

О.Г. Мамеева, С.С. Нагорная, А.М. Остапчук, В.С. Подгорский

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН
Украины, ул. Заболотного 154, Киев, ДСП, Д03680, Украина,
тел.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ДРОЖЖЕЙ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* (SAITO) SKINNER

*Изучен моносахаридный состав внеклеточных полисахаридных препаратов дрожжей *C. albidus* УКМ У-1028, 1063 и 1066, доминирующим углеводом которых была манноза (до 67 %). Отобран штамм *C. albidus* УКМ У-1066, в составе внеклеточных полисахаридов которого преобладали манноза (58 %), глюкоза (21 %) и ксилоза (16 %). Полученный препарат может быть использован в качестве сорбента микотоксинов.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: *Cryptococcus albidus*, внеклеточные полисахариды, моносахаридный состав.*

Дрожжи выгодно отличаются от бактериальных культур способностью образовывать ценные и малотоксичные полисахариды. Наиболее известными и изученными продуцентами внеклеточных полисахаридов являются дрожжи родов *Cryptococcus* Vuillemin и *Rhodotorula* Harrison прежде всего потому, что важным таксономическим признаком, отличающим между собой дрожжи данных родов, является моносахаридный состав именно их внеклеточных полисахаридов [4, 11, 14]. При этом получение и изучение различных полисахаридных препаратов проводилось с целью их использования в фармацевтической и пищевой промышленности [2, 5].

В настоящее время также актуален вопрос использования внеклеточных полисахаридов в животноводстве и кормопроизводстве в качестве компонента препаратов, применяемых для профилактики микотоксикозов [8]. В состав таких препаратов и кормовых добавок входят олигосахариды маннозы и β -D-глюканы. Разрабатываются специальные продукты для птицеводства на основе этих компонентов, содержащие, в основном, глюкоманнаны, выделяемые из стенок дрожжевых клеток [16, 17]. Глюкоманнаны, полученные таким образом, имеют высокую стоимость, в отличие от препаратов внеклеточных полисахаридов дрожжей, которые также в своём составе содержат как олигосахариды маннозы, так и β -D-глюканы. В связи с этим представляет интерес поиск активных штаммов криптококков — продуцентов внеклеточных маннанов и глюканов.

Целью настоящей работы было изучение моносахаридного состава внеклеточных полисахаридов дрожжей *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner.

Материалы и методы

Объектом исследований были 9 штаммов *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner (1947) из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ), выделенные из пресных водоёмов, рек, ила и филлосферы кукурузы.

© О.Г. Мамеева, С.С. Нагорная, А.М. Остапчук, В.С. Подгорский, 2008



В работе использовали следующие среды:

среда Ридер, содержащая (г/л дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,0, K_2HPO_4 — 0,1, KH_2PO_4 — 1,0, MgSO_4 — 0,7, NaCl — 0,5, глюкоза — 1 %, дрожжевой экстракт — 0,1 %, pH 4,2;

среда Харада, содержащая (г/л водопроводной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,5, KH_2PO_4 — 1,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, NaCl — 0,5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, глюкоза — 5 %, комплекс витаминов группы В, pH 4,2;

среда Голубева, содержащая (г/л дистиллированной воды): Na_2HPO_4 — 7,2, KH_2PO_4 — 3,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, NaCl — 0,5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,0015, глюкоза — 5 %, пептон — 0,2 %, дрожжевой автолизат — 10 мл, pH 4,2 [3, 7].

Посевной материал выращивали в течение 48 час на сусло-агаре. В работе использовали культуры дрожжей, предварительно выращенные на вышеуказанных средах в колбах Эрленмейера объёмом 750 мл, содержащих 150 мл питательной среды при 28 °С на качалках (240 об./мин) в течение 5 суток. Оценивали прирост биомассы (измеряли фотоэлектроколориметрически в пересчёте на абсолютно сухой вес) и капсулообразование (метод негативного контрастирования тушью по Дюгиду) у исследуемых культур дрожжей [10].

Для изучения углеводных компонентов клетки использовали различные подходы. Биомассу клеток растирали с ацетоном в соотношении 1:1, через 24 часа фильтровали и центрифугировали фильтрат при 5000 g 20 мин. Для получения препаратов внеклеточных полисахаридов в центрифугат культуральной жидкости добавляли два объёма 96 %-ного этанола, осадок полисахарида отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин. В другом варианте клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием 5000 g в течение 30 мин. К супернатанту, подкисленному концентрированной уксусной кислотой до pH 3,0, добавляли два объёма этанола 96 % или один объём ацетона, осадок полисахарида отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин., трижды промывали его ацетоном. Отсутствие клеток в супернатантах контролировали микроскопированием [2 — 5].

Идентификацию нейтральных моносахаридов проводили после гидролиза препаратов в 2 N HCl на протяжении 4-5 час при температуре 100 °С. Пробы для анализа препаратов готовили по методу Albersheim с соавторами [12]. Гидролизат упаривали досуха, трижды промывали дистиллированной водой на роторном испарителе при температуре 45-50 °С. Пробу ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды, добавляли боргидрид Na, оставляли в тёмном месте на 12 часов, после чего pH доводили до нейтрального значения при помощи смолы КУ-2 в H^+ форме. Освобождённый от смолы фильтрат упаривали досуха, затем трижды промывали метанолом на роторном испарителе при комнатной температуре. К пробе добавляли 0,5 мл пиридина (перегнанного) и 0,5 мл уксусного ангидрида, гидролизировали 15 мин. при 100 °С. Пробы высушивали, ресуспендировали в 2-3 мл хлороформа и центрифугировали при 2500 g, 20 мин. После чего супернатант, содержащий смесь нейтральных моносахаридов в виде ацетатов полиолов, разделяли на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert, колонка DB-225 mS 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм, газ носитель — гелий, поток через колонку 1 мл/мин. Температура испарения — 250 °С, интерфейса — 280 °С, термостата — 220 °С (изотермический режим). Пробу вводили с делением потока 1:100. Иден-



тификацию моносахаридов проводили при помощи сравнения времени удержания ацетатов полиолов стандартных и исследуемых образцов, и также с использованием компьютерной базы данных ChemStation. Количественное соотношение отдельных моносахаридов определяли в процентах от суммы площадей пиков.

Определение количества углеводов проводили по Dubois et al. [13]. 1 мг препарата полисахарида растворяли в 1 мл дистиллированной воды. К 0,1 мл исследуемого раствора добавляли 0,4 мл H_2O , 0,5 мл 5 %-ного фенола и 2,5 мл H_2SO_4 (конц.). Выдерживали смесь при комнатной температуре в течение 30 мин. Содержание углеводов определяли по стандартной калибровочной кривой зависимости оптической плотности D-глюкозы от концентрации при длине волны 490 нм в кювете толщиной 1 см, на спектрофотометре СФ-26. Контроль готовили параллельно с исследуемыми образцами по вышеуказанной методике, где раствор препарата полисахарида заменён соответствующим количеством дистиллированной воды [1, 13].

Результаты и их обсуждение

Дрожжи рода *Cryptococcus* известны как продуценты внеклеточных полисахаридов. В таком аспекте изучен качественный моносахаридный состав внеклеточных полисахаридов *C. skinneri*, *C. humicolus*, *C. dimennae*, *C. neoformans*, *C. terreus*, *C. luteolus* и капсульного материала *C. laurentii* [2 – 5, 11]. Внеклеточные полисахариды *C. albidus* являются малоизученными полимерами и им посвящены единичные сообщения [15]. Установлены антивирусные свойства капсульных веществ некоторых штаммов *C. albidus*, выделенных нами из филлосферы растений [9]. Эти вещества способны защищать растения табака и дурмана от заражения вирусом табачной мозаики.

В связи с малой изученностью *C. albidus* в качестве продуцента внеклеточных полисахаридов, мы исследовали особенности капсулообразования у коллекционных штаммов. При культивировании на сусло-агаре *C. albidus*, дрожжи образовывали явно выраженную капсулу, что является характерным признаком именно базидиомицетных дрожжей рода *Cryptococcus* [11, 14]. Среди девяти исследованных штаммов *C. albidus* с использованием метода негативного контрастирования тушью по Дюгиду визуально были отобраны три штамма *C. albidus* УКМ У-1028, 1063 и 1066 (рис. 1).

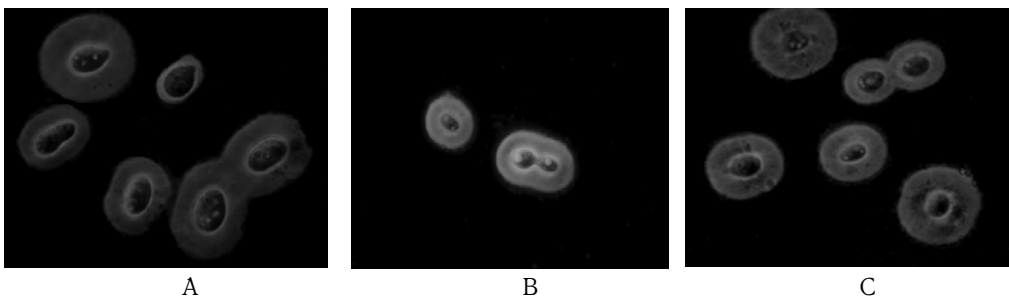


Рис. 1. Клетки дрожжей *C. albidus* УКМ У-1028 (А), УКМ У-1063 (В) и УКМ У-1066 (С) на сусло-агаре после 120 ч культивирования (увеличение $\times 200$).

Fig. 1. Yeasts cells *C. albidus* UKM U-1028 (A), UKM U-1063 (B) and UKM U-1066 (C) on beer-wort agar after 120 h cultivation (increase $\times 200$).

Нами установлено, что среди используемых сред Ридер, Харада и Голубева наилучшей для накопления биомассы дрожжей является среда Голубева (табл. 1). На этой же среде определяли выход внеклеточного полисахарида для штаммов *C. albidus* УКМ У-1028, УКМ У-1063 и УКМ У-1066, который достигал $2,54 \pm 0,18$ г/л, $2,82 \pm 0,26$ г/л и $2,89 \pm 0,21$ г/л. Исходные значения рН среды для культивирования криптококков были достаточно низкими (4,2), с дальнейшим снижением рН до 3,5 при их культивировании.

Таблица 1

Накопление биомассы *Cryptococcus albidus* при культивировании на различных питательных средах

Штамм УКМ У-	Биомасса, г/л АСВ		
	среда Ридер	среда Харада	среда Голубева
1003	$3,42 \pm 0,20$	$0,74 \pm 0,15$	$3,55 \pm 0,10$
1028	$2,02 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,12$	$3,64 \pm 0,20$
1033	$2,30 \pm 0,13$	$0,62 \pm 0,25$	$2,36 \pm 0,16$
1055	$2,30 \pm 0,10$	$0,98 \pm 0,10$	$2,28 \pm 0,15$
1063	$3,42 \pm 0,11$	$0,81 \pm 0,20$	$4,04 \pm 0,12$
1066	$2,24 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,10$	$4,02 \pm 0,12$
1068	$2,36 \pm 0,14$	$0,69 \pm 0,10$	$2,70 \pm 0,11$
1065	$3,48 \pm 0,20$	$0,81 \pm 0,10$	$2,64 \pm 0,20$
1069	$4,00 \pm 0,10$	$0,74 \pm 0,16$	$2,70 \pm 0,10$

По данным литературы, внеклеточные полисахариды дрожжей рода *Cryptococcus* содержат маннозу, ксилозу, глюкуроновую кислоту, иногда глюкозу [2 – 5, 11, 14, 15]. Такой моносахаридный состав внеклеточных полисахаридов установлен для *C. skinneri*, *C. humicolus*, *C. dimennae* [2 – 5]. Для нефракционированных внеклеточных полисахаридов *C. albidus var. albidus* характерно наличие глюкозы, галактозы, маннозы, ксилозы и глюкуроновой кислоты [15].

Изучение моносахаридного состава препаратов полисахаридов *C. albidus* УКМ У-1028, УКМ У-1063 и УКМ У-1066, полученных с помощью трёх различных подходов показало, что основным преобладающим компонентом препаратов была манноза — до 67 % (табл. 2). В состав внеклеточных препаратов также входили глюкоза (20,0 – 22,0 %), ксилоза (13,0 – 20,0 %), галактоза (1,0 – 3,0 %), следовые количества рибозы и арабинозы (0 – 2,0 %). Неидентифицированный моносахарид составлял 2,0 – 6,35 % от общей суммы площадей пиков. При этом общее количество углеводов в полисахаридных препаратах составляло для штаммов *C. albidus* УКМ У-1066 и УКМ У-1028 — 36 % и 34 % соответственно, а для штамма *C. albidus* УКМ У-1063 — 9 %.

Таким образом, для последующего изучения нами отобран штамм дрожжей *C. albidus* УКМ У-1066. Манноза (58 %), глюкоза (21 %) и ксилоза (16 %) являются преобладающими моносахаридами внеклеточного полисахарида данного штамма.



**Моносахаридный состав полисахаридных препаратов *Cryptococcus albidus*
(% к общей сумме площадей пиков)**

Препарат	Штамм, УКМ У-	Риб	Араб	Кси	Ман	Гал	Глю	Х
1	1066	-	-	15,69	58,06	-	21,36	4,89
	1028	0,54	0,71	13,83	50,69	3,16	29,09	1,98
	1063	1,02	1,87	55,44	20,21	2,52	13,90	5,04
2	1066	1,30	3,19	14,54	59,15	-	21,76	0,06
	1028	-	-	13,13	48,83	30,67	2,24	5,13
	1063	-	-	13,07	58,91	20,35	1,32	6,35
3	1066	1,21	1,94	13,32	66,27	3,57	7,74	5,95
	1028	-	-	2,40	13,13	0,77	82,31	1,39
	1063	0,61	1,03	14,80	66,08	3,32	11,85	2,31

Примечание: Х – неидентифицированный моносахарид, выходящий после глюкозы.

Уникальность данного препарата также состоит в том, что в его составе полностью отсутствует галактоза, наличие которой было бы более характерно для криптококков. Особенностью внеклеточного полисахарида было присутствие в нём глюкозы, связанное, вероятно с экстракцией растворимых глюканов клеточной стенки [11]. Полученный препарат может быть перспективен для дальнейшего исследования в качестве сорбента микотоксинов как составляющая часть кормовых добавок.

Авторы публикации благодарят сотрудников Института микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины д.б.н., профессора Варбанец Людмилу Дмитриевну за консультативную помощь, к.б.н. Броварскую Оксану Степановну за помощь при определении содержания общего количества углеводов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов – К.: Наук. думка, 2006. – 237 с.
2. Витовская Г.Л., Самаркина Г.М., Ананьева Е.П., Синицкая И.А. Синтез внеклеточных гетерогликанов дрожжами рода *Cryptococcus* // Микробиология. – 1989. – т. 58, в. 2. – С. 240-245
3. Голубев В.И., Манукян А.Р., Циоменко А.Б., Ушаков В.М. Получение капсульного материала дрожжей // Прикл. биохимия и микробиол. – 1980. – 16, № 4. – С. 591-596
4. Голубев В.И., Свиридов А.Ф., Бабьева И.П. Моносахаридный состав внеклеточных и капсульных полисахаридов дрожжей // Микробиология. – 1971. – т. 40, в. 4. – С. 610-616.
5. Елинов Н.П., Витовская Г.Л., Ананьева Е.П., Абелян В.А., Киселева С.М. Биосинтез гетерополисахаридов некоторыми видами криптококков // Прикл. биохимия и микробиол. – 1982. – 18, № 5. – С. 636-639



6. Елинов Н.П., Иозеп А.А., Голяков П.Н., Тихонова Т.А. Строение внеклеточного маннана, продуцируемого *Sporobolomyces species* ДС 26-М // Прикл. биохимия и микробиол. — 1975. — т. 11, в. 3. — С. 346-348
7. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. — К.: Наук. думка, 1982. — 192 с.
8. Квасников Е.И., Щёлокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. — К.: Наукова думка, 1991. — 328 с.
9. Коваленко О.Г., Баркалова А.О., Нагорна С.С. Антифiтовiрусна активнiсть капсульних речовин з дрiжджiв *Cryptococcus albidus* // Мiкробiол. журн. — 2005. — 67, № 3. — С. 81-84
10. Метод окраски капсул по Дюгиду: Пер. с англ. /Под ред. Ф.Герхардта и др. — М.: Мир, 1983. — т. 1. — 536 с.
11. Тихомирова О.М., Витовская Г.А., Синицкая И.А. Полисахариды клеток *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner — продуцента внеклеточного гетерогликана // Микробиология. — 1998. — 67, № 1. — С. 73-78
12. Albershein P., Nevis D.J., English P.D., Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography // Carbohydr. Res. — 1976. — № 3. — P. 340-345
13. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. — 1956. — 28, № 2. — P. 350-356
14. Kurtzman C.P., Fell J.M. The yeasts, a taxonomic study. Chemotaxonomy based on the polysaccharide composition of cell walls and capsules. — Amsterdam: Elsevier, — 1998. — 1055 p.
15. Ross A. and Taylor I.A. Extracellular glycoprotein from virulent and avirulent *Cryptococcus species* // Infection and Immunity. — 1981. — 31, № 3. — P. 911-918.

О.Г. Мамеева, С.С. Нагорна, А.М. Остапчук, В.С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Заболотного 154, Київ, ДСП, Д03680, Україна, тел.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

ПОЗАКЛІТИННІ ПОЛІСАХАРИДИ ДРІЖДЖІВ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* (SAITO) SKINNER

Реферат

Вивчений моносахаридний склад позаклітинних полісахаридних препаратів дріжджів *C. albidus* УКМ У-1028, УКМ У-1063 і УКМ У-1066, домінуючим вуглеводом яких була маноза (до 67 %). Відібраний штам *C. albidus* УКМ У-1066, в складі позаклітинних полісахаридів якого переважали маноза (58 %), глюкоза (21 %) і ксилоза (16 %). Отриманий препарат може бути використаний в якості сорбенту мікотоксинів.

К л ю ч о в і с л о в а: *Cryptococcus albidus*, позаклітинні полісахариди, моносахаридний склад.



O.G. Mameeva, S.S. Nagornaya, A.M. Ostapchuk, V.S. Podgorsky

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Zabolotny str., 154, Kyiv, Ukraine тел.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES OF YEASTS' *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* (SAITO) SKINNER

Summary

It was studied the monosaccharide composition of extracellular polysaccharide preparations of yeasts *C. albidus* UCM U-1028, UCM U-1063 and UCM U-1066, with mannose (up to 67 %) as dominating carbohydrates. It was selected the strain *C. albidus* UCM U-1066 in the extracellular polysaccharides structure in which mannose (58 %), glucose (21 %) and xylose (16 %), prevailed. The received preparation can be used in further as the sorbent of mycotoxins as the making part of fodder additives.

K e y w o r d s: *Cryptococcus albidus*, monosaccharide composition.

