

УДК 577.15:577.152.3

МІКРОБНІ α -L-РАМНОЗИДАЗИ: ПРОДУЦЕНТИ, ВЛАСТИВОСТІ, ПРАКТИЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ

О. В. ГУДЗЕНКО, Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Отримано 23.02.2012

Огляд присвячено α -L-рамнозидазам, які гідролітично відщеплюють кінцеві невідновлені α -1,2-, α -1,4- та α -1,6-зв'язані залишки L-рамнози в α -L-рамнозидах. Розглянуто методи визначення α -L-рамнозидазної активності за допомогою як природних, так і синтетичних субстратів. Ці ензими знайдено в організмах рослин, тварин, дріжджів, грибів і бактерій. Показано, що найактивнішими біосинтетиками є мікроміцети. Описано методи виділення та очищення α -L-рамнозидаз мікробного походження, які включають осадження ензиму з розчинів органічними розчинниками та нейтральними солями, діаліз, ультрафільтрацію, гель-фільтрацію, іонообмінну та афінну хроматографію. Узагальнено дані щодо фізико-хімічних властивостей (рН-оптимуму, термооптимуму, молекулярної маси) та субстратної специфічності α -L-рамнозидаз. Встановлено, що ензимні препарати, які отримували з одних і тих самих продуцентів під час культивування їх у присутності різних індукторів, виявляли різну субстратну специфічність. Показано, що α -L-рамнозидази належать до глікозилгідролаз з каталітичними доменом $(\alpha/\alpha)_6$ -барель. Біотехнологічні властивості ензиму спрямовано на використання в харчовій, фармацевтичній і хімічній промисловості. У харчовій промисловості α -L-рамнозидази застосовують для поліпшення якості напоїв (зменшення гіркоти, підсилення аромату вин) та у виробництві харчових добавок; у фармацевтичній — для отримання багатьох лікарських засобів, а також їхніх попередників; у хімічній — як попередник для виробництва рамнози.

Ключові слова: α -L-рамнозидаза, продуценти мікробного походження, фізико-хімічні властивості, субстратна специфічність, практичне використання.

Сучасні промислові біотехнологічні компанії приділяють велику увагу розробленню нових ензимів для впровадження їх у різні сфери виробництва. Серед цих ензимів важливе місце посідає α -L-рамнозидаза, яка характеризується специфічністю щодо термінальних залишків рамнози, що присутні в природних глікокон'югатах та синтетичних глікозидах. 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 з противірусною та імунотропною дією. Для вияву біологічної дії деяких із цих препаратів необхідна наявність рамнози, в інших випадках — її відщеплення.

На сьогодні ензимні технології становлять альтернативу хімічним процесам, оскільки за їх участю можна зменшити витрати енергії та матеріалів, мінімізувати витрати й виділення тепла. Тому α -L-рамнозидази набули такого широкого застосуван-

ня в харчовій, фармацевтичній та хімічній промисловості.

α -L-рамнозидаза (α -L-рамнозид-рамногідролаза — К.Ф. 3.2.1.40) гідролітично відщеплює кінцеві невідновлені α -1,2-, α -1,4- та α -1,6-зв'язані залишки L-рамнози в α -L-рамнозидах. Розщеплення O-глікозидного зв'язку відбувається зі збереженням конфігурації аномального атома вуглецю (C_1 у циклічній формі моносахариду).

L-рамноза є компонентом пектинових полісахаридів [1], глікопротеїнів [2], вторинних метаболітів, таких як антоціаніни [3], флавоноїди [4] і тритерпеноїди [5]. Її також знайдено в бактеріальних гетерополісахаридах [6], рамноліпідах [7] та ліпополісахаридах зовнішніх бактеріальних мембран [8]. Рамноза є важливим біоактивним компонентом цитотоксичних сапонінів [9,10], протигрибних рослинних глікоалкалоїдів [11] і факторів вірулентності бактерій [12]. У рослинах L-рамнозовмісні терпенові глікозиди можуть відігравати протективну

роль щодо вільних агліконів [13]. L-рамнозовмісні флавоноїдні глікозиди мають антиоксидантні та протизапальні властивості [14].

α -L-рамнозидази було виявлено в багатьох мікроорганізмах, а також деяких рослинних і тваринних тканинах, тоді як β -L-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.43) описано лише в *Klebsiella aerogenes* [15].

Традиційна номенклатура глікозидаз ґрунтується на субстратній специфічності й лише іноді враховує молекулярний механізм їхньої дії. Накопичення даних щодо первинної структури глікозидаз дало підставу запропонувати нову класифікацію на основі гомології амінокислотних послідовностей [16]. Ця класифікація на сьогодні налічує понад 100 родин. В основному α -L-рамнозидази належать до родини 78, винятком є ензим *Sphingomonas paucimobilis*, який віднесено до родини 106 [17]. Ендорамнозидази, які містять бактеріофаг Sf6, належать до родини 90 [18].

На цей час відома 71 α -L-рамнозидаза, ізольована з бактерій, дріжджів та мікроміцетів. Як свідчать дані літератури [19], α -L-рамнозидаза не є життєво необхідною для мікроорганізмів, оскільки за відсутності у них активного внутрішньоклітинного або позаклітинного ензиму спостерігається нормальний цикл їх розвитку, тобто фактор синтезу і секреції ензиму в культуральну рідину у цих мікроорганізмів невідомий. Однак незаперечним є той факт, що у мікроорганізмів, які живуть на середовищах зі вмістом специфічних субстратів — індукторів ензиму, α -L-рамнозидаза бере участь в обміні речовин, деградує ці субстрати до більш простих і доступних для подальшого катаболізму в клітині з метою одержання необхідних структурних елементів і хімічної енергії. Не виключають її роль у процесах синтезу та деградації таких компонентів клітинних оболонок, як гліколіпіди, глікопротеїни та інші рамнозовмісні сполуки. Це припущення тим більш очевидне, що в природних умовах цей ензим найчастіше трапляється в тих еконішах, де інтенсивніше здійснюється перебіг метаболічних процесів [19].

Методи визначення активності α -L-рамнозидази

α -L-рамнозидазну активність визначають колориметричним методом Шомоді та Нельсона [20, 21], а також HPLC [22] за кількістю утвореної рамнози. Визначаючи активність α -L-рамнозидази цими методами, використовують різні природні субстра-

ти: нарингін, понцирин, неогесперидин, рутин, гесперидин, сайкосапонін, азіатикозид, кверцитрин і просциларидин А. У разі визначення активності α -L-рамнозидази методом Ромега [23] застосовують синтетичні хромогенні субстрати, *n*-нітрофенільні похідні, зокрема *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозид. На рис. 1 наведено реакцію гідролізу *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозиду α -L-рамнозидазою.

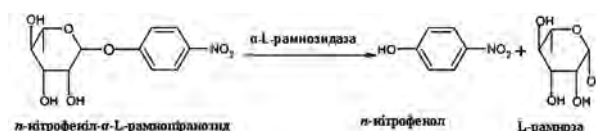


Рис. 1. Гідроліз *n*-нітрофенільного синтетичного субстрату за дії α -L-рамнозидази

Відомо [6], що спорідненість ензиму стосовно природних флавоноїдних рамноглікозидів вища, ніж щодо синтетичних субстратів. За використання L-рамнозовмісних флавоноїдів величини K_m були набагато нижчими, ніж на *n*-нітрофенільному субстраті. Тому для визначення активності α -L-рамнозидази найчастіше як субстрат застосовують нарингін, який є більш доступним і дешевим (на відміну від синтетичних) природним субстратом [24] і містить, крім L-рамнози, також D-глюкозу. α -L-рамнозидаза розщеплює нарингін на термінальну L-рамнозу та прунін (рис. 2, а). За допомогою β -D-глюкозидази, яка часто міститься разом з α -L-рамнозидазою, прунін перетворюється на нарингенін і глюкозу (рис. 2, б). Нарингенін має більш виражене забарвлення порівняно з нарингіном.

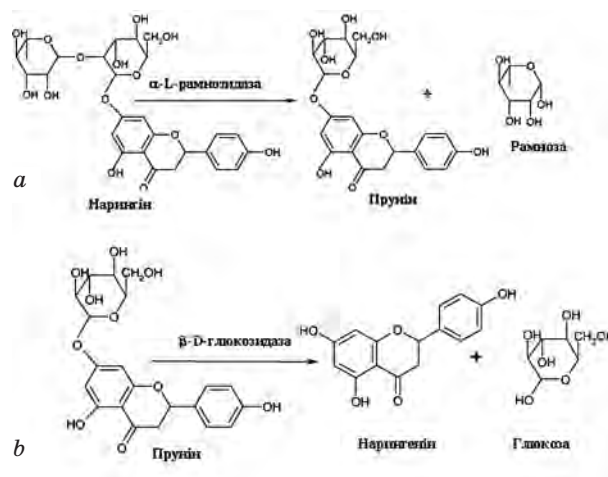


Рис. 2. Гідроліз α -L-рамнозидазою нарингину до пруніну (а) та β -D-глюкозидазою пруніну до нарингеніну (б) [6]

Продуценти α -L-рамнозидаз

Незважаючи на те, що α -L-рамнозидази знаходять в тканинах тварин (морських молюсків *Turbo cornutus* [25], свиней [26]), рослин (*Rhamnus daurica* [27] і *Fagopyrum esculentum* [28]), найбільш технологічними джерелами їх одержання є мікроорганізми, оскільки вони здатні надзвичайно швидко розмножуватись та здійснювати синтез в умовах, контрольованих людиною.

Показано [29], що в разі використання індукторів, таких як L-рамноза, нарингін, рутин, гесперидин, α -L-рамнозидазу продукують *Acremonium persicinum* CCF 1850, *Aspergillus aculeatus* CCF 108, *A. aculeatus* CCF 3134, *A. aculeatus* CCF 3138, *A. niger* CCIM K2, *A. terreus* CCF 3059, *Circinella muscae* CCF 2417, *Emericella nidulans* CCF 2912, *Eurotium amstelodami* CCF 2723, *Fusarium oxysporum* CCF 906, *Mortierella alpine* CCF 2514, *Mucor circinelloides griseo-cyanus* CCIM, *Penicillium oxalicum* CCF 2430, *Rhizopus arrhizus* CCF 100, *Talaromyces flavus* CCF 2686, *Trichoderma harzianum* CCF 2687, *Rhizopus nigricans* [30–37]. Показано, що *Curvularia lunata* [38] та деякі мезофільні грибні штами (*Aspergillus flavus*, *Mucor racemosus*, *Fusarium sambucinum*, *A. kawachii*, *Penicillium aureatiogriseum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Fusarium solani*) є продуцентами α -L-рамнозидаз [39]. Наявність α -L-рамнозидазної активності у фітопатогенних грибів вперше описано для патогена вівса *Corticium rolfsii* [40] і зернового патогена *Stagonospora avenae* [41]. Дуже специфічні α -L-рамнозидази, що здатні деградувати різні сапоніни, знайдено в *Absidia* sp. [42] і *Plectosphaerella cucumerina* [11].

Найбільше досліджено біохімічні характеристики грибних α -L-рамнозидаз *Aspergillus terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. aculeatus* [29], *Penicillium* sp., *P. decumbens* [43], на основі яких створено комерційні препарати (нарингіназа — *Penicillium* sp., *P. decumbens*, гесперидиназа — *A. niger*, фірма Sigma-Aldrich, США).

Низький рівень α -L-рамнозидазної активності виявлено у дріжджових штамів *Oenococcus oeni*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansula anomala*, *Debaryomyces hansenii* [44]. Але ефективним продуцентом α -L-рамнозидази виявилась лише *Pichia angusta* X349 [45].

Продуктування α -L-рамнозидаз бактеріями описано для родів *Bacteroides* і *Fusobacterium* K-60, [46, 47], а також *Sphingomonas paucimobilis*, *Bacillus* sp. [48, 49], термофільних бактерій *Clostridium stercorarium*

[50] і *Thermomicrobia* sp. [51]. Деякі штами *Pseudoalteromonas* sp. і *Ralstonia pickettii*, які отримано з морської води Антарктики, виявляли α -L-рамнозидазну активність у діапазоні температур від -1 до $+8^{\circ}\text{C}$ [52]. Відомі нечисленні продуценти з *Lactobacillus* sp. [53, 54].

Таким чином, на сьогодні накопичено чимало відомостей про бактеріальні, грибні та дріжджові культури мікроорганізмів, які здатні синтезувати α -L-рамнозидазу. Однак найактивнішими біосинтетиками цього ензиму є мікроміцети, рівень активності їхніх продуцентів становив 1,8–230 Од/мл, що перевищує рівень бактеріальних (0,02–2,0 Од/мл) і дріжджових (0,1–8,0 Од/мл) культур. Нині найперспективнішими вважають такі грибні продуценти: *Absidia* sp. [42], *Aspergillus terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. aculeatus*, *A. flavus*, [29], *Penicillium* sp., *P. decumbens* [43].

Виділення та очищення α -L-рамнозидаз

Отримання високоактивних ензимів у гомогенному стані — надзвичайно складне завдання, оскільки містить низку етапів, на яких необхідно контролювати зміни їхньої активності, аби уникнути значних втрат. Поряд із цим для кожного продуцента потрібно розробляти свою, індивідуальну послідовність етапів одержання високоочищеного препарату ензиму. На сьогодні існує декілька схем отримання α -L-рамнозидази, які передбачають різні підходи до очищення та концентрування ензиму залежно від внутрішньоклітинного чи позаклітинного походження:

- відділення клітинної біомаси від культуральної рідини, яке здійснюється методами фільтрації, сепарування (екстрагування водою або іншими розчинниками — для внутрішньоклітинних продуцентів), центрифугування;
- очищення та концентрування розчинів, що містять ензим, за допомогою вакуум-упарювання, виморожування, осадження ензиму з розчинів органічними розчинниками та нейтральними солями, діаліз, ультрафільтрація, гель-фільтрація, іонообмінна та афінна хроматографія.

α -L-рамнозидазу, виділену з печінки морського членистоногого *T. cornutus*, очищено до гомогенного стану за допомогою колонкової хроматографії на КМ целюлозі і Sephadex G-150, теплової обробки та заморожування за кислого рН [25]. Очищення α -L-рамнозидази, ізольованої з печінки свиней,

включало: гомогенізацію печінки в буфері, фракціонування сульфатом амонію, діаліз та іонообмінну хроматографію на DEAE-целюлозі [26]. Очищення α -L-рамнозидази, виділеної з насіння гречихи *F. esculentum*, передбачало стадії отримання неочищеного екстракту, фракціонування сульфатом амонію, хроматографію на колонках Sephadex G-75, DEAE-Sephadex та Ultrogel AcA-44. Гомогенність ензиму підтверджено електрофорезом у ПААГ [28].

За даними літератури [6, 12, 30], більшість α -L-рамнозидаз бактеріального походження є внутрішньоклітинними. Так, α -L-рамнозидазу *Bacteriodes* JY-6, виділену з кишкової мікробіоти людини, очищено від інших глікозидів відділенням бактеріальних клітин, суспендуванням їх у 20 мМ фосфатному буфері, pH 7, ультразвуковою обробкою, фракціонуванням сульфатом амонію, колонковою хроматографією на DEAE-целюлозі, Silica-PAE, Sephacryl S-300 і гідроксіапатиті [46]. Для α -L-рамнозидази *Fusobacterium* K-60, також виділеної з кишкової мікробіоти людини, очищення включало розділення бактерій ультразвуком, фракціонування сульфатом амонію, колонкову хроматографію на Butyl-Toyopearl, оксіапатиті, Sephacryl S-300 і Q-Sepharose [47]. Авторами [48] здійснено очищення α -L-рамнозидази *Bacillus* sp. GL 1 руйнуванням клітин ультразвуком, фракціонуванням сульфатом амонію, колонковою хроматографією на DEAE-Sepharose CL-6B, Butyl-Toyopearl 650M, Sephacryl S-200HR і QAE-Sephadex A-25. У літературі [55, 56] є відомості щодо очищення і властивостей внутрішньоклітинної α -L-рамнозидази *Pseudomonas paucimobilis* FP2001. Очищено термостабільну α -L-рамнозидазу Ram A із *C. stercorarium* [50]. Beekwilder зі співавт. [53] очистили α -L-рамнозидази *Lactobacillus plantarum* і *L. acidophilus*. Проведено експресію α -L-рамнозидаз із генів *L. plantarum* NCC 245 в *Escherichia coli* з подальшим очищенням [54].

Також внутрішньоклітинною є α -L-рамнозидаза, виділена з дріжджів *P. angusta* X349, яку очищено до гомогенного стану осадженням сульфатом амонію, колонковою хроматографією на конканавалін A-Sepharose, DEAE Bio Gel A агарозі, Rhamnose-Sepharose 6B та оксіапатиті [45].

Відомо [55, 57], що більшість глікозидаз мікроміцетів є глікопротеїнами і виділяються в процесі розвитку продуцента в культуральну рідину, тобто є позаклітинними ензимами. Вони характеризуються низкою

переваг порівняно з внутрішньоклітинними, одна з яких — відсутність трудомісткого процесу руйнування клітин продуцента.

Очищення α -L-рамнозидази з культуральної рідини *A. terreus* CECT-2663, вирощеного з використанням рамнози або нарингіну як єдиного джерела вуглецю, охоплювало осадження сульфатом амонію, іонообмінну хроматографію на DEAE-Sepharose CL-6B, гель-фільтрацію на Sephadex G-200 [58]. α -L-рамнозидазу очищено з культурального фільтрату *A. nidulans* CECT 2544, вирощеного з використанням рамнози як індуктора, комбінацією адсорбції на DEAE A-50, Hi Load 16/10 Q-Sepharose FF, Hi Load 26/S Sepharose FF, а також гель-фільтрацією на Superose 12 HR 10/30 [35].

Manzanares зі співавт. [34] очистили різні α -L-рамнозидази RhaA і RhaB з культурального фільтрату *A. aculeatus*, вирощеного на гесперидині, з використанням катіонообмінної хроматографії і гель-фільтрації. Очищення й характеристика α -L-рамнозидази гриба *Absidia* sp. (EECDL-39) включала відділення міцелію від культурального фільтрату, фракціонування сульфатом амонію і хроматографію на Bioscale Q-2 BioRad [42]. Feng зі співавт. [38] очистили осадженням сульфатом амонію, гель-фільтрацією, катіоно- і аніонообмінною хроматографією рамнозидазу *C. lunata*, активну стосовно сапоніну. Shanmugaprakash зі співавт. [36] повідомляли про очищення нарингінази з *A. niger* MTCC 1344, шляхом концентрування супернатанта ультрафільтрації, осадження сульфатом амонію, іонообмінної хроматографії на Q Sepharose Sephadex G-200. Koseki зі співавт. [37] очистили α -L-рамнозидазу з культурального фільтрату *A. kawachii*, вирощеного на L-рамнозі, осадженням сульфатом амонію, HPLC, іонообмінною хроматографією і гель-фільтрацією на колонках. α -L-рамнозидази *A. flavus* [59] і *Penicillium citrinum* MTCC-8897 [60] очищено з культуральних рідин ультрафільтрацією та катіонообмінною хроматографією на КМ-целюлозі.

Проте, незважаючи на значний промисловий інтерес, тільки декілька неочищених препаратів α -L-рамнозидаз (гесперидиназа та нарингіназа), які на цей час виробляють (Sigma, США), отримано з представників родів *Aspergillus* та *Penicillium*. Окрім α -L-рамнозидази вони містять β -D-глюкозидазу як супутній компонент що лімітує їх використання. Відомий комерційний препарат нарингіназа, виділений з *A. niger*, очищено

гель-фільтрацією на Q-Sepharose, Sephacryl S-200 і S-100. Інший відомий препарат з *A. aculeatus* виявляв субстратну специфічність до *p*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозиду, нарингину і гесперидину [57].

Таким чином, α -L-рамнозидази саме мікроскопічних грибів, які продукують зовнішньоклітинні ензими, заслуговують на особливу увагу біотехнологів порівняно із внутрішньоклітинними ензимами бактерій і дріжджів, які потребують значних затрат для виділення α -L-рамнозидази.

Фізико-хімічні властивості α -L-рамнозидаз

Загальні властивості очищених α -L-рамнозидаз наведено в табл. 1. Показано, що α -L-рамнозидази мають рН-оптимум від 2,0 до 11,0. Головні відмінності між грибними і бактеріальними ензимами полягають у суттєвій різниці залежності активності від рН. Грибні ензими мають рН-оптимум у кислій ділянці, тоді як бактеріальні — близькій до нейтральної або лужної. Ці характеристики уможливають використання грибних і бактеріальних ензимів у різних галузях. Так, грибні α -L-рамнозидази частіше використовують у таких процесах, як виноробство [24] і виробництво соків [45]. Бактеріальні ензими бажано застосовувати у виробництві L-рамнози шляхом гідролізу гесперидину та різних флавоноїдних глікозидів [61].

Температурний оптимум дії більшості α -L-рамнозидаз становить 40–80 °С, винятком є бактеріальна α -L-рамнозидаза *Pseudoalteromonas* sp., яка виявляла активність при 4 °С [52]. Температурний оптимум для очищеної α -L-рамнозидази *A. kawachii* становив 60 °С, у таких умовах ензим зберігав 80% від максимальної активності протягом 1 год [37].

Молекулярна маса більшості досліджених α -L-рамнозидаз — від 40 до 240 кДа (табл. 1). Водночас трапляються олігомерні форми з молекулярною масою 500 кДа [62]. На відміну від рослинних глікозидаз, які звичайно представлені двома формами (високо- та низькомолекулярними), для глікозидаз грибного і тваринного походження характерною є наявність лише однієї високомолекулярної форми, хоча у *A. aculeatus* вона мала два мономери з α -L-рамнозидазою активністю (92 і 85 кДа відповідно) [55]. Бактеріальні та дріжджові ензими нерідко складаються з двох, трьох, чотирьох мономерних одиниць і мають відповідно більшу молекулярну масу [55].

Порівняльний аналіз молекулярних мас α -L-рамнозидаз із різних продуцентів ускладнюється тим, що різні автори наводять дані молекулярної маси ензиму на основі результатів тільки одного методу, найчастіше гель-фільтрації у нативній системі, або денатуруючого електрофорезу, що не дає змоги повно охарактеризувати активну молекулу ензиму.

Вивчення складу мікробних α -L-рамнозидаз показало, що більшість досліджуваних позаклітинних ензимів є глікопротеїнами, причому відсоток вуглеводної частини істотно відрізняється у різних продуцентів (для грибних продуцентів він може становити 15–24%).

Як свідчать дані літератури [55], грибні α -L-рамнозидази — це кислі протеїни зі значенням *pI* у межах рН 4,0–6,0, оскільки у них високий вміст кислих (20–25%) і гідрофобних (до 35%) амінокислот.

Субстратна специфічність

Природними субстратами для α -L-рамнозидаз з різних джерел є α -L-рамнозовмісні флавоноїди та сапоніни рослин, глікопротеїни, камеді, смоли, пігменти, в яких залишок α -L-рамнози зв'язаний α -1,2-, α -1,4-, і α -1,6-зв'язками з β -D-глюкозидом або приєднаний безпосередньо до аглікону в положенні C₁. Ці речовини мають незначну різницю в структурі аглікону: рутин, гесперидин, нарингін, кверцитрин є похідними флавоноїдів, тимчасом як гінзенозид — це сапонін, а азіатикозид — терпеновий глікозид. L-рамноза безпосередньо зв'язана з агліконовою частиною тільки у кверцитрині, тоді як всі інші субстрати — це комплекс глікозидів, у яких L-рамноза зв'язана з β -D-глюкопіранозильною одиницею за допомогою різних типів глікозидних зв'язків: α -1,2 — у нарингіні та гінзенозиді, α -1,4 — в азіатикозиді, α -1,6 — у рутині й гесперидині (рис. 3).

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

У табл. 2 наведено дані щодо субстратної специфічності різних продуцентів

Таблиця 1. Фізико-хімічні властивості α-L-рамнозидаз, виділених із різних продуцентів

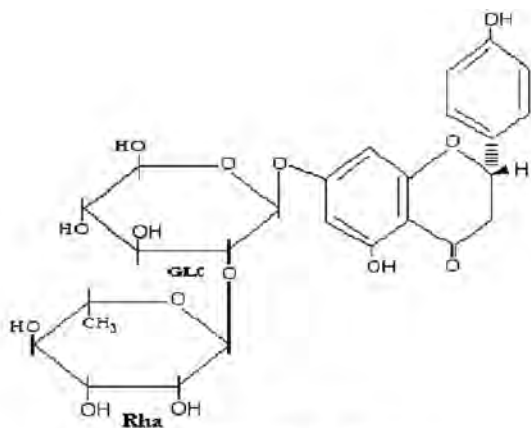
№	Продуцент	pH-оптимум	Термооптимум, °C	Молекулярна маса, кДа	pI	Література
1	<i>Fagopyrum esculentum</i>	—	—	70 ^а	3,7	28
2	<i>Turbo cornutus</i>	2,8	—	—	—	25
3	<i>Pig Liver</i>	7	42	47 ^б	—	26
4	<i>Bacteroid</i> JY-6	7	—	120 ^б 240 ^а	4,2	46
5	<i>Fusabacterium</i>	K-60	5,5	41 ^б 70 ^а	5,2	47
6	<i>Clostridium stercorarium</i>	7,5	60	—	—	50
7	<i>Pseudoalteromonas species</i>	6,0	40	—	—	52
8	<i>Bacillus</i> sp. GL1	—	7	50	100 ^{б,в}	49
9	<i>Thermomicrobia</i> sp. (RhmA RhmB)	7.9, 5–6.9	70	104 ^б 210 ^а i 107 ^б 210 ^а	—	51
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCC 245 (RhaB1 and RhaB2)	7 i 5	50 i 60	73 ^б , 155 ^{в,а} 57 ^б 100 ^{в,а}	—	53
11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	7	—	—	—	54
12	<i>L. acidophilus</i>	6	—	—	—	54
13	<i>Corticium rolsii</i>	2	—	—	—	40
14	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> FP2001	7,8	45	112 ^{б,а}	7,1	56
15	<i>Pichia angusta</i> X349	6	40	88 ^б 90 ^в	4,9	45
16	<i>Rhizopus nigricans</i>	6,5	60–80	—	—	—
17	<i>Aspergillus aculeatus</i> (RhaA and RhaB)	4,5–5,0	—	92 ^б i 85 ^б	—	34
18	<i>A. aculeatus</i> (pnp-rhamnohydrolase and RG-rhamnohydrolase)	5,5 i 4	60	87 ^б i 84 ^б	—	29
20	<i>A. nidulans</i>	4,5–6	60	102 ^б	5	35
21	<i>A. terreus</i>	5,5	60	89 ^б , 97 ^а	—	32
22	<i>A. flavus</i>	6,5	50	40	—	6
23	<i>A. flavus</i> MTCC-9606	11,0	50	41	—	59
24	<i>A. niger</i>	4	50	168 ^а	—	36
25	<i>A. kawachii</i>	4	50	90 ^б	—	37
26	<i>A. kawachii</i>	4,5	60	—	—	29
26	<i>Mucor racemosus</i>	5,5–6,5	55–60	—	—	29
27	<i>Fusarium sambucinum</i>	5,5–6,5	55–60	—	—	29
28	<i>Penicillium aureatiogriseum</i>	—	60	—	—	29
28	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	4,5–5,5	60	—	—	29
29	<i>Fusarium solani</i>	6,5	—	—	—	29
30	<i>Curvularia lunata</i>	4	50	66 ^б	—	38
31	<i>Absidia</i> sp.	5	40	53 ^б	—	42

Примітка. Молекулярну масу визначено за допомогою:

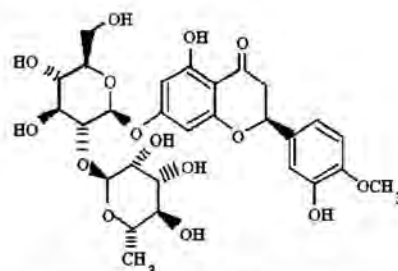
а — гель-фільтрації;

б — SDS-PAGE;

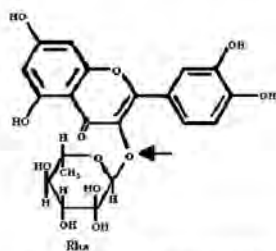
в — PAGE.



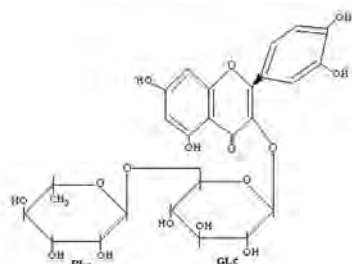
А — нарингін ($C_{27}H_{32}O_{17}$, М 580,5)



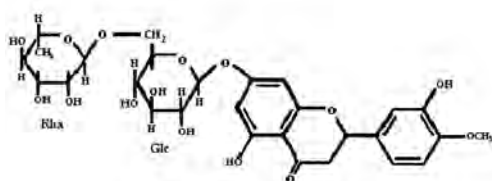
Е — неогесперидин ($C_{28}H_{34}O_{15}$, М 610,6)



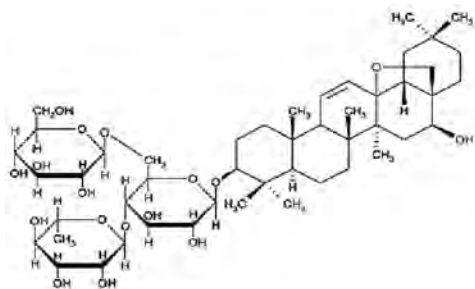
В — кверцитрин ($C_{21}H_{20}O_{11}$, М 448,4)



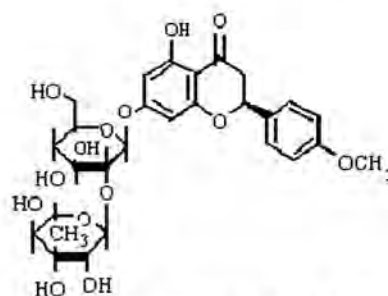
В — рутин ($C_{27}H_{30}O_{16}$, М 610,6)



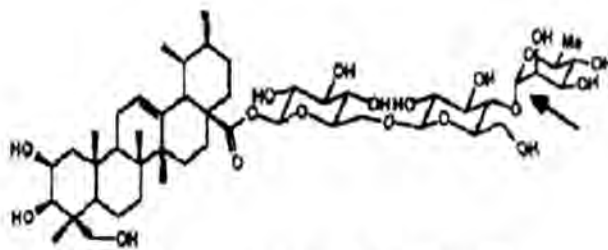
Г — гесперидин ($C_{28}H_{34}O_{15}$, М 610,6)



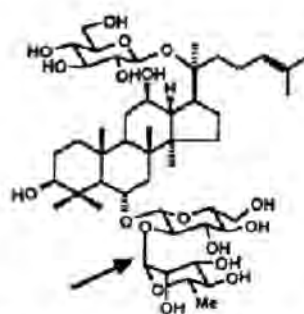
Д — сайкосапонін С ($C_{48}H_{78}O_{17}$, М 927,1)



Є — понцирин ($C_{28}H_{34}O_{14}$, М 594,6)



Ж — азіатикозид ($C_{48}H_{78}O_{19}$, М 959,14)



З — гінзенозид Re ($C_{48}H_{82}O_{18}$, М 947,17)

Рис. 3. Структури природних субстратів α -L-рамнозидаз [6]

α -L-рамнозидази, а також значення K_m для *n*-нітрофеніл- α -L-рамнозиду, нарингину, гесперидину, рутину, кверцитрину, понцирину, сайкосапоніну С, просцилардину А і неогесперидину. Різні α -L-рамнозидази здатні гідролізувати α -1,2-, α -1,3-, α -1,4- і α -1,6-глікозидні зв'язки. K_m для *n*-нітрофеніл- α -L-рамнозиду знаходиться в межах 0,057–2,8 мМ, для нарингину — 0,021–1,9 мМ, гесперидину — 0,02–1,3 мМ, рутину — 0,028–1,44 мМ, кверцитрину — 0,077–0,89 мМ, понцирину — 0,02–0,93 мМ.

Monti зі співавт. [29] вивчали субстратну специфічність α -L-рамнозидаз, ізольованих з різних видів грибів з використанням таких L-рамнозовмісних природних глікозидів, як рутин, гесперидин, нарингін, кверцитрин, гінзенозид та азіатикозид. Результати скринінгу продуцентів α -L-рамнозидази свідчать про їхню різну специфічність. Так, ензим, отриманий з *A. aculeatus*, характеризувався широкою субстратною специфічністю щодо різних субстратів, зокрема був ефективним стосовно кверцитрину,

 Таблиця 2. Субстратна специфічність α -L-рамнозидаз

№	Продуцент	Субстрат	Тип зв'язку	K_m	Специфічна активність, од/мл	Література
1	<i>Fagopyrum esculentum</i>	<i>n</i> -Нітрофеніл- α -L-рамнозид 6-О- α -L-рамнозил-D-глюкопіраноза	α -1 α -1,4	0,33 2,2	— —	28 28
2	<i>Bacteroides</i> JY-6	<i>n</i> -Нітрофеніл- α -L-рамнозид Неогесперидин Нарингін Понцирин Гесперидин Рутин Сайкосапонін С	α -1 α -1,2 α -1,2 α -1,2 α -1,6 α -1,6 α -1,4	0,29 0,82 0,89 0,93 1,33 1,44 1,6	162,57 190,21 242,67 174,60 109,31 88,12 2,93	46 46 46 46 46 46 46
3	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> FP2001	Гесперидин Просцилардин А Рутин Нарингін Сайкосапонін С Кверцитрин <i>n</i> -Нітрофеніл- α -L-рамнозид	α -1,6 α -1 α -1,6 α -1,2 α -1,4 α -1 α -1	0,06 0,07 0,13 0,17 0,88 0,89 1,18	0,12 1,48 0,17 0,18 2,52 11,20 92,40	56 56 56 56 56 56 56
4	<i>Fusobacterium</i> K-6	<i>n</i> -Нітрофеніл- α -L-рамнозид Кверцитрин Гесперидин Нарингін Понцирин Рутин	α -1 α -1 α -1,6 α -1,2 α -1,2 α -1,6	0,057 0,077 0,022 0,021 0,020 0,028	3,40 5,00 0,52 0,34 0,35 0,07	47 47 47 47 47 47
5	<i>Clostridium stercorarium</i>	<i>n</i> -Нітрофеніл- α -L-рамнозид Нарингін Гесперидин	α -1 α -1,2 α -1,6	— — —	82 1,5 0,46	50 50 50
6	<i>Bacillus</i> sp. GL1(RhaA і RhaB)	<i>n</i> -Нітрофеніл- α -L-рамнозид Нарингін Гелан	α -1 α -1,2 α -1,3	0,1190 0,282 —	104;79,4 — —	49 49 49
7	<i>Pichia angusta</i> X349	Нарингін Рутин Гесперидин Кверцитрин	α -1,2 α -1,6 α -1,6 α -1	— — — —	— — — —	45 45 45 45
8	<i>Absidia</i> sp.	20(S)-гінзенозид 20(R)-гінзенозид	α -1,2 α -1,2	— —	— —	21
9	<i>Aspergillus niger</i>	Нарингін	α -1,2	1,9	21	31
10	<i>A. aculeatus</i> (RhaA і RhaB)	<i>n</i> -Нітрофеніл- α -L-рамнозид	α -1	0,3 2,8	24,14	34
11	<i>Stagonospora avenae</i>	Авенакозид- α -L-рамнозид	α -1,4	0,091	—	41

який не гідролізували препарати α -L-рамнозидаз, одержаних з представників тих самих видів. Цей факт можна пояснити мінливістю штаму або альтернативними умовами культивування. Незважаючи на можливість стеричної перешкоди, через прямий зв'язок α -L-рамнозильного залишку з агліконом, ензими, отримані з *Mortierella alpina*, *Penicillium oxalicum* та *Talaromyces flavus*, були здатні використовувати кверцитрин як субстрат, тоді як його гідроліз раніше було відзначено лише у бактеріальних та тваринних α -L-рамнозидаз.

Комплексний глікозид гінзенозид ефективно дерамнозилювали препарати ензимів зі штамів *A. aculeatus*, *E. nidulans*, *P. oxalicum*, хоча раніше [55] встановлено, що лише α -L-рамнозидаза, що її отримали зі штаму *Absidia* sp. 39, який культивували в присутності водного екстракту з коренів женьшеню, була здатна гідролізувати гінзенозид.

Терпеновий глікозид азіатикозид слугував субстратом для α -L-рамнозидази *A. terreus*, *E. nidulans*, *F. oxysporum* та ензиму, отриманого внаслідок його індукції нарингіном у *T. flavus*. Ензимні препарати, одержані з *A. aculeatus*, *A. niger*, що переважно гідролізували α -1,2- та α -1,6-глікозидні зв'язки, були активними також щодо азіатикозиду (α -1,4-глікозидний зв'язок).

У деяких випадках препарати α -L-рамнозидаз, які отримували з одних і тих самих продуцентів за культивування їх у присутності різних індукторів, виявляли різну субстратну специфічність. Наприклад, препарат, одержаний під час вирощування *T. flavus* CCF 2686 на середовищі з нарингіном, виявляв широку субстратну специфічність, тоді як препарат, отриманий у разі вирощування продуцента на середовищі з L-рамнозою, був активним лише стосовно рутину та кверцитрину. α -L-рамнозидази, одержані за культивування з *E. nidulans* CCF 2912 на середовищі з L-рамнозою, гесперидином або нарингіном, також виявляли різну субстратну специфічність.

Механізм каталітичної дії глікозидаз

Конкретних фактів щодо механізму дії α -L-рамнозидаз вкрай мало, оскільки відсутні дані щодо хімії та кінетики ензимів із більшості досліджених джерел. Хоча за аналогією з іншими глікозидазами ймовірно має місце розщеплення зв'язків між С-атомом рамнози і киснем субстратів. Так, встановлено, що відбувається розрив зв'язку між атомом кисню та нередукуючим залиш-

ком оліго- і полісахариду, до якого глікозидаза виявляє найбільшу специфічність. Відомо, що α -L-рамнозидаза у субстратах діє на C_1-O або $O-C_n$ (для α -L-рамнозидаз $n = 2, 4, 6$) [55].

Zverlov зі співавт. [50] вивчали тип ензимного механізму рамнозидазної реакції, аналізуючи продукти гідролізу n -нітрофеніл- α -L-рамнопіранозиду за допомогою 1H -ЯМР-спектроскопії. У результаті взаємодії субстрату та ензиму на спектрі визначали пік β -рамнози, який ідентифікували раніше за α -ізомер. Такий характер кінетичної поведінки визначає механізм гідролізу, за яким β -рамноза набуває форми α -рамнозиду за рахунок зміщення, стихійно мутаротуючи в α -форму. Подібний механізм був і в рамногалактуронан-гідролази *A. aculeatus*, в якій також виявлено інвертування [63].

На цей час існує розвинена Жеребцовим зі співавт. [64] ідея про ідентичність механізму розщеплення глікозидних зв'язків глікозидазами. Дослідники виходять із принципу орієнтованої спряженої атаки електрофільних та нуклеофільних груп на глікозидний зв'язок молекули оліго- або полісахариду. Суміщення на поверхні молекули ензиму на близькій відстані великої кількості чітко орієнтованих іонних груп забезпечує умови для багатофункціонального каталізу. Однак у самому акті каталізу у глікозидаз, як правило, беруть участь дві групи, що утворюють спряжену систему. Інші групи беруть участь у створенні додаткових зв'язків з активним центром ензиму, необхідних для орієнтації молекули субстрату, і зумовлюють специфічність дії глікозидаз. Каталітично активні групи, які містяться на різних, але визначених відстанях одна від одної, не тільки зв'язуються з реагуючими групами субстрату, але й спричиняють сильну поляризуючу дію на ці групи. Саме такі властивості притаманні карбоксильній та імідазольній групам. Мала величина pK_b , незначна теплота іонізації карбоксильної групи визначають її існування у вигляді карбоксилат-іону з яскраво вираженими нуклеофільними властивостями. Важлива роль в акті каталізу імідазольної групи зумовлена резонуючою структурою її гетероциклу, здатного діяти як переносник позитивних та негативних груп. Виходячи з того, що pH_{opt} для багатьох рамнозидаз має місце за значень 5,0, pK_b карбоксильної групи коливається в межах 2,2–3,5, pK_a імідазольної — 5,5–7,0 ($\Delta pK = pK_a - pK_b \approx 3,5$); у каталітично активній парі карбоксил-імідазол карбоксильна

група міститься у вигляді карбоксилат-іону, а імідазольна — протонованого імідазолію. Пара карбоксил-імідазол утворює систему карбоксилат-імідазолій, яка функціонує за типом кислотно-основного каталізу. Роль електрофільної (протондонорної) групи відводиться імідазолію, тимчасом як карбоксилат-іон виконує функцію нуклеофілу. Під впливом цієї системи у глікозидному зв'язку глікокон'югатів відбувається зміщення електронів від карбоксилат-іону до імідазолію, що й призводить до розщеплення цього зв'язку.

Роль карбоксильної та імідазольної групи показано раніше для α -L-рамнозидази *Penicillium commune* [65], а також підтверджено нашими дослідженнями α -L-рамнозидази *Eupenicillium erubescens* [66] та *Cryptococcus albidus* [67].

Дія рамнозидаз на нередукуючі кінці оліго- або полісахаридів свідчить про те, що ці кінці відіграють важливу роль у механізмі каталізу, виконуючи функцію контактної ділянки у разі утворення комплексу ензим-субстрат з комплементарною контактною ділянкою активного центру глікозидази.

Інгібітори α -L-рамнозидаз

Інтерес до синтетичних інгібіторів α -L-рамнозидаз виник у зв'язку з тим, що було показано здатність деяких сполук такого типу інгібувати глікозидазу, порушуючи

процесинг глікопротеїну вірусу імунодефіциту людини. У низці робіт було описано синтез інгібіторів α -L-рамнозидаз та інших глікозидаз [68–76]. Відомі окремі повідомлення про інгібування α -L-рамнозидаз L-рамнозою, глюкозою, лимонною кислотою і деякими іонами металів (табл. 3) [67–76]. Показано інгібуючий вплив Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} і Mn^{2+} на активність α -L-рамнозидаз *A. nidulans* [35], *A. aculeatus* [34], *A. niger* [36], *Sphingomonas* sp. R1 [48]; Ba^{2+} — на *S. paucimobilis*; Hg^{2+} — на *A. terreus*, *Bacillus* sp., *C. stercorarium*; *n*-хлормеркурибензоату — на *P. angusta*, *Bacteroides* sp., *C. stercorarium* (табл. 3).

Деякі катіони здатні стимулювати α -L-рамнозидазну активність: Ca^{2+} — *Absidia* sp., *A. terreus*, *Bacillus* sp., *Emericella nidulans*, *L. plantarum*, *Sphingomonas paucimobilis* [36, 64]; Co^{2+} — *A. terreus*, *L. plantarum*; Mg^{2+} , Zn^{2+} — *P. ulaiense* [77], *Absidia* sp., *A. terreus* [55].

Багато ензимів активуються у присутності сполук, що містять сульфгідрильну групу (таких, як цистеїн та глутатіон). Разом з тим відзначають і неспецифічне інгібування ензимів за дії речовин, які утворюють з протеїнами нерозчинні осаді або блокують в них SH-групи. Існують також інгібітори, гальмування каталітичних функцій ензимів якими базується на специфічному зв'язуванні цих інгібіторів з певними хімічними групами активного центру [55].

Таблиця 3. Інгібітори α -L-рамнозидаз

Мікроорганізм	Інгібітори	Література
<i>A. aculeatus</i> Rha A Rha B	Рамноза Рамноза	34
<i>A. nidulans</i>	Рамноза, Mg^{2+}	35
<i>A. niger</i>	Рамноза	36
<i>A. terreus</i>	Рамноза, етанол, глюкоза, Hg^{2+} , Cd^{2+}	32
<i>Penicillium</i> sp.	Рамноза, глюкоза	29
<i>P. angusta</i>	Рамноза, Cu^{2+} , Hg^{2+} , <i>n</i> -хлормеркурибензоат	45
<i>Bacillus</i> sp. Rha A Rha B	Рамноза, Hg^{2+} Рамноза, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , глюкоза, 6-дезоксиглюкоза	49
<i>Bacteroides</i> sp.	Рамноза, фукоза, лимонна кислота, 1,4-лактон, Pb^{2+} , <i>n</i> -хлормеркурифенілсульфонід	46
<i>C. stercorarium</i>	Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , SDS, <i>n</i> -хлормеркурибензоат	50
<i>S. paucimobilis</i>	Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+}	48
<i>Thermomicrobia</i> Rha A Rha B	Рамноза, глюкоза, етанол Рамноза, глюкоза, етанол, Zn^{2+}	51

Примітка. Активність в ензиматичному середовищі визначали з використанням як субстрату *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозиду.

Встановлено [32, 55], що дитіотрейтол не впливав на активність α -L-рамнозидаз у *A. terreus*, *L. plantarum*, що дало змогу дійти висновку про незначну роль SH-груп в каталітичній активності.

Структура

α -L-рамнозидази належать до глікозидаз з каталітичним доменом у вигляді $(\alpha/\alpha)_6$ -барель. Цей тип просторової структури представлений у глікозил-гідролазах трьох кланів: GH-G, GH-L, GH-M. Усі відповідні ензими перетворюють аномерну конфігурацію субстрату. Таку саму просторову структуру мають і глікозидази родин GH9, GH47, GH76, GH78, GH88, GH92, GH94 (раніше GH36), GH95, GH100, GH105 і GH116, а також полісахаридліази з родини PL10. У класифікації Pfam їм відповідає клан CL0059 [78], а в класифікації C-родин — C6 [79]. За класифікацією SCOP глікозидази цієї групи віднесено до двох суперродин — Six-hairpin glycosidases і Seven-hairpin glycosidases — у складі фолду alpha/alpha toro-

id [80]. Слід відзначити, що каталітичний домен родини GH47 має модифіковану структуру $(\alpha/\alpha)_7$ -барель. Філогенетичний аналіз дозволяє виділити чотири групи протеїнів у складі цієї родини [81]. У складі родини GH8 було виділено три підродини [82], GH15 — чотири [83], GH9 — три структурних субкласи рослинних протеїнів [84].

Ітеративний скринінг бази даних амінокислотних послідовностей за допомогою протеїнів родини GH78 дав змогу прослідкувати еволюційні зв'язки з представниками родин GH94, GH63, GH15, GH37, GH95 і GH65 глікозил-гідролаз. Статистично менш достовірні зв'язки вдалось також встановити з протеїнами родин GH92, GH9, GH8 і GH48 [85].

На цей час визначено кристалічну структуру лише однієї α -L-рамнозидази — Rha B *Bacillus* sp. GL 1 [86]. Молекулярна маса ензиму — 106 кДа, він містить 956 амінокислотних залишків. Структура (рис. 4 а, б) складається з 5 доменів, позначених відповідно N (червоним кольором), D1 (блакитним), D2 (сірим), A (жовтим) і C (синім).

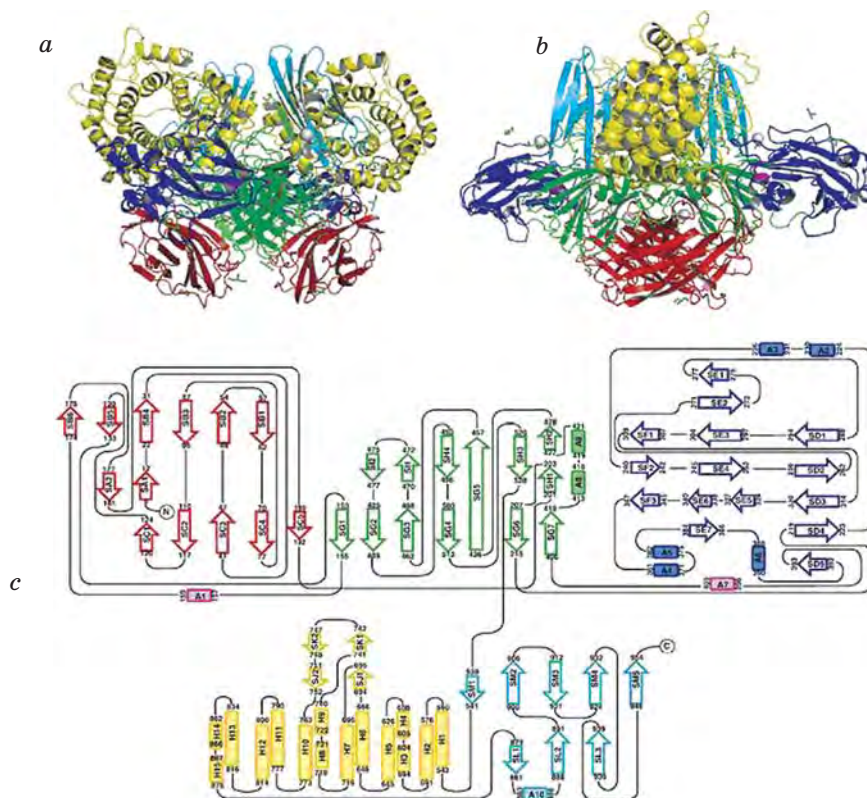


Рис. 4. Загальна структура Rha B:

а — вигляд спереду — гомодимерна структура;

б — вигляд збоку;

с — топологічна діаграма Rha B.

Циліндри — α -спіралі, стрілочки — β -спіралі; сірі кулі — іони кальцію; зелені палички і червоні кулі — гліцерол. Червоним кольором позначено домен N, блакитним — домен D1, сірим — домен D2, жовтим — домен A, синім — домен C

Вторинні елементи показано на рис. 4, с. Домени N, D1, D2 і С відповідають β -сендвіч-структурі, домен А — $(\alpha/\alpha)_6$ -барель-структурі. Третинні структури, подібні до Rha В, виявлено і внесено до банку даних DALI. Деякі складові структури Rha В подібні до первинної структури фосфорилази хітобіози *Vibrio proteoliticus* і фосфорилази мальтози *Lactobacillus brevis*, хоча різниця в первинній структурі цих двох ензимів є дуже суттєвою.

Встановлено [6], що рамноза зв'язується зі щілиною $(\alpha/\alpha)_6$ -барель домену. Декілька негативно заряджених залишків, таких як Asp567, Glu572, Asp579 і Glu841, зв'язуються з рамнозою. Оскільки RhaВ-мутанти за цими залишками радикально знижують ензиматичну активність, це свідчить про їх важливу роль в ензиматичному каталізі та субстратному зв'язуванні.

Практичне використання α -L-рамнозидаз

α -L-рамнозидази можуть бути використані в різних галузях промисловості, зокрема харчовій, фармацевтичній та хімічній.

Головне використання α -L-рамнозидаз у харчовій промисловості спрямовано на поліпшення якості напоїв (зменшення гіркоти, підсилення аромату вин) і виробництво харчових добавок. Біотехнологічні підходи до зменшення гіркоти цитрусових соків базуються на здатності цього ензиму гідролізувати нарингін і лимонін. Нарингіназа, яка містить α -L-рамнозидазу і β -D-глюкозидазу, поступово гідролізує нарингін (рис. 2). α -L-рамнозидаза розщеплює нарингін до рамнози і пруніну, а β -D-глюкозидаза — прунін до глюкози і нарингеніну (рис. 2). Гіркота нарингеніну становить лише 1/3 від гіркоти нарингину, а прунін є менш гірким, ніж нарингін. Фактично лише перша глікозидазна активність, а саме α -L-рамнозидаза, є важливою. Можливість ензиматичного шляху зменшення рівня гіркоти було показано на обох нарингіназах — водорозчинній та іммобілізованій [87–95].

α -L-рамнозидазу застосовують для вивільнення з терпенових глікозидів — рутинозидів (6-O- α -L-рамнопіранозил- β -D-глюкопіранозидів) — ароматичних сполук, які здатні підсилювати аромат виноградних соків та отриманих з них напоїв [96]. α -L-рамнозидазу широко використовують у процесі виноробства. Однією з важливих характеристик якості вин є ароматичний букет, істотний внесок у створення якого роблять монотерпени, що містяться у винограді частково у вигляді вільних летких форм, а част-

ково — як глікозидів, зв'язані нелеткі попередники. До їх складу входять β -D-глюкопіранозиди та диглікозиди, а саме: 6-O- α -L-арабінофуранозил- β -D-глюкопіранозид і 6-O- α -L-апіофуранозил- β -D-глюкопіранозид, які є потенційним джерелом букета в традиційному виноробстві. Глікозидів, зв'язані леткі речовини можна вивільнити двоетапним ензимним гідролізом. На першій стадії глікозидний зв'язок розщеплює α -L-рамнозидаза, α -L-арабінофуранозидаза або β -D-апіозидаза з вивільненням відповідного монотерпенілу- β -D-глюкозиду, а на другій — β -D-глюкозидаза вивільняє монотерпенол [55].

Окрім виробництва вин, α -L-рамнозидази використовують у процесі виготовлення соків, підвищуючи їхні смакові властивості. Оскільки глікозиди флавоноїдів є більш біодоступними, ніж їх рутинозиди (глюкоза + рамноза), обидві α -L-рамнозидази *A. aculeatus* (*rhaA* і *rhaB*) застосовують у виробництві функціональних напоїв, у яких збільшено вміст біофлавоноїдів [94]. Інкубування соків з чорної смородини, апельсинового соку з *rhaA* або *rhaB* сприяє збільшенню вмісту флавоноїдних рутинозидів і глюкозидів (антоціанінів — у чорній смородині, флавононів — в апельсиновому соці, флавонолів — у зеленому чаї).

α -L-рамнозидази використовують у виробництві біологічно активних добавок: різних біополімерів і підсолоджувачів [95].

Здатність рамнозидів та їхніх похідних підвищувати імунітет відкрила широке поле для застосування α -L-рамнозидаз у фармацевтичній промисловості [92]. Так, після глікозидазної обробки екстракти рослини *Ruscus aculeatus* набувають протизапальної [28] та цитостатичної [56] дії, що уможливило їх використання для лікування хронічної венозної недостатності [93, 96]. Такі властивості екстрактів зумовлені наявністю стероїдних сапонінів: русцину і рускозину та їхніх похідних — деглюкорусцину, деглюкорамнорусцину та деглюкорускозиду [97, 98].

Встановлено вплив гінзенозиду Rg 1, отриманого з гінзенозиду Re за дії α -L-рамнозидази, на кількість інсулінових рецепторів у мембранах печінки й мозку та на вміст позаклітинного циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ). Видалення залишків рамнози перетворює гіпенозид 5 на гінсенозид Rd, який запобігає травмам нирок у разі використання протипухлинних препаратів [99].

Хлорополіспорини А, В, С та їхні частково деглікозилізовані похідні — нові члени родини глікопептидних антибіотиків,

активних проти грампозитивних бактерій, у тому числі клінічних ізолятів метицилінрезистентних *Staphylococcus* та анаеробних ентеробактерій. Дерамнозильні похідні, отримані обробленням α -L-рамнозидазою, більш активні порівняно з вихідними компонентами [100].

α -L-рамнозидази застосовують для одержання багатьох лікарських засобів, а також їх попередників. Ензим гідролізує сапонін діозген з утворенням рамнози і діозгеніну. Останній використовують для отримання синтетичного прогестерону, який входить до складу гормональних лікарських засобів. Флаванол кверцитин, який утворюється у процесі гідролізу кверцитрину α -L-рамнозидазою, виявляє антиоксидантні, антиканцерогенні, протизапальні, антиагрегаційні, судинорозширювальні властивості. Гесперитину, який отримано під час гідролізу α -L-рамнозидазою гесперидину, притаманні протипухлинні властивості [101]. Унаслідок відщеплення рамнози від рутину утворюється кверцитин-3-глюкозид, який виявляє антиоксидантну дію. Прунін, дерамнозильований продукт нарингину, має протизапальну активність щодо вірусних ДНК/РНК [6]. Показано, що сайкосапоніни та їхні метаболіти збільшують рівень кортикостероїдів у крові [61].

Унаслідок дії α -L-рамнозидаз біофлавоноїди можуть бути використані як активні інгредієнти косметичних засобів проти старіння шкіри, у разі вугрового висипання, при гіпоактивному та гіперактивному стані шкіри та для сонцезахисту. Переваги застосування їх у препаратах по догляду за волоссям, ротовою порожниною, а також як природних та безпечних консервантів косметичних засобів беззаперечні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ridley B. L., O'Neill M. A., Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling // *Phytochemistry*. — 2001. — V. 57, N 6. — P. 929–967.
2. Ueda H., Ogawa H. Glycobiology of the Plant Glycoprotein Epitope: Structure, Immunogenicity and Allergenicity of Plant Glycotopes // *Trends Glycosci. Glycotech.* — 1999. — V. 11, N 62. — P. 413–428.
3. Renault J. H., Thepenier P., Zeches-Hanrot M. et al. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography // *J. Chromatogr. A*. — 1997. — V. 763, N 1. — P. 345–352.
4. Bar-Peled M., Lewinsohn E., Fluhr R. UDP-rhamnose-flavanone-7-O-glucoside-2"-O-rham-

nosyltransferase-purification and characterization of an enzyme catalyzing the production of bitter compounds in citrus // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 226, N 31. — P. 20953–20959.

nosyltransferase-purification and characterization of an enzyme catalyzing the production of bitter compounds in citrus // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 226, N 31. — P. 20953–20959.

nosyltransferase-purification and characterization of an enzyme catalyzing the production of bitter compounds in citrus // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 226, N 31. — P. 20953–20959.

nosyltransferase-purification and characterization of an enzyme catalyzing the production of bitter compounds in citrus // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 226, N 31. — P. 20953–20959.

5. Friedman M., McDonald G. M. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology // *Crit. Rev. Plant Sci.* — 1997. — V. 16, N 8. — P. 55–132.
6. Yadav V., Yadav P. K., Yadav S. et al. α -L-Rhamnosidase: A review // *Proc. Biochem.* — 2010. — V. 45, N 8. — P. 1226–1235.
7. Ochsner U. A., Fiechter A., Reiser J. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis

- // J. Biol. Chem. — 1994. — V. 269, N 31. — P. 19787–19795.
8. Chua J. E. H., Manning P. A., Morona R. The *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6 tailspike protein (TSP)/endorhamnosidase is related to the bacteriophage P22 TSP and has a motif common to exo- and endoglycanases, and C-5 epimerases // Microbiology. — 1999. — V. 145, N 5. — P. 1649–1659.
 9. Deng L., Kasper D. L., Krick T. P. et al. Characterization of the linkage between the type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of group B *Streptococcus* // J. Biol. Chem. — 2000. — V. 275, N 11. — P. 7497–7504.
 10. Mutter M., Beldman G., Schols H. A., Vorage A. G. Rhamnogalacturonan α -L-rhamnopyranohydrolase. A novel enzyme specific for the terminal nonreducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan regions of pectin // Plant. Physiol. — 1994. — V. 106, N 1. — P. 241–250.
 11. Oda Y., Saito K., Ohara-Takada A. et al. Hydrolysis of the potato glycoalkaloid α -chaconine by filamentous fungus // J. Biosci. Bioeng. — 2002. — V. 94, N 4. — P. 321–325.
 12. Deng L., Kasper D. L., Krick T. P. et al. Characterization of the linkage between the type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of group B *Streptococcus* // J. Biol. Chem. — 2000. — V. 275, N 11. — P. 7497–7504.
 13. Gunata Y. Z., Bayove C. L., Baumes R. L., Cordonnier R. E. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components // J. Chromatogr. — 1985. — V. 331, N 3. — P. 83–90.
 14. Benavente G. O., Castillo J., Marin F. R. et al. Uses and properties of Citrus flavonoids // J. Agric Food Chem. — 1997. — V. 45, N 1. — P. 4505–4515.
 15. Barker S. A., Somers P. J., Stacey M. Arrangement of the L-rhamnose units in *Diplococcus pneumoniae* type II polysaccharide. // Carbohydr. Res. — 1965. — V. 1. — P. 106–115.
 16. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // Biochem. J. — 1991. — V. 280, N 2. — P. 309–316.
 17. Coutinho P. M., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // Structure. — 1995. — V. 3, N 9. — P. 853–859.
 18. Steinbacher S., Seckler R., Miller S. Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer // Science. — 1994. — V. 265, N 5. — P. 383–386.
 19. Davies G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // Structure. — 1995. — V. 3, N 9 — P. 853–859.
 20. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // J. Biol. Chem. — 1944. — N 2. — P. 375–377.
 21. Somogyi M. Notes on sugar determination // Ibid. — 1952. — V. 195, N 1. — P. 19–23.
 22. Manzanares P., Orejas M., Ibanez E. et al. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans* // Lett. Appl. Microbiol. — 2000. — V. 31, N 3. — P. 198–202.
 23. Romero C., Manjon A., Bastida J., Iborra J. L. A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase // Anal. Biochem. — 1985. — V. 149, N 2. — P. 566–571.
 24. Davis D. W. Determination of flavonones in citrus juice // Anal. Chem. — 1947. — V. 19, N 7. — P. 46–48.
 25. Kurosawa Y., Ikeda K., Egami F. α -L-rhamnosidases of the liver of *Turbo cornutus* and *Aspergillus niger* // J. Biochem. — 1973. — V. 73, N 3. — P. 31–37.
 26. Qian S., Yu H., Zhang S. Purification and characterization of dioscin — α -L-rhamnosidase from pig liver // Chem. Pharm. Bull. — 2005. — V. 53, N 8. — P. 911–914.
 27. Locatelli M., Epifano F., Genovese S. Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial properties of bark extracts of *Rhamnus catharticus* and *R. orbiculatus* // Nat. Prod. Commun. — 2011. — V. 6, N 9. — P. 1275–1280.
 28. Bourbouse R., Percheron F., Courtois J. E. α -L-rhamnosidases from *Fagopyrum esculentum*: purification and some properties // Eur. J. Biochem. — 1976. — V. 63, N 2. — P. 331–337.
 29. Monti D., Pisvejcova A., Kren V. et al. Generation of an α -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products // Biotechnol. Bioeng. — 2004. — V. 87, N 6. — P. 763–771.
 30. Shanmugam V., Yadav K. D. S. Extracellular production of α -rhamnosidase by *Rhizopus nigricans* // Ind. J. Exp. Biol. — 1995. — V. 33, N 9. — P. 705–707.
 31. Spagm G., Barbagallo R. N., Martino A. et al. A simple method of purifying glycosidase: α -L-rhamnopyranosidases from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine // Enzyme Microb. Technol. — 2000. — V. 27, N 7. — P. 522–530.
 32. Yadav S., Yadav K. D. S. Immobilization of α -L-rhamnosidase by *Aspergillus terreus* MTCC-3374 on bagasse particles based matrix // Indian. J. Chem. Technol. — 2001. — V. 8. — P. 314–318.
 33. Yadav S., Yadav K. D. S. Secretion of α -L-rhamnosidases by some indigenous fungal strains // J. Sci. Ind. Res. — 2004. — V. 63. — P. 439–443.

34. Manzanares P., Broeck H. C. V., Graaff L. H. D., Visser J. Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, RhaA and RhaB from *Aspergillus aculeatus* // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — V. 67, N 5. — P. 2230–2234.
35. Orejas M., Ibanez E., Ramon D. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* produces an α -L-rhamnosidase of potential oenological interest // Lett. Appl. Microbiol. — 1999. — V. 28, N 5. — P. 383–388.
36. Shanmugaprakash M., Kumar V. V., Hemalatha M. et al. Solid-state fermentation for the production of debittering enzyme naringinase using *Aspergillus niger* MTCC 1344 // Eng. Life Sci. — 2011. — V. 11, N 3. — P. 322–325.
37. Koseki T., Mese Y., Nishibori N. et al. Characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 80, N 6. — P. 1007–1013.
38. Feng B., Hu W., Ma B. P. et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin-rhamnosidase activity from *Curvularia lunata* // Ibid. — 2007. — V. 76, N 6. — P. 1329–1338.
39. Scaroni E., Cuevas C., Carrillo L. et al. Hydrolytic properties of crude α -L-rhamnosidases produced by several wild strains of mesophilic fungi // Lett. Appl. Microbiol. — 2002. — V. 34, N 6. — P. 461–465.
40. Kaji A., Ichimi T. α -L-Rhamnosidase activity in culture filtrate of *Corticium rolfsii*. Enzymatic activity at low pH // Agric. Biol. Chem. — 1973. — V. 37, N 2. — P. 431–432.
41. Morrissey J. P., Wubben J. P., Osbourn A. E. *Stagonospora avenae* secretes multiple enzymes that hydrolyze oat leaf saponins // Mol. Plant. Microbe Interact. — 2000. — V. 13, N 10. — P. 1041–1052.
42. Yu H., Gong J., Zhang C. et al. Purification and characterization of ginsenoside- α -L-rhamnosidase // Chem. Pharm. Bull. — 2002. — V. 50, N 2. — P. 175–178.
43. Temme H., Dethloff O., Pitner W. R. et al. Identification of suitable ionic liquids for application in the enzymatic hydrolysis of rutin by an automated screening // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2012. — V. 93, N 6. — P. 2301–2308.
44. McMahon H., Zoecklein B. W., Fugelsang K. et al. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — V. 23, N 3. — P. 198–203.
45. Yanai T., Sato M. Purification and Characterization of α -L-rhamnosidases from *Pichia angusta* X349 // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2000. — V. 64, N 10. — P. 2179–2185.
46. Jang I. S., Kim D. H. Purification and characterization of α -L-rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium // Biol. Pharm. Bull. — 1996. — V. 19, N 1. — P. 1546–1549.
47. Park S. Y., Bae E. A., Sung J. H. et al. Purification and characterization of ginsenoside Rb1-metabolizing beta-glucosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal anaerobic bacterium // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2001. — V. 65, N 5. — P. 1163–1169.
48. Hashimoto W., Murata K. α -L-rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan // Ibid. — 1998. — V. 62, N 6. — P. 1068–1074.
49. Hashimoto W., Nankai H., Sato N. et al. Characterization of α -L-rhamnosidase of *Bacillus* sp. GL1 responsible for the complete depolymerization of gellan // Arch. Biochem. Biophys. — 1999. — V. 368, N 1. — P. 56–60.
50. Zverlov V. V., Hertel C., Bronnenmeier K. et al. The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial α -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase // Mol. Microbiol. — 2000. — V. 35, N 1. — P. 173–179.
51. Birgisson H., Hreggvidsson G. O., Fridjonsen O. H. et al. Two new thermostable α -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium // Enzyme Microb. Technol. — 2004. — V. 34, N 6. — P. 561–571.
52. Orrillo A. G., Ledesma P., Delgado O. D. et al. Cold-active α -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem // Ibid. — 2007. — V. 40, N 2. — P. 236–241.
53. Beekwilder J., Marozzi D., Vecchi S. et al. Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* // Appl. Environ. Microbiol. — 2009. — V. 75, N 11. — P. 3447–3454.
54. Avila M., Jaquet M., Moine D. et al. Physiological and biochemical characterization of the two α -L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245 // Microbiology. — 2009. — V. 155. — P. 2739–2749.
55. Варбанець Л. Д., Борзова Н. В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. — К.: Наук. думка, 2010. — 437 с.
56. Miake F., Satho T., Takesue H. et al. Purification and characterization of intracellular α -L-rhamnosidase from *Pseudomonas paucimobilis* FP2001 // Arch. Microbiol. — 2000. — V. 173, N 1. — P. 65–70.
57. Mutter M., Beldman G., Schols H. A. et al. Rhamnogalacturonan α -L-rhamnopyranohydrolase // Plant. Physiol. — 1994. — V. 117, N 1. — P. 153–163.

58. *Eliades L. A., Rojas N.L., Cabello M. N. et al.* α -L-Rhamnosidase and β -D-glucosidase activities in fungal strains isolated from alkaline soils and their potential in naringin hydrolysis // J. Basic Microbiology. — 2011. — V. 51, N 6. — P. 659–665.
59. *Yadav V., Yadav S., Yadava S. et al.* α -L-Rhamnosidase from *Aspergillus flavus* MTCC-9606 isolated from lemon fruit peel // Int. J. Food Sci. Technol. — 2011. — V. 46, N 2. — P. 350–357.
60. *Yadav S., Yadav V., Yadav S. et al.* Purification, characterisation and application of α -l-rhamnosidase from *Penicillium citrinum* MTCC-8897 // Ibid. — 2012. — V. 47, N 2. — P. 290–298.
61. *Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M.* α -L-rhamnosidase: old and new insights / Industrial Enzymes. — Springer, 2007. — P. 117–140.
62. *Hashimoto W., Miyake O., Nankai H. et al.* Molecular identification of an alpha-L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. strain GL1 as an enzyme involved in complete metabolism of gellan // Arch. Biochem. Biophys. — 2003. — V. 415, N 2. — P. 235–244.
63. *Pitson S. M., Mutter M., Broek L. A. V. et al.* Stereochemical course of hydrolysis catalysed by α -l-rhamnosyl and β -d-galacturonosyl hydrolases from *Aspergillus aculeatus* // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1998. — V. 242, N 3. — P. 552–559.
64. *Жеребцов Н. А., Корнеева О. С., Тертычная Т. Н.* О механизме каталитического действия карбогидраз // Прикл. биохим. микробиол. — 1999. — Т. 32, № 2. — С. 123–132.
65. *Рзаева О. М., Борзова Н. В., Варбанець Л. Д.* Дослідження функціональних груп α -L-рамнозидаз *P. commune* 266 // Укр. біохім. журн. — 2008. — Т. 80, № 6. — С. 42–51.
66. *Гудзенко О. В., Борзова Н. В., Варбанець Л. Д.* Влияние ионов металлов и специфических химических реагентов на активность α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* // Там же. — 2012. — Т. 80, № 2. — С. 30–41.
67. *Гудзенко О. В., Варбанець Л. Д.* Дослідження функціональних груп α -L-рамнозидази *Cryptococcus albidus* // Мікробіол. журн. — 2012. — Т. 74, № 4. — С. 19–28.
68. *Puri M., Banerjee A., Banerjee U. C.* Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC-1344 // Proc. Biochem. — 2005. — V. 40, N 1. — P. 195–201.
69. *Washiyama S., Kamiya A., Esaki S. et al.* Synthesis of 1-deoxy-l-rhamnojirimycin and its inhibitory action against α -l-rhamnosidase // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1993. — V. 57, N 5. — P. 847–849.
70. *Davis B. G., Brandstetter T. W., Smith C. et al.* Tetrazoles of manno- and rhamno-furanoses // Tetrahedron Lett. — 1995. — V. 36, N 41. — P. 7507–7510.
71. *Shilcock J. P., Wheatley J. R., Davis B. et al.* Inhibition of naringinase (l-rhamnosidase) by piperidine analogues of l-rhamnose: scaffolds for libraries incorporating trihydroxypipericolic acids // Ibid. — 1996. — V. 37, N 47. — P. 8569–8572.
72. *Davis B. G., Hull A., Smith C. et al.* 5-epi-Deoxyrhamnojirimycin is a potent inhibitor of an α -l-rhamnosidase: 5-epi-deoxymannojirimycin is not a potent inhibitor of an β -d-mannosidase // Tetrahedron: Asymmetry. — 1998. — V. 9. — P. 2947–2960.
73. *Davis B. G., Brandstetter T. W., Hackett L. et al.* Tetrazoles of manno- and rhamno-pyranoses: contrasting inhibition of mannosidases by [4.3.0] but of rhamnosidases by [3.3.0] bicyclic tetrazoles // Tetrahedron. — 1999. — V. 55, N 14. — P. 4489–500.
74. *Kim J. H., Curtis-Long M. J., Seo W. D. et al.* Alpha-rhamnosidase inhibitory activities of polyhydroxylated pyrrolidine // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2005. — V. 15, N 19. — P. 4282–4285.
75. *Hakansson A. E., Ameijde J., Guglielmini L. et al.* Looking glass inhibitors: synthesis of a potent naringinase inhibitor l-DIM [1,4-dideoxy-1,4-imino-l-mannitol], the enantiomer of DIM [1,4-dideoxy-1,4-imino-d-mannitol] a potent α -d-mannosidase inhibitor // Tetrahedron: Asymmetry. — 2007. — V. 18, N 2. — P. 282–289.
76. *Hakansson A. E., Ameijde J., Horne G. et al.* Synthesis of the naringinase inhibitors l-swainsonine and related 6-Cmethyl-l-swainsonine analogues: (6R)-C-methyl-l-swainsonine is a more potent inhibitor of l-rhamnosidase by an order of magnitude than lswainsonine // Tetrahedron Lett. — 2008. — V. 49, N 1. — P. 179–184.
77. *Rajal V., Cid A., Ellenrieder G. et al.* Production, partial purification and characterization of α -L-rhamnosidase from *Penicillium ulaiense* // Chemistry and materials science. — 2009. — V. 25, N 6. — P. 1025–1033.
78. *Finn R. D., Mistry J., Tate J. et al.* // Nucl. Acids Res. — 2010. — V. 38. — P. 211–222.
79. *Ryka P., Czanik P., Ponyi T., Fülöp L.* Structural classification of glycosyl hydrolases // Bul. Szent István University — Gödöll. — 2008. — V. 1. — P. 5–10.
80. *Andreeva A., Howorth D., Chandonia J. M. et al.* Data growth and its impact on the SCOP database: new developments // Nucl. Acids Res. — 2008. — V. 36. — P. 419–425.
81. *Jordan I. K., Bishop G. R., Gonzalez D. S.* Sequence and structural aspects of functional diversification in class I alpha-mannosidase evolution // Bioinformatics. — 2001. — V. 17. — P. 965–976.

82. Adachi W., Sakihama Y., Shimizu S. et al. Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp. K17 // J. Mol. Biol. — 2004. — V. 343, N 3. — P. 785–795.
83. Stam M. Evolution et prediction des activites des glycoside hydrolases. Ph.D. thesis, Universite Aix_Marseille 1, Marseille, France. — 2006. (www.sfb.fr/Theses/2006_Stam_Mark.pdf).
84. Urbanowicz B. R., Bennett A. B., Del Campillo E. et al. Structural organization and a standardized nomenclature for plant endo-1,4-beta-glucanases (cellulases) of glycosyl hydrolase family 9 // Plant Physiol. — 2007. — V. 144, N 4. — P. 1693–1696.
86. Наумов Д. Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. — 2011. — Т. 76, Вып. 6. — С. 764–780.
87. Cui Z., Maruyama Y., Mikami B. et al. Crystal structure of glycoside hydrolase family 78 α -l-rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL1 // J. Mol. Biol. — 2007. — V. 374, N 2. — P. 384–398.
88. Norouzi D. Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology // Iranian J. Biotechnol. — 2003. — V. 1, N 4. — P. 197–206.
89. Yadav S., Yadav V., Yadav Y. et al. Purification, characterization and application of α -l-rhamnosidase from *Penicillium citrinum* MTCC-8897 // Int. J. Food Sci. Technol. — 2012. — V. 47, N 2. — P. 290–298.
90. Hui N., Chen F., Cai H. Characterization and preparation of *Aspergillus niger* Naringinase for Debittering Citrus Juice // J. Food Science. — 2012. — V. 77, N 1. — P. C1–C7.
91. Vila-Real H., Alfaia A. J., Rosa J. N. et al. α -Rhamnosidase and β -glucosidase expressed by naringinase immobilized on new ionic liquid sol-gel matrices: Activity and stability studies // J. Biotechnol. — 2011. — V. 152, N 4. — P. 147–158.
92. Nunes M. A., Vila-Real H., Fernandes P. C. et al. Immobilization of naringinase in PVA-alginate matrix using an innovative technique // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2010. — V. 160, N 7. — P. 2129–2147.
93. Soria F., Ellenrieder G., Oliveira G. B. α -L-Rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilized on ferromagnetic supports // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2012. — V. 93, N 3. — P. 1127–1134.
94. Del Nobile M. A., Piergovanni L. Naringinase immobilisation in polymeric films intended for food packaging applications // J. Food Sci. — 2003. — V. 68, N 6. — P. 2046–2049.
95. González-Barrio R., Trindade L. M., Manzanares P. et al. Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal α -L-rhamnosidases // J. Agric. Food. Chem. — 2004. — V. 52, N 20. — P. 6136–6142.
96. Giavasis I., Harvey L. M., Mc Neil B. Gellan gum // Crit. Rev. Biotech. — 2000. — V. 20, N 3. — P. 177–211.
97. Chen Y. C., Shen S. C., Lin H. Y. Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids // Biochem. Pharmacol. — 2003. — V. 66, N 7. — P. 1139–1150.
98. Boyle P., Diehm C., Robertson C. Meta-analysis of clinical trials of Cyclo 3 Fort in the treatment of chronic venous insufficiency // Int. Angiol. — 2003. — V. 22, N 3. — P. 250–262.
99. Di Lazzaro A., Morana A., Schiraldi C. An enzymatic process for the production of the pharmacologically active glycoside desglucosides ruscogenin from *Ruscus aculeatus* // L. J. Mol. Catal. B. Enzym. — 2001. — V. 11. — P. 307–314.
100. Yokozawa T., Owada S. Effect of ginsenoside Rd in cephaloridine-induced renal disorder // Nephron. — 1999. — V. 81, N 2. — P. 200–207.
101. Tacatsu T., Takahashi S., Tacamatsu Y. et al. Cloropolysporins A, B, and C, novel glycopeptide antibiotics from *Faenia interjecta* p. Nov. IV. Partially deglycosylated derivatives // J. Antibiot. (Tokyo). — 1987. — V. 40, N 7. — P. 941–945.
102. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology // Nutr. Res. — 2004. — V. 24, N 10. — P. 851–874.
103. Trumler K., Effenberger F., Syldatk C. An integrated microbiol/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp., DSM 2847 // Eur. J. Lipid Sci. Technol. — 2003. — V. 105, N 10. — P. 563–571.
104. Patent Number WO200222847-A. Enzymatic production of purified antocyanins and crystalline products from natural resources, for use in (functional) foods, beverages, drugs and cosmetics / Matsumoto H., Hanamura S., Hirayama M. — 2002.
105. Patent Number WO2004027074-A2. Isoquercitrin-enriched composition prepared by incubating solution having rutin after adding naringinase, terminating the incubation, the proportion of isoquercitrin in composition being controlled by adjusting duration of incubation / Chang P. R., Muir A. — 2004.
106. Martearena M. R., Blanco S., Ellenrieder G. Synthesis of alkyl- α -L-rhamnosides by water soluble alcohols enzymatic glycosylation // Biores. Technol. — 2003. — V. 90, N 3. — P. 297–303.

МИКРОБНЫЕ α -L-РАМНОЗИДАЗЫ: ПРОДУЦЕНТЫ, СВОЙСТВА, ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Е. В. Гудзенко, Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Обзор посвящен α -L-рамнозидазам, которые гидролитически отщепляют концевые невосстановленные α -1,2-, α -1,4- и α -1,6-связанные остатки L-рамнозы в α -L-рамнозидах. Рассмотрены методы определения α -L-рамнозидазной активности с помощью как природных, так и синтетических субстратов. Эти энзимы найдены в растениях, у животных, дрожжей, грибов и бактерий. Показано, что наиболее активными биосинтетиками являются микромицеты. Описаны методы выделения и очистки α -L-рамнозидаз микробного происхождения, которые включают осаждение энзима с растворов органическими растворителями и нейтральными солями, диализ, ультрафильтрацию, гель-фильтрацию, ионообменную и афинную хроматографию. Обобщены данные о физико-химических свойствах (pH-оптимуме, термооптимуме, молекулярной массе), субстратной специфичности α -L-рамнозидаз. Установлено, что энзимные препараты, полученные от одних и тех же продуцентов при культивировании в присутствии различных индукторов, проявляли разную субстратную специфичность. Показано, что α -L-рамнозидазы относятся к гликозил-гидролазам с каталитическим доменом $(\alpha/\alpha)_6$ -барель. Биотехнологические свойства энзима направлены на использование в пищевой, фармацевтической и химической промышленности. В пищевой промышленности α -L-рамнозидазы применяют для улучшения качества напитков (уменьшения горечи, усиления аромата вин) и производстве пищевых добавок, в фармацевтической — для получения многих лекарственных препаратов, а также их предшественников, в химической — в качестве предшественников для производства рамнозы.

Ключевые слова: α -L-рамнозидаза, продуценты микробного происхождения, физико-химические свойства, субстратная специфичность, практическое использование.

MICROBIAL α -L-RHAMNOSIDASES: PRODUCERS, PROPERTIES AND PRACTICAL USE

O. V. Gudzenko, L. D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology
and Virology of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The review is concern with α -L-rhamnosidases that hydrolytically cleave the terminal unrecovered α -1, 2-, α -1, 4- and α -1, 6-linked rhamnose residues in α -L-rhamnosides. It was considered the methods of determination of α -L-rhamnosidase activity both with natural and synthetic substrates. These enzymes were found in plants, animals, yeasts, fungi and bacteria. It was shown that the most active biosynthetics are micromycetes. Methods of extraction and purification of α -L-rhamnosidases of microbial origin, which include the precipitation of enzyme from solutions by organic solvents and neutral salts, dialysis, ultrafiltration, gel-filtration and ion-exchange chromatography on columns are described. The data of physical and chemical properties (thermal and pH optima and molecular weight), substrate specificity of α -L-rhamnosidases were generalized. Enzymatic preparations that were obtained from the same producer during cultivation at the presence of different inductors showed different substrate specificity. α -L-Rhamnosidases refer to glycosyl-hydrolases with catalytic domen $(\alpha/\alpha)_6$ -barrel. Biotechnological properties of enzyme are directed to usage in food, pharmaceutical and chemical industries. In food industries, α -L-rhamnosidases are used for increasing of drinks quality (lowering of bitterness and improvement of wine aroma) and production of food additives. In pharmaceutical industry α -L-rhamnosidases could be used for obtaining of drugs and their precursors. In chemical one — as precursor for rhamnose production.

Key words: α -L-rhamnosidase, producers of microbial origin, physical and chemical properties, substrate specificity, industrial application.