

УДК 615.339:582.288:576.858

ВИКОРИСТАННЯ КОРМОВИХ ТА ПЕКАРСЬКИХ ДРІЖДЖІВ ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ГЛІКАНІВ

В. С. Підгорський
О. Г. Коваленко
В. М. Васильєв
О. В. Ісакова

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

E-mail: udajko@ukr.net

Досліджували можливість використання кормових (*Candida maltosa*) та пекарських (*Saccharomyces cerevisiae*) дріжджів для розробки технології отримання біологічно активних гліканів. Одержані сполуки представлені гомополісахаридами: мананами та глюканами. Перспективними сировинними джерелами є ензимолізати (вихід 14%) та автолізати (вихід 8,5%), менш придатними — інтактні клітини пекарських дріжджів, з яких за пропонованою технологією екстрагується глікан із загальним виходом 7,2%. Виділені глікани містять 75–94% діючої речовини і пригнічують інфекційність вірусу тютюнової мозаїки та утворення пухлин у експлантів паренхіми бульб картоплі, індукованих *Agrobacterium tumefaciens*. Глікани стимулюють схожість, енергію проростання насіння та ріст і розвиток рослин томатів і тютюну. Їх можна використовувати як основу для розробки технології отримання біопрепаратів для сільського господарства та медицини.

Ключові слова: дріжджі, технологія, *Candida maltosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, глікани, біологічна активність, вірус тютюнової мозаїки, *Agrobacterium tumefaciens*, тютюн, томати, картопля.

Відомо, що віруси, гриби та бактерії, які є небезпечними паразитами рослин, тварин і людини, справляють значний вплив на процеси кругообігу живої матерії, еволюції вищих організмів, екологічний стан довкілля, продуктивність рослин і тварин, біологічну безпеку, стан здоров'я людей. Існують принаймні два альтернативні підходи до обмеження й ліквідації інфекційних захворювань. Це, з одного боку, — вакцинація ослабленими формами патогенів чи їхніми компонентами — у медицині та ветеринарії, виведення і використання у практиці рослинництва стійких до інфекційних агентів форм рослин, а з іншого — профілактика і терапія хвороб за допомогою певних хімічних та біологічних чинників. Що стосується обмеження вірусних хвороб рослин, то одержання імунних і стійких до збудників сортів традиційними методами міжвидової гібридизації — досить трудомісткий і довготривалий процес, а генномодифіковані форми ще не набули поширення через складність їх отримання та непередбачуваність наслідків генетичної трансформації вищих організмів для довкілля. Терапія та профілактика вірусних захворювань рослин (і тварин також) ще не розроблені або малоефективні,

очевидно тому, що дослідники пропонували для цієї мети головним чином синтетичні антивірусні препарати — ксенобіотики, які поряд з антивірусною дією справляють значний токсичний вплив на організм хазяїна.

Ідея нашого підходу полягає у використанні для боротьби з вірусними та бактеріальними захворюваннями біогенних сполук — модуляторів та індукторів резистентності, які є легкодеградабельними й нешкідливими для людей, теплокровних тварин, рослин і довкілля загалом. Для реалізації цього підходу перспективним, на нашу думку, є комбонування речовин з різними механізмами дії в одному препараті, зокрема антиметаболітів, гліканів та гліколіпідів [1]. Останні як біогенні поверхнево активні речовини (біоПАР) можуть підсилювати дію гліканів [2], імовірно, завдяки поліпшенню поглинання полімерів тканинами та сприянню доставлення їх до відповідних мішеней.

Одним із джерел біологічно активних гліканів, зокрема таких, що мають різні види противірусної активності, є дріжджі [3]. З клітин та культуральних рідин дріжджів раніше було виділено полісахаридні препарати, які мали виражену інгібувальну активність стосовно вірусів, що уражують

рослин, тварин, а також людей [4]. Серед дріжджових полісахаридів найактивнішими щодо фітовірусів виявились глікополімери, які продукують різні види *Candida* спес. Вони представлені головним чином розгалуженими мананами, манопіраноза яких у головному ланцюзі зв'язана $\alpha(1\rightarrow6)$ -, а у бічних — $\alpha(1\rightarrow2)$ - та $\alpha(1\rightarrow3)$ -глікозидними зв'язками [5]. Однак технологія отримання гліканів для потреб сільського господарства на основі дріжджів наразі не розроблена.

Для вивчення біологічної, передусім антивірусної, активності дріжджових гліканів раніше як сировинний матеріал ми використовували культуральні рідини та біомасу дріжджів, продуковані музейними культурами переважно в лабораторних умовах [3, 5–7]. Маючи на меті розроблення технології отримання гліканів для сільського господарства і медицини, у цій роботі ми використовували промислові дріжджі — кормові та пекарські, з тим розрахунком, щоб у разі позитивного результату простіше було впровадити розроблену методику у виробництво за вже існуючими технологіями виготовлення дріжджової продукції. Про результати дослідження кормових та пекарських дріжджів як сировини для промислового виробництва полісахаридних препаратів, вивчення їхньої біологічної активності та фізико-хімічних характеристик йдеться у пропонованій статті.

Матеріали і методи

Як сировину для одержання біологічно активних гліканів використовували повітряно-суху біомасу кормових дріжджів, виготовлених на основі *Candida maltosa* на Кременчуцькому заводі протеїново-вітамінних концентратів на середовищі, що містило як джерело вуглецю рідкі *n*-алкани (C_{13} – C_{18}). Крім того, як сировинний матеріал досліджували біомасу, автолізат та ензимолізат пекарських дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*), вироблених на Ладизинському ЗАТ «Ензим» і люб'язно наданих О. А. Пономаренком.

Виділення гліканів з гомогенізованого у фарфоровій ступці сировинного матеріалу здійснювали, як зазначено в роботі [7]. Екстракцію цільового продукту проводили 5% -ю оцтовою кислотою (1:5, в/о) протягом 30 хв за температури 20–22 °С. Операцію виконували двічі. Осад відділяли центрифугуванням (7 000 об/хв, 15–20 хв), супернатант збирали, об'єднували, розчин нейтралізували (до рН 7,0) 5 Н NaOH і проводили діаліз

проти води для видалення ацетату натрію. Діалізат упарювали втричі на роторному випарювачі, потім висушували в сублімаційній сушарці.

Вихід препаратів визначали ваговим методом. Вміст протеїнів у досліджуваних препаратах встановлювали методом *M. M. Bradford* [8], вуглеводів — за реакцією фенол-сірчана кислота [9].

Аналіз моносахаридного складу гліканів, отриманих з кормових та пекарських дріжджів, проводили методом газорідинної хроматографії (ГРХ) у поєднанні з мас-спектроскопією (МС) [9, 10] у системі Agilent 6890N/inert (колонка PB-225mS, 30 м × 0,25 мм × 0,25 нм, газ-носії — гелій, швидкість потоку через колонку — 1 мл/хв). Для цього проводили гідроліз препаратів у 2Н H₂SO₄ при температурі 100 °С впродовж 4 год та отримували похідні моносахаридів у вигляді ацетатів поліолів. Ідентифікацію моносахаридів здійснювали, порівнюючи час утримання ацетатів поліолів дослідних і контрольних зразків з використанням комп'ютерної програми ChemStation. Кількісне відношення окремих моносахаридів визначали у відсотках до загальної суми площі всіх піків, що їх виявляли на хроматографі [10].

Вивчення антивірусної та протипухлинної активності гліканів. Антивірусну активність гліканів визначали, як і раніше [11], додаючи досліджувані речовини у концентрації 1–1000 мкг/мл до інокулюма, що містив водну суспензію (5 мкг/мл) вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ, штам U1), за 30 хв до інокуляції половинок листків рослин-індикаторів: дурману (*Datura stramonium* L. і *D. metel* L.), тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Імунний 580 та *Nicotiana sanderae* Hort. Протилежні, контрольні половинки листків інокулювали вірусом у тій самій концентрації за відсутності гліканів. Антивірусну дію гліканів оцінювали за кількістю вірусних локальних уражень (некротів), що з'являлись на листках на 5–7-й день після інокуляції.

Протипухлинну активність дріжджового манану (ДМ), виділеного з кормових дріжджів (*S. maltosa*), досліджували на експлантах (дисках завтовшки 2–3 мм, діаметром 1 см) паренхіми бульб картоплі сортів Слов'янка та Екстаз, інокульованих *A. tumefaciens* 9054). Експланти картоплі готували, як і раніше [12]. ДМ (0,2 та 1 г/л) у культурі тканин застосовували різними способами: а) додавали в розплавлений картопляний агар (КА), що слугував живильним середо-

вищем для експлантів; б) обробляли експланти стерильними розчинами ДМ (0,1 мл) до або після інокуляції їх бактерією. В окремих варіантах ці способи комбінували між собою. Для індукції пухлиноутворення бактеріальну культуру титром 10^8 кл/мл наносили на диски картоплі за 30 хв до або через 30 хв після оброблення їх біопрепаратом. У контрольних варіантах оброблені досліджуваними препаратами експланти не інокулювали (негативний контроль) або інокулювали тест-культурою, але обробляли в ті самі строки водою (позитивний контроль). Підрахунок кількості пухлин та визначення інтенсивності розвитку останніх здійснювали після культивування експлантів упродовж 2–3 тижнів за температури 22 °С.

Ступінь пригнічення вірусної та бактеріальної інфекції визначали, враховуючи кількість некрозів і пухлин у досліді й контролі, за формулою:

$$I = (1 - D/K) \times 100 (\%), \text{ де}$$

I — відсоток інгібування пухлин або некрозів;
 D — середнє значення кількості пухлин/некрозів у досліді; K — те ж саме в контролі.

Результати підрахунку некрозів та пухлин піддавали біометричній обробці за параметричними критеріями [13], вираховуючи їх середню кількість (M), різницю або відношення цих даних у досліді й контролі, середню похибку (m , m_d), критерій Стьюдента (t) і значущість різниці (відношення) даних (p). Останню в таблицях подавали в % надрядковими символами:

$$\begin{aligned} &+++ : p \leq 0.1\%; \quad ++ : 0.1\% < p \leq 1\%; \quad + : \\ &1\% < p \leq 5\%; \quad \circ : p > 5\%. \end{aligned}$$

Результати та обговорення

Виділення, фізичні властивості та моносхаридний склад гліканів. Що стосується пекарських дріжджів, то раніше ми не досліджували їх як сировинний матеріал для отримання біологічно активних гліканів. Відтак спочатку належало дослідити деякі фізичні характеристики антивірусних факторів у вихідному матеріалі, зокрема їхню стійкість до термообробки та здатність долати напівпроникну мембрану у процесі діалізу, щоб ідентифікувати їх з вивченими раніше полімерами, виділеними із кормових дріжджів [5, 6] та розробити технології отримання гліканів з урахуванням раніше використаних методик.

Проведені дослідження показали, що антивірусні фактори з пекарських дріжджів

є термостабільними, високомолекулярними сполуками, не втрачають своєї активності під час кип'ятіння і не проникають у процесі діалізу через целофанову мембрану (рис. 1), адже відомо, що целофан утримує речовини, молекулярна маса яких становить 7–10 кДа і вище [14]. З огляду на ці дані нами було застосовано раніше розроблений підхід до вилучення біологічно активних факторів, а саме — вибірковою екстракцією 5% -ю оцтовою кислотою з наступним осадженням органічним розчинником [7].

У результаті проведеної роботи з кормових (*C. maltosa*) та пекарських (*Sacch. cerevisiae*)

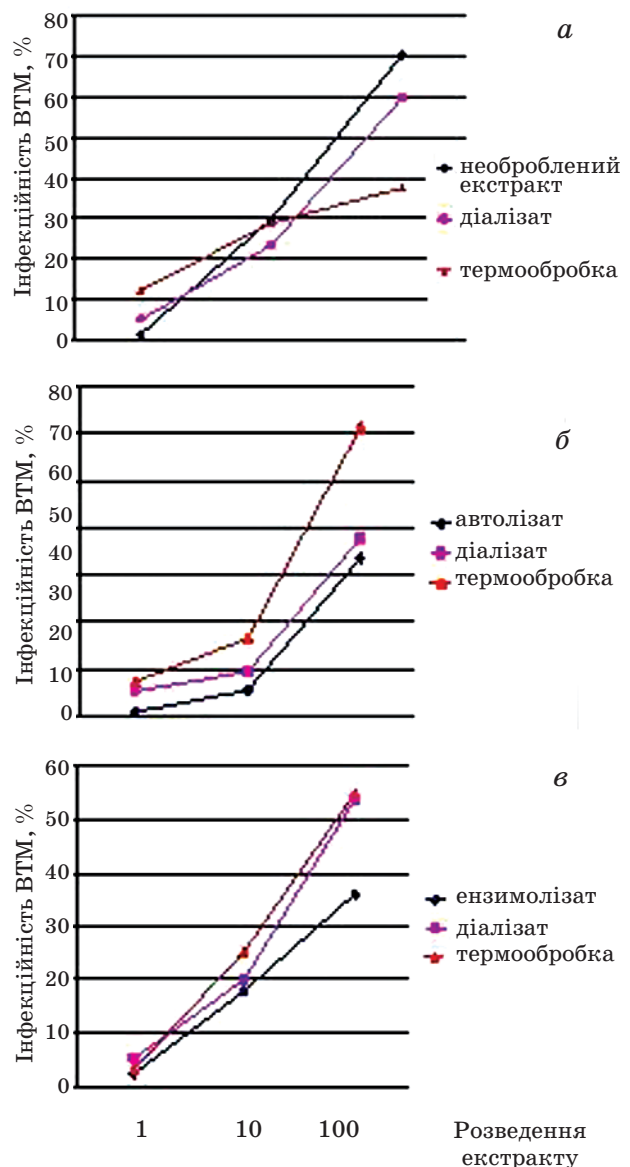


Рис. 1. Вплив діалізу та температури (100 °С, 10 хв) на антивірусну активність гліканів з інтактних клітин (а), автолізату (б), та ензимолізату (в) пекарських дріжджів

дріжджів було отримано глікани з виходом: 7,2% — із клітин (Д), 8,5% — з автолізу (А), 14,0% — ензимолізату (Е) пекарських дріжджів та 5,9% — дріжджового манану (ДМ) [5] з біомаси кормових дріжджів (табл. 1). Вміст вуглеводів у їхньому складі коливається від 76 до 94%, домішки протеїнів не перевищують 0,8–2,6%. Слід зазначити, що в процесі центрифугування «оцтових кислих гомогенатів» ензимолізату частина твердої фази концентрувалась на поверхні розчину. З метою визначення хімічної природи та біологічної активності факторів, присутніх у флотаційній фракції, нами було проведено повторну екстракцію кислоторозчинних речовин 5%-ю CH_3COOH . У результаті з флотаційної фракції ензимолізату було отримано полісахаридний препарат з виходом 0,7% (флотат ензимолізату — ФЕ). У складі препарату ФЕ виявлено 74,5% вуглеводів та 2,9% протеїнів.

Таблиця 1. Вихід препаратів, виділених із дріжджової сировини, та вміст у них вуглеводів і протеїнів (%)

Джерело препарату	Вихід	Вуглеводи	Протеїни
<i>Sacch. cerevisiae</i> , клітини (Д)	7,2	76,0	0,9–1,5
<i>Sacch. cerevisiae</i> , автолізат (А)	8,5	84,0	0,8–1,3
<i>Sacch. cerevisiae</i> , ензимолізат (Е)	14,0	84,0	1,6
<i>Sacch. cerevisiae</i> , флотат ензимолізату (ФЕ)	0,7	74,5	2,9
<i>C. maltosa</i> , клітини (ДМ)	5,9	94,0	2,6

Виділені препарати після висушування та гомогенізації мають вигляд аморфних порошоків світло-коричневого кольору, добре розчиняються у воді, негігроскопічні, зберігаються при кімнатній температурі без втрати порошкоподібної консистенції, кольору та біологічної активності.

Визначення моносахаридного складу препаратів за допомогою методу ГРХ–МС, показало, що вміст мономерів у різних препаратах істотно варіює, що добре видно з поданих хроматограм (рис. 2). У препаратах А та Е, отриманих відповідно з автолізу та ензимолізату пекарських дріжджів, а також препарату ДМ — із кормових дріжджів головним структурним компонентом є маноза, у препараті Д, одержаному з клітин пекарських дріжджів, — глюкоза (табл. 2).

У складі гідролізатів окремих препаратів як мінорні компоненти виявлено галактозу, рибозу та арабінозу, а також остаточно не ідентифіковані компоненти — X_1 та X_2 . Відповідно до послідовності виходу моносахаридів та часу їх утримування на колонці компонент X_2 флотуючої фракції ензимолізату (ФЕ), що на хроматограмі йде відразу за глюкозою, може бути ідозою [15]. Таке припущення узгоджується з результатами мас-спектрометрії, згідно з якими компонент X_2 зі значною вірогідністю ідентифікується як гексаацетат ідитолу. Як відомо, ідоза є одним із восьми стереоізомерів альдогексоз, зокрема оптичним ізомером глюкози [16]. Для ідентифікації компонента X_1 , а також для уточнення ідентифікації компонента X_2 потрібні подальші дослідження.

Антифитовірусна активність. Глікани мікроорганізмів та вищих грибів мають різноманітну біологічну активність [4, 17], яка може бути корисною для застосування в різних галузях сільського господарства, зокрема для захисту рослин від бактеріальних та вірусних захворювань. Як згадувалось вище, серед інфекційних хвороб рослин високу питому вагу, як за поширеністю, так і за шкодочинністю, мають захворювання вірусної етіології. Тому вивчення противірусної активності виділених із дріжджів гліканових препаратів ми розглядали як першочергове завдання нашої подальшої роботи.

Випробування антивірусної активності виділених препаратів на дурмані показало, що всі вони різною мірою пригнічують інфекційну активність ВТМ: сильніше препарати А (з автолізу), Е та ФЕ (з ензимолізату), слабше — препарат Д (з інтактних клітин) пекарських дріжджів (рис. 3). Утім, активність цих препаратів дещо поступається активності препарату, одержаного з кормових дріжджів (рис. 4). Останній виявився високоактивним щодо ВТМ навіть у мінімальній (1 мкг/мл) концентрації.

Було також встановлено, що ДМ-препарат із кормових дріжджів пригнічує активність ВТМ не лише на дурмані, але й інших рослинах-індикаторах, зокрема на *D. metel* L., тютюні (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Імунний 580 та *Nicotiana sanderae* (табл. 3).

Противухлинна активність. Серед хвороб сільськогосподарських рослин важливе економічне значення мають бактеріальні хвороби, зокрема бактеріальний рак, спричинюваний ґрунтовою бактерією *Agrobacterium tumefaciens*. Генетичною детермінантою, що зумовлює розвиток захворювання,

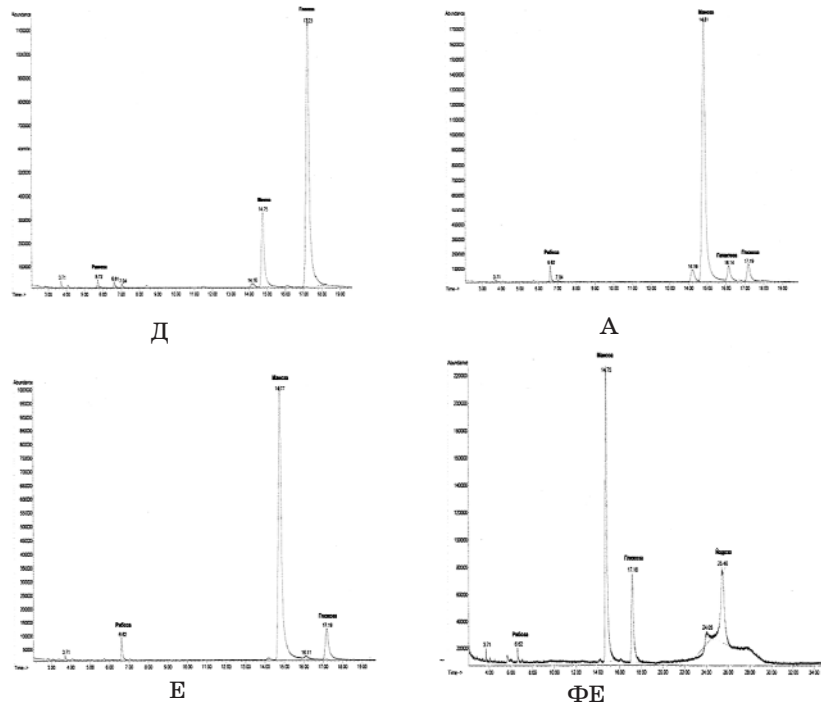


Рис. 2. Газорідинні хроматограми препаратів, виділених з інтактних клітин (Д), автолізу (А), ензимолізату (Е) пекарських дріжджів; ФЕ — препарат, отриманий із флотаційної фракції ензимолізату

Таблиця 2. Моносахаридний склад препаратів гліканів, %

Джерело препарату	Моносахариди						
	Rib	Ara	X1	Man	Gal	Glc	X2
<i>S. cerevisiae</i> , клітини (Д)	0,53	0,35	1,07	18,75	–	78,30	–
Те саме, автолізат (А)	1,89	0,21	4,18	83,63	4,88	5,13	–
Те саме, ензимолізат (Е)	2,72	–	–	84,70	2,98	10,50	–
Те саме, флотат (ФЕ)	–	–	–	51,41	–	18,60	25,46
<i>C. maltosa</i> , біомаса (ДМ)	3,24	–	–	72,0	–	24,76	–

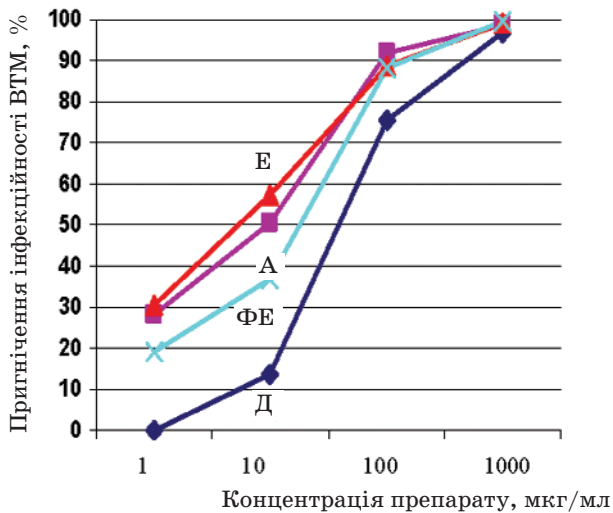


Рис. 3. Антивірусна активність гліканових препаратів, виділених з інтактних клітин (Д), автолізу (А) та ензимолізату (Е, ФЕ) пекарських дріжджів

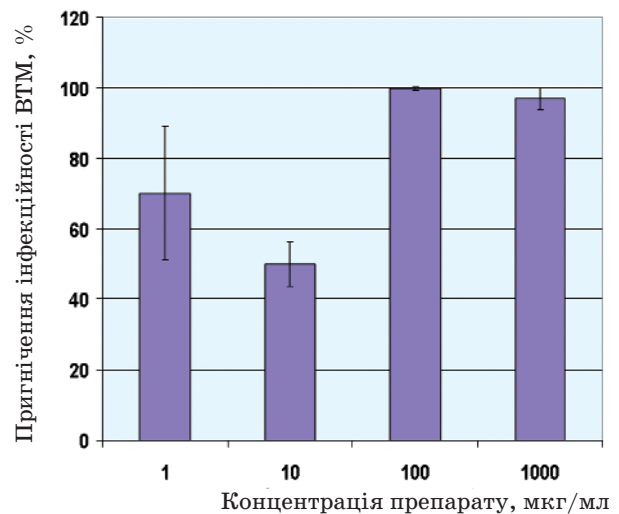


Рис. 4. Антивірусна активність препарату ДМ, виділеного з кормових дріжджів

Таблиця 3. Гальмівна активність препарату ДМ, виділеного з біомаси *S. maltosa*, у різних системах ВТМ — рослина-хазяїн

Рослина-хазяїн	Концентрація, мкг/мл	Кількість некрозів / лист		Пригнічення, %
		у досліді	в контролі	
Дурман (<i>D. stramonium</i>)	1 000	0	53,5	100,0 ⁺⁺⁺
	100	4,5	52,3	91,4 ⁺⁺⁺
Квасоля (<i>Ph. vulgaris</i>), сорт Первомайський	1 000	0	11,3	100,0 ⁺⁺⁺
	100	16,0	17,0	5,9 [°]
Тютюн (<i>N. tabacum</i>), сорт Імунний 580	1 000	18,5	105,2	82,4 ⁺⁺
	100	67,9	95,5	28,9 ⁺
Дурман (<i>D. metel</i>)	1 000	1,4	35,6	96,1 ⁺⁺⁺
	100	2,8	27,3	89,7 ⁺⁺⁺

Примітка: ⁺⁺⁺: $p \leq 0.1\%$; ⁺⁺: $0.1\% < p \leq 1\%$; ⁺: $1\% < p \leq 5\%$; [°]: $p > 5\%$.

як відомо, є Ті-плазмід, здатна інтегруватися в клітинний геном і викликати гіперплазію рослинних тканин [18]. Особливо значних збитків бактеріальний рак завдає виноградарству [19]. Тому важливо було встановити, чи здатні речовини, продукovanі дріжджами, зокрема розгалужений ДМ *Candida maltosa* [5], пригнічувати пухлиноутворювальну активність *A. tumefaciens*. У досліді ми використали культуру паренхіми бульб картоплі, інфікованої цією бактерією [20].

Дослідження показали, що застосування ДМ як профілактичного засобу (за 30 хв до адсорбції бактерій на поверхні експлантів паренхіми бульб картоплі), навіть у невисокій концентрації (0,2 г/л), призводить до майже повного пригнічення (98%) пухлиноутворення (табл. 4). Утім, нанесення ДМ вже через 30 хв після інфікування тканин *A. tumefaciens* у низькій концентрації не

супроводжувалось помітним пригніченням процесу пухлиноутворення. Істотного пригнічення росту пухлин вдавалося досягти лише тоді, коли ДМ у концентрації 1 мг/мл вносили в культуральне середовище (63%) або ж коли цей спосіб комбінували з обробленням експлантів до (70,4%) чи після (99,7%) інфікування тканини агробактерією. Тобто, значного захисту тканин від індукованої гіперплазії паренхімних клітин картоплі вдається досягти лише за підвищеної концентрації полісахариду та за комбінування різних способів його застосування.

Багаторічний досвід роботи з полісахаридами дає підстави для висновку, що біологічна дія досліджуваних мананів та глюканів зумовлена їхніми структурними особливостями [4]. У визначенні захисних властивостей полісахаридів, очевидно, важлива роль належить розгалуженості глікопіранозного ланцюга та значній кількості $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -гліко-

Таблиця 4. Вплив препарату ДМ на пухлиноутворення, індуковане *A. tumefaciens*, в експлантах паренхіми бульб картоплі сорту Слов'янка

Концентрація, г/л	Додавання препарату	Кількість пухлин / експлант	
		М±m	%
0,2	На експлант за 30 хв до інфікування	0,25±0,02	2,0 ⁺⁺⁺
	На експлант через 30 хв після інфікування	12,0±0,1	94,5 [°]
	Без препарату (контроль)	12,7±0,2	100,0
1	У середовище	1,0±0,1	37,0 ⁺
	У середовище + на експлант за 30 хв до інфікування	0,8±0,2	29,6 ⁺⁺
	У середовище + на експлант через 30 хв після інфікування	0,1±0,01	0,3 ⁺⁺⁺
	Без препарату (контроль)	2,7±0,4	100,0

Примітка: ⁺⁺⁺: $p \leq 0.1\%$; ⁺⁺: $0.1\% < p \leq 1\%$; ⁺: $1\% < p \leq 5\%$; [°]: $p > 5\%$.

зидних зв'язків між мономерами в бокових відгалуженнях полімеру [5], здатних утворювати структури вищого порядку з іншими біополімерами, зокрема лектиноподібними протеїнами, що лежать в основі тригерних механізмів ініціації захисних реакцій у рослин та розпізнавання патогена хазяїном [21, 22]. Різноманітність дії гліканів типу ДМ (антивірусна, антибактеріальна та протипухлинна активність) пов'язана з хімічною структурою макромолекул і свідчить про певну універсальність процесів протеїн-вуглеводного впізнавання, що має місце в патологічних процесах у рослин, зумовлених різними чинниками.

Вплив гліканів на фізіологічну активність насіння. Оскільки вилучені глікани можуть бути застосовані для захисту рослин від інфекційних захворювань, важливо було дослідити, як отримані препарати можуть впливати на деякі фізіологічні функції рослин, зокрема на схожість та динаміку проростання насіння, а також накопичення вегетативної маси і ріст кореневої системи проростків. Саме обробка захисними агентами насіння може бути найбільш простим і економічним способом застосування даних препаратів у рослинництві.

Раніше нами було проведено дослідження препарату ДМ, виділеного з дріжджів *S. maltosa*, якими встановлено значний стимулювальний вплив цього глікану на проростання насіння м'якої пшениці [23]. У цій роботі ми мали на меті перевірити вплив манану, продукованого пекарськими дріжджами *S. cerevisiae* та виділеного з ензимолізату дріжджових клітин (препарат Е), на схожість та динаміку проростання насіння тютюну і томатів. Виділений препарат за хімічною будовою є мананом, подібним до випробуваного раніше препарату ДМ із кормових дріжджів. Цей препарат використовували в різних концентраціях (1–5 мг/мл), змочуючи насіння та проростки, що містилися на паперових фільтрах у чашках Петрі, упродовж усього дослідження (7–10 діб). Враховували схожість насіння в динаміці (енергія проростання), накопичення біомаси та довжину коренів проростків.

Встановлено, що глікановий препарат Е у концентрації 1 мг/мл стимулював схожість і енергію проростання насіння тютюну сорту Імунний 580 (рис. 5). У вищій концентрації (2,5–5 мг/мл) він не впливав на ці показники, проте суттєво стимулював накопичення вегетативної маси проростків (рис. 6).

Аналогічні результати було отримано й на іншій культурі — томатах сорту Бала-

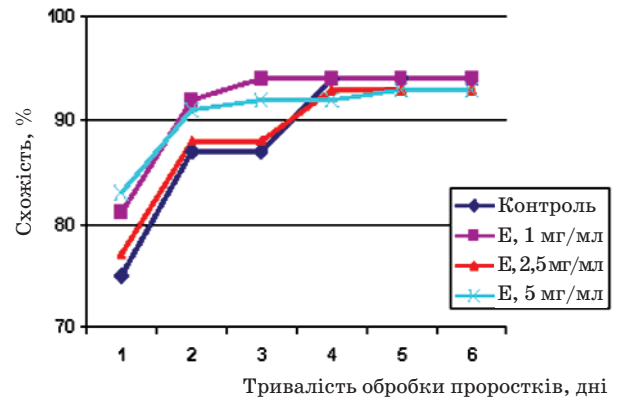


Рис. 5. Динаміка проростання насіння тютюну в присутності препарату Е, виділеного з ензимолізату пекарських дріжджів

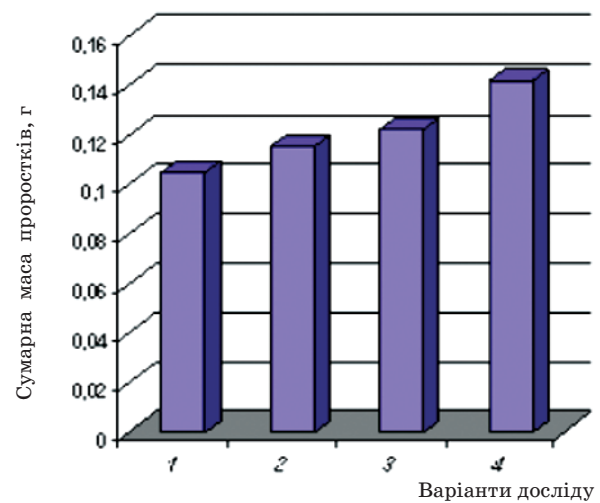


Рис. 6. Біомаса проростків тютюну, оброблених препаратом Е, виділим з ензимолізату пекарських дріжджів: 1 — контроль; 2, 3, 4 — дослід (концентрація препарату — 1; 2,5 та 5 мг/мл відповідно)

да. Препарат Е у концентрації 1 мг/мл стимулював енергію проростання насіння (рис. 7), суттєво не впливаючи на накопичення біомаси (дані не наведено), у всіх випробуваних концентраціях помітно стимулював ріст кореневої системи проростків (рис. 8). Остання властивість препарату може бути вельми корисною під час вирощування томатів в умовах закритого ґрунту, особливо в гідропонній культурі.

Отримані результати загалом свідчать про перспективність використання дріжджів як біотехнологічних об'єктів для отримання біопрепаратів для сільського господарства і медицини, зокрема, як можливих компонентів комплексних біопрепаратів для захисту рослин від вірусних та бактеріальних

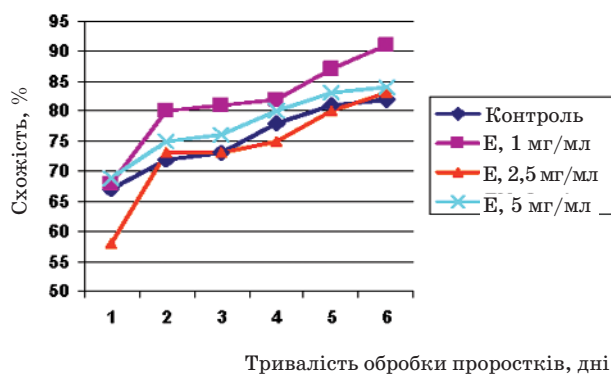


Рис. 7. Динаміка проростання насіння томату, обробленого різними концентраціями препарату Е, виділеного з ензимолізату пекарських дріжджів

захворювань. Важливими допоміжними засобами для суттєвого підсилення біологічної дії гліканів можуть бути різні поверхнево-активні речовини, особливо біологічного походження [1, 2, 12].

Таким чином, кормові (*Candida maltosa*) та пекарські (*Saccharomyces cerevisiae*) дріжджі є перспективними сировинними джерелами для отримання біологічно активних препаратів на основі гліканів. Виділені препарати представлені головним чином гомополісахаридами: мананами та глюканами. Більш придатними для отримання препаратів є ензимолізати (вихід 14%) та автолізати (вихід 8,5%) пекарських і біомаса кормових (вихід 5,9%) дріжджів, з яких можна отримувати манани, менш придатними — інтактні клітини сахароміцетів, з яких за пропонуваною біотехнологією екстрагується глюкан із загальним виходом 7,2%. Виділені препарати містять 75–94%



Диски із паренхіми бульб картоплі сорту Слов'янка, оброблені дріжджовим мананом (0,2 г/л) до або після інокуляції *A.tumefaciens*

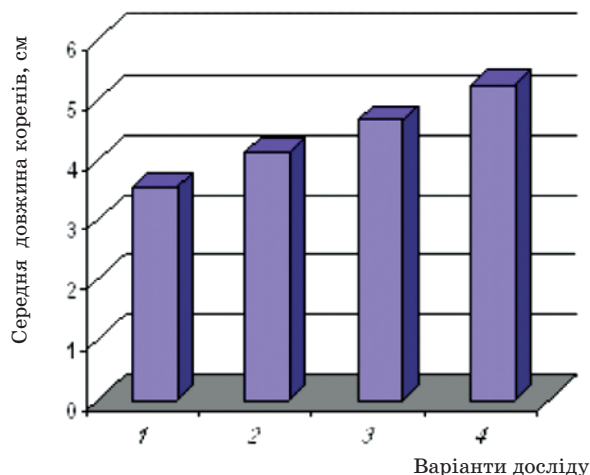
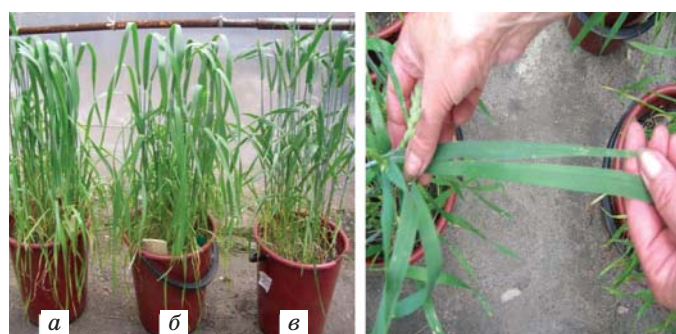


Рис. 8. Вплив препарату Е, виділеного з ензимолізату пекарських дріжджів, на ріст коренів у проростків томату: 1 — контроль; 2, 3, 4 — дослід (концентрація препарату — 1; 2,5 та 5 мг/мл відповідно)

діючої речовини і справляють виражений інгібувальний вплив на інфекційність вірусу тютюнової мозаїки та утворення пухлин, індукованих *Agrobacterium tumefaciens* у експлантів паренхіми бульб картоплі. Препарати гліканів стимулюють схожість, енергію проростання насіння, ріст і розвиток рослин томатів та тютюну. Виділені препарати можуть бути використані при розробленні комплексних біопрепаратів для боротьби з вірусними і бактеріальними хворобами сільськогосподарських рослин.

Роботу виконано частково за фінансової підтримки УНТЦ (проект 4973).

Автори щиро вдячні к.б.н. Л. М. Ващенко за надання музейної культури *A. tumefaciens* 9054 для досліджень.



Вплив біопрепаратів, сформованих на основі гліканів, на ріст та розвиток пшениці Зимоярка:

а) біопрепарат;
б) біопрепарат + біоПАВ;
в) контроль.

Прапорцевий лист:
внизу — біопрепарат,
зверху — контроль

ЛІТЕРАТУРА

1. *Kovalenko O. G.* Study of complex preparations as a way of plant protection from viral and bacterial infections // 5th Internat. Conf. «Bioresources and Viruses», Kyiv, September 10–13, 2007. — С. 71.
2. *Kovalenko O. G., Kirichenko A. M., Shepelevich V. V. et al.* Complex preparations as means of plants recovery and protection against viral infections // Вісник КНУ. Біологія. — 2008. — Вип. 51. — С. 35–37.
3. *Коваленко О. Г.* Молекулярно-біологічні аспекти природної та індукованої стійкості рослин до вірусів. Автореф. дис. ... докт. біол. наук: 03.00.06. / Ін-т мікробіол. і вірусол., 1996. — 48 с.
4. *Kovalenko A. G.* Antivirale Eigenschaften mikrobieller Polysaccharide — ein Überblick // Zbl. Mikrobiol. — 1987. — V. 143, N 3. — P. 301–310.
5. *Коваленко О. Г., Шашков О. С., Васильев В. М., Телегеева Т. А.* Структурні особливості та біологічна активність мананів *Candida* sp. // Біополімери і клітина. — 1995. — Т. 11, № 3, 4. — С. 77–84.
6. *Коваленко О. Г., Баркалова А. О.* Одержання біологічно активних мананвмісних препаратів з дріжджів // Мікробіол. журн. — 1995. — Т. 57, № 3. — С. 81–84.
7. *Пат. 6524 UA C1, A01N63/00 (A01N63/00; 43:64).* Спосіб одержання антивірусного препарату із дріжджів / О. Г. Коваленко, А. Д. Бобир, Т. Д. Грабіна, А. О. Баркалова. — Заявл. 13.12.1994. Опубл. 09.06.1995. Бюл. № 3.
8. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — V. 72, N 1. — P. 248–254.
9. *Варбанец Л. Д., Здоровенко Г. М., Книрель Ю. А.* Методы исследования эндотоксинов. — К.: Наук. думка, 2006. — 237 с.
10. *Sawardeker J. S., Sloneker J. H., Jeanes A.* Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. — 1965. — V. 37, N 5. — P. 1602–1603.
11. *Коваленко А. Г., Васильев В. Н., Воцелко С. К.* Исследование антивирусных веществ, продуцируемых дрожжами — 2. Физико-химическая характеристика полисахаридных препаратов // Микробиол. журн. — 1978. — Т. 40, № 6. — С. 767–772.
12. *Kovalenko O. G., Polishchuk O. N., Isakova V. O.* Antitumor activity of some complex preparations in the culture of potato cells transformed by *Agrobacterium tumefaciens* // Cytology and Genetics. — 2009. — V. 43, N 3. — P. 164–168.
13. *Молостов А. С.* Элементы вариационной статистики. — К.: Урожай, 1965. — 180 с.
14. Лабораторная техника биологической химии / Под ред. Б. Кейл. — М.: Мир, 1966. — 752 с.
15. *Fazio S. A., Uhlinger D. J., Parker J. H., White D. S.* Estimation of uronic acids as quantitative measures of extracellular and cell wall polysaccharide polymers from environmental samples // Appl. Environm. Microbiol. — 1982. — V. 43, N 5. — P. 1151–1159.
16. *Bertram F. R., Tatsuta K., Theim J.* Glicosience. Chemistry and chemical biology. 2nd Edition. — Berlin, Heidelberg, New-York: Springer-Verlag, 2008. — 2874 p.
17. *Поліщук О. М., Коваленко О. Г.* Біологічна активність глікополімерів базидіальних грибів // Біополімери і клітина. — 2009. — Т. 25, № 3. — С. 181–193.
18. *Потопальський А. І., Ткачук З. Ю.* Пухлини і нарости у рослин. — К.: Вища школа, 1985. — 184 с.
19. *Мулюкіна Н. А.* Бактеріальний рак винограду: причини поширення та заходи боротьби із хворобою // Науковий вісник ХНАУ. — 2007. — № 5: Рослиництво, селекція, насінництво, овочівництво. — С. 140–147.
20. *Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Ващенко Л. М.* Вплив ліпополісахарид-білкового комплексу *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* на процес пухлиноутворення, спричинений *Agrobacterium tumefaciens* // Мікробіол. журн. — 2003. — Т. 65, № 3. — С. 5–13.
21. *Дьяков Ю. Т., Коваленко А. Г.* Механизмы устойчивости растений к вирусам и грибам. — М.: ВИНТИ, 1983. — 167 с.
22. *Коваленко А. Г.* Белок-углеводное взаимодействие в реализации устойчивости растений к вирусам // Микробиол. журн. — 1993. — Т. 55, № 6. — С. 76–91.
23. *Чугункова Т. В., Коваленко О. Г.* Вплив дріжджового манану на проростання насіння м'якої пшениці // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2009. — Т. 7, № 1. — С. 108–113.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОРМОВЫХ
И ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ГЛИКАНОВ**

*В. С. Подгорский
А. Г. Коваленко
В. Н. Васильев
В. А. Исакова*

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

E-mail: udajko@ukr.net

Исследовали возможность использования кормовых (*Candida maltosa*) и пекарских (*Saccharomyces cerevisiae*) дрожжей для получения биологически активных гликанов. Полученные соединения представлены гомополисахаридами: маннанами и глюканами. Перспективны для получения биологически активных гликанов энзимоллизаты (выход 14%) и автолизаты (выход 8,5%), менее пригодны — интактные клетки пекарских дрожжей, из которых с помощью предлагаемой технологии экстрагируется гликан с суммарным выходом 7,2%. Выделенные гликаны содержат 75–94% действующего вещества и угнетают инфекционность вируса табачной мозаики и образование опухолей в эксплантах паренхимы клубней картофеля, индуцированных *Agrobacterium tumefaciens*. Гликаны стимулируют всхожесть, энергию прорастания семян, рост и развитие проростков томатов и табака. Их можно использовать как основу при разработке технологии получения биопрепаратов для сельского хозяйства и медицины.

Ключевые слова: дрожжи, технология, *Candida maltosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, гликаны, биологическая активность, вирус табачной мозаики, *Agrobacterium tumefaciens*, табак, томаты, картофель.

**FODDER AND BAKER YEASTS
USING FOR PRODUCTION
OF BIOLOGICALLY ACTIVE
GLYCANS**

*V. S. Podgorsky
O. G. Kovalenko
V. N. Vasylyiev
V. O. Isakova*

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

E-mail: udajko@ukr.net

Fodder (*Candida maltosa*) and baker (*Saccharomyces cerevisiae*) yeasts using for biologically active glycans obtaining have been studied. The isolated glycans contained homopolysaccharides mannans and glucans. The enzyme- (yield 14%) and autolysates (yield 8,5%) appeared to be perspective for obtaining the biologically active polysaccharides. The intact cells of baker yeasts were less suitable (yield of extracted glucan using the proposed technology was 7,2%). The isolated glycans contained 75–94% of active element and showed the marked inhibiting effect against the tobacco mosaic virus infectiveness and *Agrobacterium tumefaciens* induction of tumours in the explants of potatoes tubers parenchime. The glycan preparations stimulated germinating power, energy of seeds sprouting, growth and development of tomatoes and tobacco. They may be used in elaboration of complex biopreparations intended for control of virus and bacterial diseases of agricultural plants and in medicine.

Key words: yeasts, *Candida maltosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, glycans, biological activity, tobacco mosaic virus, *Agrobacterium tumefaciens*, tobacco, tomatoes, potato.