

УДК 577.15:577.152.3

Олена Гудзенко, Наталія Борзова

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

ОТРИМАННЯ БІОДОСТУПНИХ ФЛАВОНОЇДІВ ШЛЯХОМ ЕНЗИМАТИЧНОГО ГІДРОЛІЗУ

Olena Gudzenko, Nataliya Borzova

OBTAINING BIOAVAILABLE FLAVONOIDS BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

Рослинні флавоноїди, ймовірно, найпоширеніші поліфеноли в раціоні людини. Вони широко розповсюджені в природі і зазвичай представлені у формі різних глікозидів, таких як глюкозиди, галактозиди, рамнозиди, арабінозиди та рутинозиди. Оскільки неодноразово відмічалось, що дієти багаті на флавоноїди супроводжуються низьким рівнем серцево-судинних, нейродегенеративних та онкологічних захворювань, в останні часи харчові добавки, що містять ці сполуки, набувають все більшої популярності серед споживачів. Але біодоступність таких флавоноїдів для людини є досить обмеженою, і це пов'язано саме з присутністю вуглеводів (рамнози, глюкози та галактози). Встановлено, що рутинозидний компонент (рамноза+глюкоза) флавоноїдів, які містяться у багатьох рослинних продуктах, є перешкодою для їх всмоктування у кишківнику. Є дані, що глюкозиди флавоноїдів засвоюються краще, ніж рамнозиди та рутинозиди, що пов'язане з присутністю у кишківнику відповідних гідролізуючих ензимів. Біодоступність флавоноїдів таким чином залежить від ензиматичної активності кішкової мікробіоти, для якої α -L-рамнозидазна та рутинозидазна активність не є характерною. Інтерес до α -L-рамнозидази обумовлений, значною мірою, саме її здатністю відщеплювати термінальну рамнозу, що відкриває широке поле можливостей для використання ензиму у біодеградації флавоноїдів. Ензиматична модифікація глікозидної компоненти флавоноїдів є ефективним засобом для отримання їх похідних.

Оскільки рамноза у різних флавоноїдних глікозидах приєднується різними зв'язками (α -1,2-, α -1,4-, α -1,6-) до глюкози, яка в свою чергу приєднується до аглікону у 3 або 7 положенні, виникає потреба у застосуванні селективних глікозидаз для розриву глікозидних зв'язків як всередині дисахариду, так і між вуглеводним фрагментом та флавоноїдним агліконом. Тому дослідження субстратної специфічності α -L-рамнозидази на різних субстратах – важливий етап отримання ефективних препаратів для біотрансформації рослинних поліфенолів та їх подальшого використання.

Рутин, гесперидин і нарингін належать до найбільш поширених форм зберігання глікозильованих флавоноїдів, виявлених в основному в гречці, яблуках, винограді, помідорах та цитрусових. Рутин та гесперидин легко виділяють з рослинних відходів виробництва фруктових соків у великих кількостях, що робить їх ідеальним вихідним матеріалом для отримання більш цінних глюкозидів флавоноїдів (головним чином, ізокверцитрину) та вільних флавоноїдів. Нарингін також є небажаним компонентом цитрусових соків, оскільки є причиною їх природної гіркоти, тоді як деглікозильовані прунін та неогесперидин не мають цього недоліку. Тому α -L-рамнозидази можуть бути використані у виробництві цитрусових соків для покращення їх смакових якостей. Також в результаті дерамнозилування рослинної сировини отримують значні кількості дешевої рамнози, яка використовується у фармацевтичній та косметологічній промисловості.

Переважну більшість відомих α -L-рамнозидаз отримують з мікроміцетів родів *Aspergillus* та *Penicillium*. Здатність гідролізувати нарингін, гесперидин, рутин,

нарцисін демонструють пробіотичні бактерії та бацили. Також описані і дріжджові продуценти α -L-рамнозидази з високим біотехнологічним потенціалом. Підвищений синтез ензиму отримували в результаті експресії α -L-рамнозидазних генів бактерій у *Pichia pastoris*, та шляхом імобілізації ензиму на різних носіях.

Однією з основних характеристик біотехнологічно важливих α -L-рамнозидаз є їх субстратна специфічність, оскільки ензими з різних джерел можуть характеризуватися як спорідненістю до широкого кола субстратів, так і специфічністю тільки до одного, наприклад, рутину чи гесперидину. Як правило, β -D-глюкозидази не використовуються як окремі ензими, але вони присутні в комерційних препаратах нарингинази і гесперидинази, що використовуються у промисловому деглікозилюванні нарингину. Небажана β -D-глюкозидазна активність препарату (наприклад при трансформації рутину у ізокверцитрин) може бути усунута шляхом підбору відповідного рН, температури і т.п.

Незважаючи на значні досягнення в області вивчення ензимів, потреби народного господарства України в препаратах з різною специфічністю в значній мірі задовольняються за рахунок імпорту. Тому актуальним є пошук потенційних вітчизняних продуцентів біологічно активних α -L-рамнозидаз. В цьому відношенні мікроорганізми є перспективним об'єктом дослідження, оскільки біотехнологічні процеси з їх участю мають ряд переваг перед використанням для цієї мети рослинної або тваринної сировини, а саме завдяки їх високій швидкості розмноження та здатності до контрольованого синтезу біологічно активних речовин. Саме це є причиною спрямованого пошуку високопродуктивних штамів мікроорганізмів для вирішення технологічних питань отримання ензимних препаратів зі специфічністю до флавоноїдів та галактоолігосахаридів.

Раніше в результаті скринінгу мікроорганізмів - представників різних таксономічних груп із Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України були виділені продуценти α -L-рамнозидаз . *Cryptococcus albidus* 1001 і *Eupenicillium erubescens* 248. З супернатанту культуральних рідин отримані очищені ферментні препарати. Досліджувані ензими проявляли вузьку специфічність щодо синтетичних похідних моносахаридів: α -L-рамнозидаза *E. erubescens* – лише до *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозиду (K_m 1,0 мМ), а *C. albidus* – до *n*-нітрофеніл- β -D-глюкопіранозиду (K_m 10 мМ). Обидва ензими досить ефективно гідролізують природні субстрати, причому α -L-рамнозидаза *E. erubescens* характеризується більш високими значеннями V_{max} , ніж ензим *C. albidus*. Але α -L-рамнозидаза *C. albidus* характеризувалась більшою спорідненістю до нарингину, ніж ензим *E. erubescens* (K_m 0,77 і 5,0 мМ відповідно). Дана властивість відкриває широкі перспективи для використання цих рамнозидаз у виробництві соків та вин. Але для цього необхідно, щоб ензими були стабільні при дії деяких речовин, зокрема глюкози і етанолу. Нами показано, що обидві α -L-рамнозидази зберігають до 80% активності при наявності в реакційному середовищі до 500 мМ глюкози. Встановлено, що α -L-рамнозидаза *C. albidus* зберігала до 75% активності при наявності в реакційній суміші до 20 % етанолу. Що стосується α -L-рамнозидази *E. erubescens*, то вона виявилась стабільною до 20% концентрації спирту, більш того, при цій концентрації фермент навіть проявляв активуючу дію, що встановлено нами вперше.

Оскільки α -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* гідролізують нарингін та неогесперидин і виявились стабільними до 20% етанолу та 500 мМ глюкози в реакційній суміші, цілком ймовірним є можливість їх використання в харчовій промисловості для виробництва соків і вин. Одержані результати можуть бути використані в подальших дослідженнях, спрямованих на практичне застосування даних ферментів для отримання біодоступних флавоноїдів.