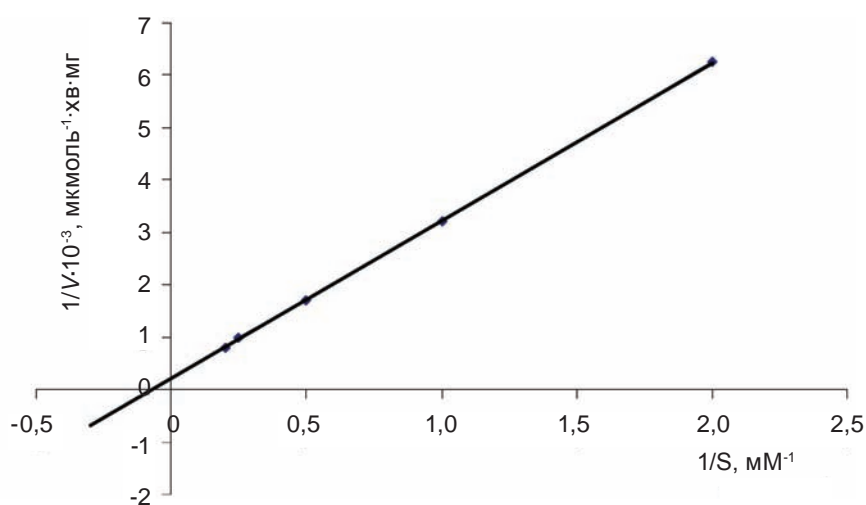


Рис. 3. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу *p*-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозиду  $\alpha$ -L-рамнозидазою *C. albidus*

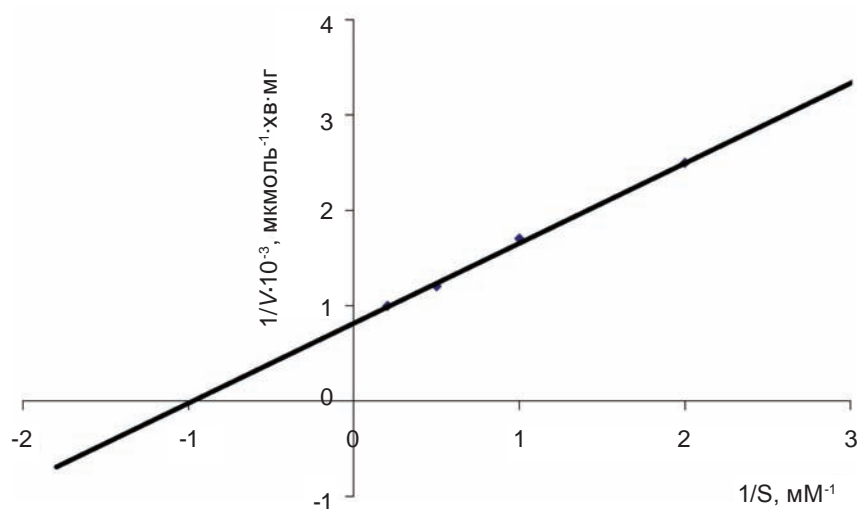


Рис. 4. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу *n*-нітрофеніл- $\alpha$ -L-рамнопіранозиду  $\alpha$ -L-рамнозидазою *E. erubescens*

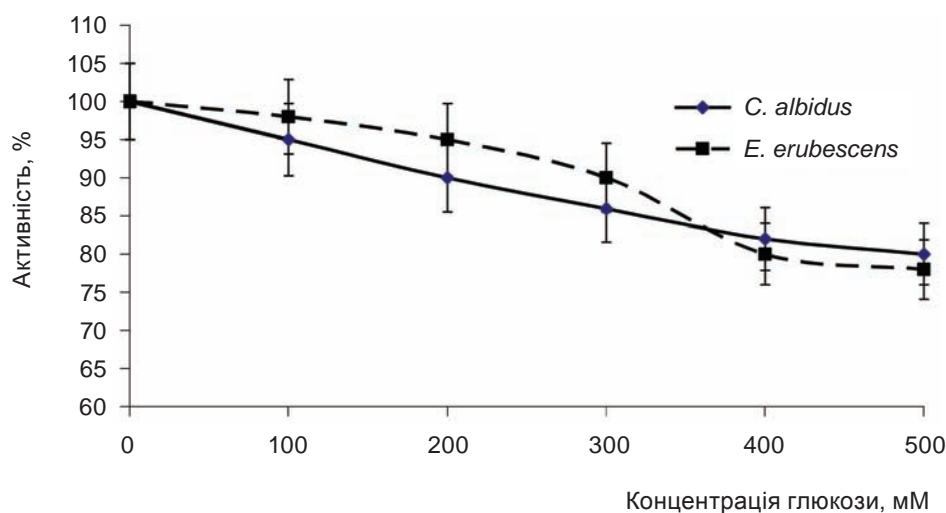


Рис. 5. Вплив глюкози на активність  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens*

цінність він має як тонкий та надзвичайно точний інструмент біохімічних досліджень. На основі встановленої субстратної специфічності можна прогнозувати використання  $\alpha$ -L-рамнозидаз *E. erubescens* і *C. albidus* в різних галузях промисловості, зокрема в харчовій, і медицині. Це підтверджується також тим, що досліджувані  $\alpha$ -L-рамнозидази виявились стабільними у разі 20%-ї концентрації етанолу та 500 мМ глюкози в реакційній суміші.

Порівняльний аналіз  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens*, представників різних таксономічних груп мікроорганізмів – мікроміцетів і дріжджів показав, що вони відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями [13, 14], субстратною специфічністю. Такі дослідження в майбутньому дозволять зрозуміти, як структурно-функціональні різноманітності ензимів в один і той же час можуть поєднуватись з універсальністю механізму їх каталітичної дії.

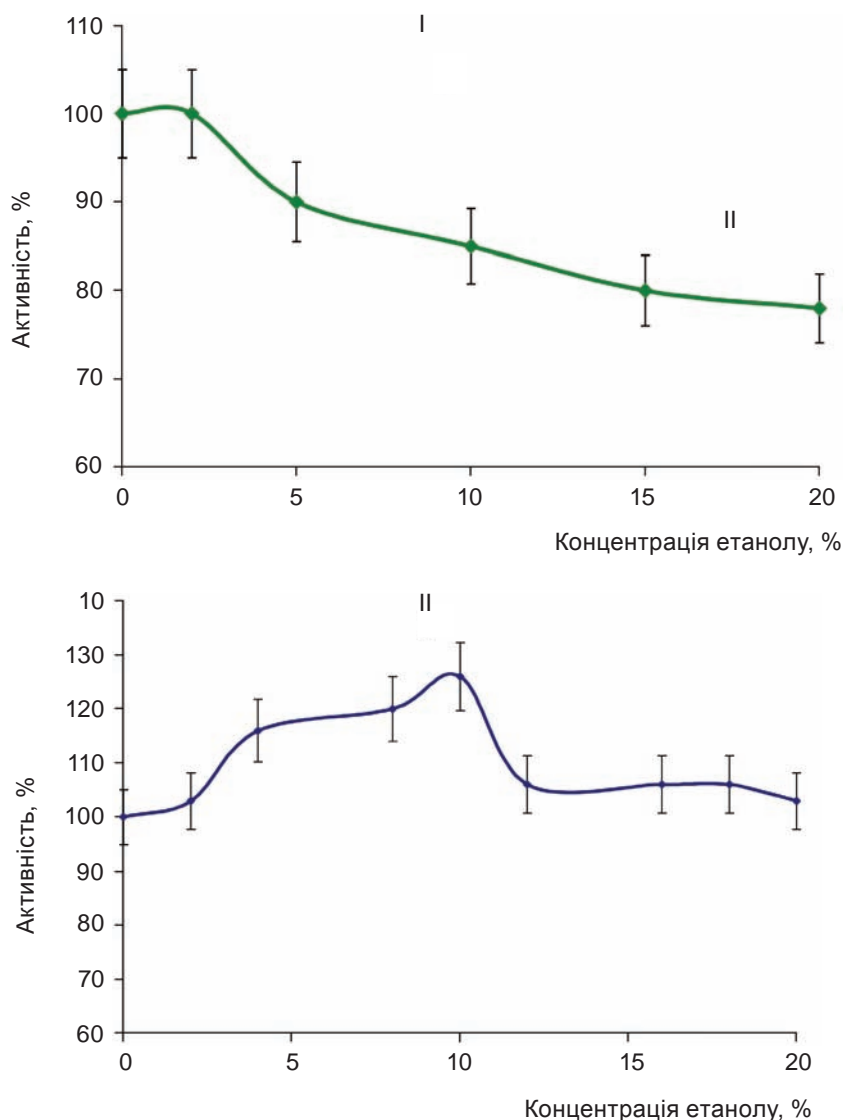


Рис. 6. Вплив етанолу на активність  $\alpha$ -L-рамнозидаз *C. albidus* (I) і *E. erubescens* (II)

### СУБСТРАТНА СПЕЦИФИЧНОСТЬ $\alpha$ -L-РАМНОЗИДАЗ *Cryptococcus albidus* И *Eupenicillium erubescens*

Е. В. Гудзенко, Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им.  
Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев;  
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Исследована субстратная специфичность  $\alpha$ -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* и *Eupenicillium erubescens*. Показано, что энзимы способны действовать на синтетические и природные субстраты (нарингин, неогесперидин).  $\alpha$ -L-Рамнозидазы гидролизовали последние достаточно эффективно, при этом препарат, полученный из *E. erubescens*, характеризуется более высокими значениями  $V_{\max}$ , чем эн-

зим *C. albidus*. В то же время  $\alpha$ -L-рамнозидаза *C. albidus* проявляет большее сродство к нарингину и неогесперидину, чем энзим *E. erubescens* ( $K_m$  0,77 и 3,3 мМ та 5,0 и 3,0 мМ соответственно). По отношению к синтетическим производным моносахаридов, оба энзима проявляют узкую специфичность к природе гликона:  $\alpha$ -L-рамнозидаза *E. erubescens* — ускоряет расщепление только *n*-нитрофенил- $\alpha$ -L-рамнопиранозида ( $K_m$  1,0 мМ с  $V_{\max}$  120 мкмоль/мин/мг протеина), а *C. albidus* — лишь *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида ( $K_m$  10 мМ,  $V_{\max}$  5 мкмоль/мин/мг протеина). Таким образом, установлено, что энзимным препаратам *E. erubescens* и *C. albidus* присуща весьма узкая субстратная специфичность. Способность препаратов  $\alpha$ -L-рамнозидаз *E. erubescens* и *C. albidus* гидролизовать при-



родные субстраты: нарингин и неогесперидин свидетельствует о специфичности к  $\alpha$ -1,2-связанной L-рамнозе. На основании этих данных можно прогнозировать использование  $\alpha$ -L-рамнозидаз *E. erubescens* и *C. albidus* в различных отраслях промышленности, в частности пищевой. Это подтверждается также тем, что исследуемые  $\alpha$ -L-рамнозидазы оказались стабильными в присутствии 20% этанола и 500 мМ глюкозы в реакционной смеси.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -L-рамнозидаза, *Cryptococcus albidus* и *Eupenicillium erubescens*, нарингин, неогесперидин, субстратная специфичность, влияние этанола и глюкозы на активность  $\alpha$ -L-рамнозидазы.

### SUBSTRATE SPECIFICITY OF *Cryptococcus albidus* AND *Eupenicillium erubescens* $\alpha$ -L-RHAMNOSIDASES

*E. V. Gudzenko, L. D. Varbanets*

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The substrate specificity of *Cryptococcus albidus* and *Eupenicillium erubescens*  $\alpha$ -L-rhamnosidases has been investigated. It is shown that the enzymes are able to act on synthetic and natural substrates, such as naringin, neohesperidin.  $\alpha$ -L-Rhamnosidases hydrolysed the latter ones very efficiently, in this case *E. erubescens* enzyme was characterized by higher values of  $V_{\max}$  in comparison with the enzyme of *C. albidus*. However the *C. albidus*  $\alpha$ -L-rhamnosidase showed greater affinity for naringin and neohesperidin than the enzyme of *E. erubescens* ( $K_m$  0.77 and 3.3 mM and 5.0 and 3.0 mM, respectively). As regards the synthetic derivatives of monosaccharides, both enzymes exhibited narrow specificity for glycon: *E. erubescens*  $\alpha$ -L-rhamnosidase – only to the *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside ( $K_m$  1.0 mM,  $V_{\max}$  120  $\mu$ mol/min/mg protein), and *C. albidus* – to *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $K_m$  10 mM,  $V_{\max}$  5  $\mu$ mol/min/mg protein). Thus, it was found that the enzyme preparations of *E. erubescens* and *C. albidus* are differed by their substrate specificity. The ability of *E. erubescens* and *C. albidus*  $\alpha$ -L-rhamnosidases to hydrolyse natural substrates: naringin and neohesperidin, evidences for their specificity for  $\alpha$ -1,2-linked L-rhamnose. Based on these data, we can predict the use of *E. erubescens* and *C. albidus*  $\alpha$ -L-rhamnosidases in various industries, food industry in particular. This is also confirmed by the fact that the investigated

$\alpha$ -L-rhamnosidases were stable at 20% concentration of ethanol and 500 mM glucose in the reaction mixture.

**Key words:**  $\alpha$ -L-rhamnosidase, *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, naringin, neohesperidin, substrate specificity, effect of glucose and ethanol on activation of  $\alpha$ -L-rhamnosidases.

1. Henrissat B. // Biochem. J. – 1991. – **280**, Pt. 2. – P. 309–316.
2. Henrissat B., Davies G. J. // Curr. Op. Struct. Biol. – 1997. – **7**, N 5. – P. 637–644.
3. Liu T., Yu H., Zhang C. et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – **78**, N 13. – P. 4752–4754.
4. González-Barrio R., Trindade L. M., Manzanares P. et al. // J. Agric. Food. Chem. – 2004. – **52**, N 20. – P. 6136–6142.
5. Tacatsu T., Takahashi S., Tacamatsu Y. et al. // J. Antibiot. (Tokyo). – 1987. – **40**, N 7. – P. 941–945.
6. Yadav V., Yadav Pramod K., Yadav S. et al. // Process Biochemistry. – 2010. – **45**, N 8. – P. 1226–1235.
7. Soria F., Ellenrieder G., Oliveira G. B. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – **93**, N 3. – P. 1127–1134.
8. Del Nobile M. A., Piergiovanni L. // J. Food Sci. – 2003. – **68**, N 6. – P. 2046–2049.
9. Lazzaro A. Di., Morana A., Schiraldi C. et al. // J. Mol. Catalysis B: Enzymatic. – 2001. – **11**. – P. 307–314.
10. Варбанець Л. Д., Борзова Н. В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – К: Наук. думка, 2010. – 437 с.
11. Erlund I. // Nutr Res. – 2004. – **24**, N 10. – P. 851–874.
12. Гудзенко О. В., Борзова Н. В., Варбанець Л. Д. // Мікробіол. журн. – 2011. – **73**, № 3. – С. 46–53.
13. Гудзенко О. В., Варбанець Л. Д. // Там само. – 2012. – **74**, № 2. – С. 14–21.
14. Гудзенко О. В., Варбанець Л. Д. // Там само. – № 6. – С. 16–23.
15. Romero C., Manjon A., Bastida J., Iborra J. L. // Anal. Biochem. – 1985. – **149**, N 2. – P. 566–571.
16. Davis D. W. // Anal. Biochem. – 1947. – **19**, N 1. – P. 46–48.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. // J. Biol. Chemistry. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
18. Диксон М., Уэбб Л. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – С. 235.
19. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 325 с.

20. *Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M.*  $\alpha$ -L-rhamnosidase: old and new insights // *Industrial Enzymes*, Springer, 2007. — P. 117–140.
21. *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.
22. *Abbate E., Palmeri. R., Todaro A. et al.* // *Chem. Eng. Trans.* — 2012. — N 27. — P. 253–258.
23. *Michlmayr H., Brandes W., Eder R. et al.* // *Appl. Environ. Microbiology.* — 2011. — 77, N 18. — P. 6524–6530.
24. *Yanai T., Sato M.* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2000. — 64, N 10. — P. 2179–2185.

Отримано 14.03.2013