ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
Факультет хімії та фармації
Кафедра аналітичної та токсикологічної хімії

Кваліфікаційна робота

на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

«Особливості виділення, ідентифікації та деякі практичні аспекти використання полісахаридів дріжджів»

«Features of extraction, identification and some practical aspects of using yeast polysaccharides»

Виконала: здобувачка заочної форми навчання
спеціальності 102 Хімія
Освітня програма Хімія
Науменко Кристина Ігорівна

Керівник: к.х.н., доц. Денис СНІГУР _____
(підпис)

Рецензент: к.х.н., доц. Надія ФЕДЬКО _____
(підпис)

Рекомендовано до захисту:
протокол засідання кафедри
аналітичної та токсикологічної хімії
№ ___ від ____ _____ 2024 р.

Завідувачка кафедри
_____ к. х. н., доц. Тетяна ЩЕРБАКОВА
(підпис)

Захищено на засіданні ЕК № _____
протокол № ____ від ____ _____ 2024 р.
Оцінка _____/_____/_____
(за національною шкалою / за шкалою ECTS / бали)

Голова ЕК
_____ д. х. н., проф. Ольга ШЕВЧЕНКО
(підпис)

Одеса – 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу виконано на кафедрі аналітичної та токсикологічної хімії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, на кафедрі харчової хімії, експертизи та біотехнологій Одеського національного університету й присвячено розробленню способу виділення та характеристиці полісахаридів дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae*. Робота є частиною наукових досліджень, що проводяться за темою кафедри № 323 «Розробка та удосконалення комбінованих методів контролю якості фармацевтичних препаратів, продуктів харчування та об'єктів навколишнього середовища» (№ держ. реєстрації 0122U00230).

Мета роботи: розроблення простого способу виділення полісахаридів дріжджів та характеристика чистого отриманих продуктів, а саме β-глюкану та манану, як перспективних функціонально-фізіологічно активних інгредієнтів.

В результаті даної роботи обґрунтовано спосіб виділення полісахаридів клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* – β-глюкану та манопротеїну, досліджено їх структуру за допомогою ферментних методів, поляриметрії, ІЧ та ЯМР-спектроскопії.

Можлива область застосування: використання отриманих продуктів, як дієтичної добавки в фармацевтичної промисловості чи як функціонально-активних інгредієнтів у технологіях харчової промисловості та.

Ключові слова: поляриметрія, ІЧ-спектрофотометрія, ЯМР-спектрофотометрія, полісахариди.

Кваліфікаційна робота складається з: 60 стор. машинописного тексту, 21 рисунка, 9 таблиць та 63 використаних джерел літератури.

ЗМІСТ

ВСТУП ……. 4

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ …….. 6

1.1 Структура дріжджової клітини ……. 6

1.2 Хімічний склад дріжджів …….. 9

1.2.1 *Азотовмісні сполуки* ……..… 10

1.2.2 *Ліпіди* ……. 11

1.2.3 *Полісахариди* ……..……..…….. 13

1.3 Способи дезінтеграції клітинних стінок дріжджів для отримання полісахаридів ……. 22

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА ……. 25

2.1. Застосовані реактиви та апаратура …….. 25

2.2. Методики проведення експерименту …….. 26

2.2.1 *Визначення азоту за методом К'єльдаля* ……... 26

2.2.2 *Визначення жирів методом Сокслета* …….. 27

2.2.3 *Визначення полісахаридів* …… 28

2.2.4 *Визначення вуглеводів методом Антрона* …… 30

2.2.5 *Визначення моносахаридного складу хроматографічним методом* ……. 31

2.2.6 *Стандартний метод виділення полісахаридів з дріжджів* …. 32

2.2.7 *Фізико-хімічні методи дослідження* …….. 33

2.3. Результати та їх обговорення …… 35

2.3.1 *Визначення хімічного складу дріжджів* ……. 35

2.3.2 *Розроблення способу виділення полісахаридів* …… 36

2.3.3 *Характеристика отриманих продуктів* ……. 42

ВИСНОВКИ ……. 54

ЛІТЕРАТУРА …….. 55

ДОДАТКИ

ВСТУП

В останні десятиліття різноманітність процесів, в яких використовуються дріжджі, різко збільшилася. Завдяки своєму хімічному складу дріжджі, крім основного використання в хлібопекарській та пивоварній промисловості, можуть застосовуватися як джерело функціонально-фізіологічних інгредієнтів – таких як білок, який за своїм амінокислотним складом наближений до тварини, вітаміни групи В та мінеральні а також полісахариди, які володіють широким спектром фізіологічних властивостей.

Терапевтичний потенціал полісахаридів дріжджів як регуляторів активації макрофагів добре встановлений [1,2]. Двома найбільш вивченими біологічно активними полісахаридами є манан і глюкан. Історія цих полісахаридів як імуномодуляторів нараховує майже 80 років. Перша біологічна активність була виявлена у зимозана. Згідно з хімічними аналізами, зимозан містить в середньому 55% глюкану разом з приблизно 19% манану, 15% протеїну, 6% жиру та 3% золи [3]. Ці піонерські дослідження проклали шлях до нинішнього буму у дослідженнях цих полісахаридів. Однак методи виділення у чистому вигляді глюкану та манану мають ряд недоліків: трудоємкість, недостатня ступінь чистоти, модифікації отриманих продуктів та інше. Тому розробка простого та доступного методу виділення цих полісахаридів є актуальною задачою.

Мета роботи: розроблення простого способу виділення полісахаридів дріжджів та характеристика отриманих продуктів, а саме β-глюкану та манану, як перспективних функціонально-фізіологічно активних інгредієнтів у фармацевтичній та харчовій промисловості.

Для досягнення поставленої мети, вирішувались наступні завдання:

- Розробити метод отримання глюкану та манопротеїнового комплексу з полісахаридів дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae*:
- Обґрунтувати етапи та послідовність операцій отримання полісахаридів клітинних стінок дріжджів за допомогою пероксиду водню;
- Провести якісний та кількісний аналіз полісахаридної складової;

- Надати характеристику структури отриманих продуктів.

Об'єкт дослідження: метод виділення β-глюкану та манопротеїну клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Предмет дослідження: дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, структурний β-глюкан, манопротеїн.

Методи дослідження: ферментативні методи, поляриметрія, ІЧ та ЯМР-спектроскопія

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Завдяки своєму хімічному складу, дріжджі, крім основного використання в хлібопекарській і пивоварній промисловості, можуть застосовуватися як джерело функціонально-фізіологічних інгредієнтів, таких як білок, який за своїм амінокислотним складом наближений до тваринного, вітаміни групи В та мінеральні речовини, а також полісахариди, що володіють широким спектром фізіологічних властивостей.

1.1 Структура дріжджової клітини

Дріжджі належать до царства грибів та є нерухомими одноклітинними еукаріотичними мікроорганізмами. Вони широко поширені в природі.

Клітина дріжджів мають овальну, яйцеподібну чи еліптичну форму. Розміри клітин дріжджів коливаються від 2,5…10 мкм у поперечному перерізі та від 4…20 мкм у довжину. Форма, розміри маса дріжджових клітин змінюються залежно від віку клітин та умов середовища, в якому вони розвиваються [4].

У цілому нині структура дріжджової клітини представлено на рисунку 1.1 та мало відрізняється від структури клітини рослини. Вона складається з клітинної оболонки, ядра, цитоплазми [5].

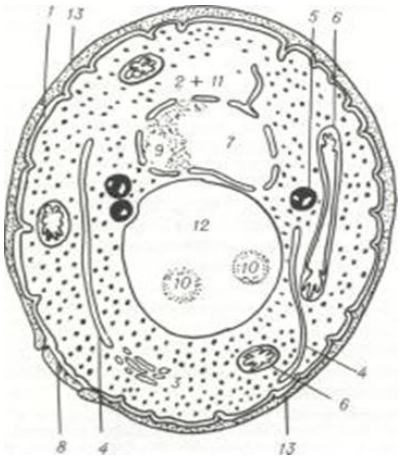


Рис. 1.1. Поперечний розріз дріжджової клітини: 1 – цитоплазматична мембрана (ЦПМ); 2 – цитоплазма; 3 – апарат Гольджі; 4 – ендоплазматична мережа; 5 – жирові крапельки; 6 – мітохондрії; 7 – ядро; 8 – рубець, де відбрунькувалася клітина, 9 – ядерце, 10 – метахроматична корпускула, 11 – рибосоми, 12 – вакуоль, 13 – клітинна оболонка.

Оболонка (рис. 1: 13) дріжджової клітини виконує роль захисного шару, оскільки вона стійка до механічного впливу. Вона надає клітині специфічної форми й містить у собі клітинну стінку та цитоплазматичну мембрану (рис. 1: 1) [6].

Клітинна оболонка дріжджів напівпроникна. Надходження розчинених речовин (цукрів, амінокислот (АК), жирних кислот, мінеральних речовин) здійснюється вибірково через нерозчинні транспортні білки. Ці транспортні білки містяться в мембрані і пропускають конкретні групи речовин, тобто роль мембрани зводиться до контролю руху речовин, що містяться в зовнішньому середовищі. З одного боку мембрана пропускає поживні речовини до місць їхньої асиміляції: цукри, АК, вітаміни та інші, з іншого – контролює виділення в середовище продуктів метаболізму [7]. Виділення назовні продуктів розпаду відбувається через мембрану за допомогою так званої везикули Гольджі (рис. 1: 3). [4].

Клітинна оболонка дріжджів відносно товста і жорстка, товщиною 25 нм і становить близько 25 % від сухої маси клітини.

Склад клітинної стінки варіює залежно від виду та умов культивування дріжджів. В хімічний склад переважно включає глюкан, хітин і манопротеїн (рис. 1.2). У деяких видах дріжджів манан відсутній. Крім того, клітинна стінка містить білки, ліпіди, фосфати. Білки в клітинній стінці присутні у вигляді комплексу з полісахаридами. У їхньому складі переважають глутамінова та аспарагінова кислоти; значний вміст сірковмісних амінокислот [8].

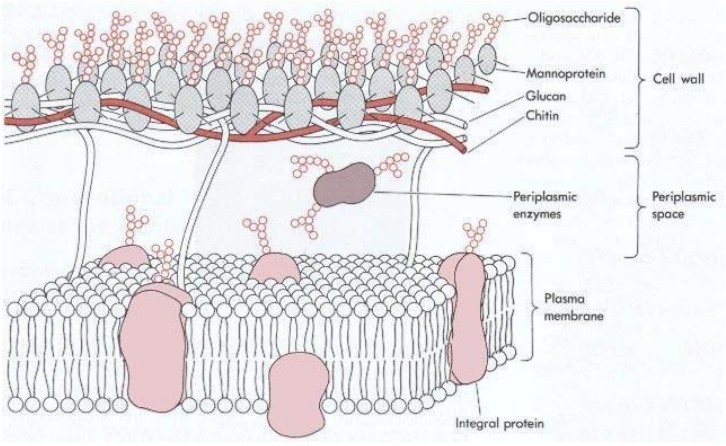


Рис. 1.2 Клітинна мембрана дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [20].

Зовнішній шар клітинної оболонки складається головним чином із манопротеїнового комплексу, до складу проміжного шару входить глюкан, який становить близько 12...14% від сухої маси клітини дріжджів [4, 5]. На внутрішньому боці стінки клітини локалізовані ферменти: інвертаза, фосфатаза, пептидаза та інші гідролази [5].

Основним структурним елементом цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) є фосфоліпіди, структура яких має велике значення для її функціонування. Товщина клітинної мембрани дріжджової клітини становить 6 нм [4].

Цитоплазма (рис. 1: 2) займає понад 50 % об'єму клітини [5]. Весь проміжний обмін речовин – гліколіз, синтез жирних кислот, біосинтез білків та інші процеси протікають саме в цитоплазмі паралельно один одному. У ній розрізняють включення (гранули глікогену) та органели, головними з яких є рибосоми (рис. 1: 11), вакуолі (рис. 1: 12), мітохондрії (рис. 1: 6) [9,10].

Рибосоми (рис. 1: 11) складаються з приблизно рівних частин білків і нуклеїнових кислот і є місцем синтезу білків [9,10].

Характерною особливістю вакуолей (рис. 1: 12) дріжджів є вміст у них метахроматину (волютину – внутрішньоклітинного включення, яке складається з нуклеїнової кислоти, метафосфату та білка), що може накопичуватися у великих кількостях як запасна речовина. Вакуолі також є місцем акумуляції пуринів, деяких амінокислот та інших речовин [11].

Мітохондрії (рис. 1: 6) зустрічаються в різних формах: сферичній, у вигляді паличок і ниток. Дріжджова клітина містить близько десятка мітохондрій, які мають тенденцію розміщуватись поблизу ядра. Вони багаті ліпідами: гліцеридами, стеринами, фосфоліпідами, ергостерином, жирними кислотами, містять також нуклеїнові кислоти, відмінні від тих, що містяться в ядрі та в рибосомах. Вони є місцем процесу дихання і містять дихальні ферменти, цитохроми, флавін, залізо, мідь [12].

Ядро (рис. 1: 7) – це найважливіша структура дріжджової клітини, яке забезпечує генетичну, інформаційну та метаболічну функції. Воно контролює синтез білків, ферментів, ліпідів, клітинних структур та інші обмінні процеси,

відіграє головну роль у процесі розмноження клітини. Ядро в дріжджах має округлу форму розміром 1...2 мкм та оточене двома мембранами, які мають безліч пор. Через пори в ядро надходять необхідні поживні речовини [11].

У нуклеоплазмі ядра (внутрішній частині) знаходиться ядерце (рис. 1: 9), яке відіграє певну роль у синтезі речовин рибосом. До зовнішньої поверхні оболонки ядра прикріплена велика кількість рибосом, що вказує на високий рівень синтезу білків у безпосередній близькості від ядра [12].

Хромосоми – це основні структури, що визначають спадковість. Відомо, що число хромосом, їхня довжина та форми постійні для певних видів дріжджів. Для виду *Saccharomyces* число хромосом становить не менше 13 [13].

1.2 Хімічний склад дріжджів

Хімічний склад дріжджів мінливий і залежить від виду та умов культивування. Найсуттєвішими складовими частинами дріжджової клітини є вуглеводи, азотовмісні, гумінові та мінеральні речовини. Дріжджі містять 24...30 % сухої речовини і 70...76 % води. Суха речовина на 90...95 % складається з органічних і на 5...10 % - з неорганічних сполук [14]. У таблиці 1.1 наведено середній хімічний склад дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [15-16].

Таблиця 1.1

Середній хімічний склад дріжджів

№	Складові	Вміст, % від сухої маси
1	Азотовмісні (білки, пептиди, амінокислоти та ін.)	50…60
2	Вуглеводи (β-глюкан, манан та ін.)	30…40
3	Ліпіди	2…5
4	Вітаміни	> 0,1
5	Мінеральні речовини	1-2

1.2.1 Азотовмісних речовин

Азотовмісних речовин у дріжджах міститься близько 60 %. Однак, за зниження вмісту глікогену в клітині їхній рівень може сягати 70 %, причому 90 % з них є високомолекулярними сполуками і 10 % – низькомолекулярними [17].

Азотовмісні речовини дріжджів представлені здебільшого білками (64 %), нуклеїновими кислотами (26 %), амідами та ін. (10 %). Пуринові та піримідинові форми азоту, що входять до нуклеїнових кислот дріжджів, становлять відповідно 8 і 4 % від загального азоту [18].

Основним показником якості білка є його амінокислотний склад (табл.1.2). У білку дріжджів близько 45 % від маси білка припадає на незамінні, а найбільше припадає на лізин 7,3 % і треонін - 5,5 %. Лімітуючими АК у дріжджах вважаються метіонін і цистеїн. Завдяки високому вмісту білка дріжджі є однією з найперспективніших груп мікроорганізмів, які є джерелом білкових добавок для збагачення білком продуктів харчування людини та кормів сільськогосподарських тварин.

Таблиця 1.2

Амінокислотний склад білка дріжджів

Амінокислоти	Вміст АК, % від сухої маси
Триптофан	0,58
Лізин	7,30
Гістидин	2,06
Аргінін	0,94
Аспарагінова кислота	4,07
Треонін	5,50
Серін	0,15
Глутамінова кислота	9,99
Пролін	1,93
Гліцин	3,72
Аланін	5,96
Цистін	0,03
Валін	2.66
Метіонін	1.94
Ізолейцин	2,93
Тірозин	1,03

Ферменти які містяться в пивних дріжджах поділяють на

внутрішньоклітинні – ендоферменти, їх в дріжджах набагато більше, і зовнішньоклітинні – екзоферменти. В дріжджах виявлені такі групи ферментів: гідролази, ферменти розщеплення,окисно-відновні,перенесення та ізомеризація. За їхньою дією на субстрат розрізняють групи гідролаз і десмолаз.

Гідролази, приєднуючи воду, каталізують розщеплення складних органічних речовин. До них відносяться карбогідрази: амілаза, мальтаза, інвертаза, глікогеназа, тригалаза і меліабіаза, які розщепляють і синтезують аспарагін і глютамін з утворенням аспарагінової кислоти і аміаку, відповідно, глютамінової кислоти і аміаку: протеази, які розщепляють або синтезують білки. Мальтаза, інвертаза і мелібіаза відіграють важливу роль в обміні речовин клітини. Мальтаза з приєднанням води розщепляє мальтозу дріжджі на дві молекули глюкози.

Ендоферменти глікогеназа розщепляє глікоген до глюкози, трегалоза – дисахарид треталозу на дві молекули глюкози.

Десмоази –це ферменти бродіння і дихання, під їх дією проходить глибокий розпад вуглеводів з розпадом хімічних зв’язків. При цьому виділяється вільна енергія [12].

1.2.2 Ліпіди

Ліпідний склад дріжджової клітини помітно змінюється залежно від умов культивування [19]. Відомо, що ліпіди в основному локалізовані в її мембранах, на рівні яких розгортаються транспортні, метаболічні та синтетичні процеси. Збільшення насиченості мембран ліпідами і в основному ліпідами з ненасиченими жирнокислотними радикалами змінює структуру ліпідного біошару. Це пов'язано з тим, що вуглеводневі зв'язки, що є подвійні, мають цис-конфігурацію, що зумовлює виникнення в ланцюзі ліпідів вигин, який збільшуючи міжмолекулярні відстані, послаблює гідрофобні зв'язки, що призводить до зменшення питомої густини ліпідів. Інша картина спостерігається у біошарі мембран з переважним вмістом ліпідів з насиченими жирними кислотами, що знаходяться в трансконфігурації, що обумовлює їх витягнутий

стан. Біошар таких мембран більш щільний [20].

Жир – запасна речовина дріжджів – знаходиться в основному в цитоплазмі, у дріжджах також містяться лицетин і фітостерин. Жирнокислотний склад жирів дріжджів наведено у таблиці 1.3.

Таблиця 1.3

Склад жирних кислот дріжджів

Жирні кислоти	Вміст, % від сухої маси
Насичені жирні кислоти:	0,542
С4:0(масляна)	-
С6:0(капронова)	-
С8:0(капрілова)	-
С10:0(капрінова)	0,004
С12:0(лаурінова)	0,030
С14:0(міристинова)	0,042
С16:0(пальмітинова)	0,342
С18:0(стеаринова)	0,094
С20:0(арахінова)	0,006
Мононенасичені жирні кислоти:	1,040
С14:1(міристолеїнова)	0,004
С16:1(пальмітолеїнова)	0,278
С18:1(олеїнова)	0,722
С20:1(гад олеїнова)	0,022
Поліненасичені жирні кислоти:	0,416
С18:2(лінолева)	0,306
С18:3(ліноленова)	0,102
С20:4(арахідонова)	-

Дані, які представлені у таблиці свідчать, що у складі насичених кислот переважає пальмітинова. Мононенасичені представлені, переважно, олеїновою кислотою. Вміст поліненасичених кислот досить вагомий – їх представлено в

основному лінолевою кислотою. В цілому ненасиченість жиру дріжджів досить вагома, адже насичені кислоти складають в ньому приблизно тільки 25%.

1.2.3 Полісахариди

Полісахариди – найпоширеніші в природі біополімери. Вони різноманітні по структурі і фізико-хімічним властивостям, можуть бути водорозчинним, малорозчинними і нерозчинними у воді. В більшості своїй вони малотоксичні або нетоксичні, на відміну від ліпополісахаридів і інших комплексних вуглеводів не володіють антигенними і пірогенними властивостями.

В наші часи з дріжджів виділено такі полісахариди та їх комплекси:

1) Глюкан-манановий комплекс, який називається зимозан – нерозчинний полісахарид мембран дріжджових клітин, в складі якому 85,7 % вуглеводів з них 70,8% мананів і 10,9% глюканів;
2) β-глюкан – полімер глюкози який складається із залишків D-глюкози. В дріжджовій клітині він розташований на внутрішній поверхні мембрани, в той час як на зовнішньому присутні в основному всі інші;
3) Манопротеїновий комплекс – манан, основний ланцюг яких складається із залишків D-манози, пов'язаний з протеїном.
4) Хітин – амінополісахарид клітинних стінок;
5) Глікоген – резервний альфа-глюкан [21].

У дріжджовій клітині міститься 24...40 % вуглеводів у перерахунку на суху речовину. У їхньому складі переважають полісахариди: глікоген, β-глюкан, манан і невелика кількість хітину.

Глікоген було винайдено в 1936 р. англійськими вченими. Глікоген – полісахарид $(C_6H_{10}O_5)_n$, схожий на крохмаль рослин, присутній майже у всіх дріжджах; в деяких умовах він може складати біля 40 % їх сухої маси. Глікоген (полісахарид структурно подібний амілопектину) – ця резервна речовина, яка збирається в молодих клітинах за хороших умов живлення. Розщеплення глікогену дає енергію для синтезу стеролів і ненасичених жирних кислот, які важливі для правильної роботи дріжджових мембран [22,23]. При

найінтенсивнішому розвитку дріжджові клітки можуть містять до 20% (за іншими даними до 39%) глікогену. В старіючих і старих клітинах його мало.

Глікоген – розгалужений полісахарид, молекула якого побудована з (1→4)-зв'язаних залишків α-D-глюкопіраноз у головному ланцюгу та зі зв'язками (1→6) у точках розгалуження (рис. 1.3) [24].

На початку бродіння глікоген у клітинах з'являється у вигляді невеликих скупчень із правильними обрисами, розкиданих у цитоплазмі, які надалі швидко зливаються в більшу масу, що відштовхує вакуоль і ядро до периферії. Глікоген – білий аморфний порошок, розчинний у воді. Його легко виявити: при фарбуванні клітин барвником з йодом він стає коричневим. До кінця бродіння він поступово зникає. Коли дріжджі брунькують, глікоген накопичується в асках і використовується аскоспорами під час їх проростання. Цей полісахарид міститься у всіх клітинах тваринного організму, особливо, в печінці. Він також присутній нижчих рослинах [25].

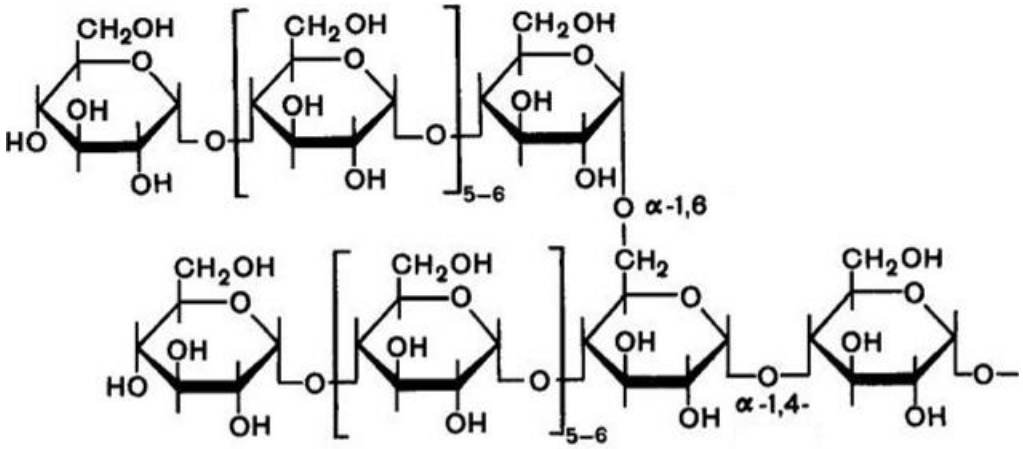


Рис. 1.3 Структура глікогену

Манан – природній полісахарид, до його складу входить залишок D-манози, що являється єдиним моносахаридам. В 1951 р. вчені встановили, що до складу дріжджових клітинних оболонок входить гексозан, який дає при гідролізі манозу, саме тому його назвали дріжджовим мананом. В дріжджовій оболонці міститься біля 31% манана. Н. Я. Дзюбко виявив, що саме манан здатний ідентифікувати пухлинні клітини, особливо фосфольованні манани дріжджів [26]. Манани за

своєю хімічною будовою подібні до хітина та глюкана. Основною цінністю манана дріжджів є те, що його продуценти забезпечують при біотехнологічному методі отримання екологічно чистий кінцевий продукт, що особливо важливо для медичного використання манана. Саме на цьому, на погляд багатьох вчених, повинно базуватися використання дріжджового манана і його комплексів з іншими структурними полісахаридами дріжджів [26]. Манан і глюкан володіють здатністю зв`язувати патогенні і умовно патогенні мікроорганізми, їх токсини, а також є неспецифічними стимуляторами імунітету.

Манопротеїни дріжджової стінки є високоглікозильованими поліпептидами, часто від 50 до 95% вуглеводів за масою, і тому їх можна вважати дріжджовими протеогліканами.

Манан макромолекла манану клітинної стінки дріжджів містить головний ланцюг, побудований із залишків α-1,6-зв’язаних манопіранозних залишків, до нього приєднані бічні відгалуження, що складаються з α-1,2-зв’язаних і α-1,3-зв’язаних залишків манопіраноз. Ці макромолекули з’єднуються з аспарагіном у білках. Крім того, короткі олігоманозидні одиниці з α-1,2 і α-1,3 зв’язками зв’язуються з залишками сериноу або треоніну у білку. Манан може приєднуватися до білка двома шляхами: або через атом Нітрогену на бічному ланцюзі аспарагіну (N-зв'язок) або через атом Оксигену на треоніні бічного ланцюг або серину (О-зв’язок). О-зв’язані структури являють собою ланцюжки з 4–5 мономерів, приєднаних до залишків серину або треоніну, тоді як N-зв'язані глікани містять білкову основу, до якої може бути приєднананий бічний ланцюг, що може містити до 200 залишків манози. Ланцюг також містить кілька манозилфосфатів [27-29] (рис. 1.4). Ступінь полімеризації манану становить близько 350 [30].

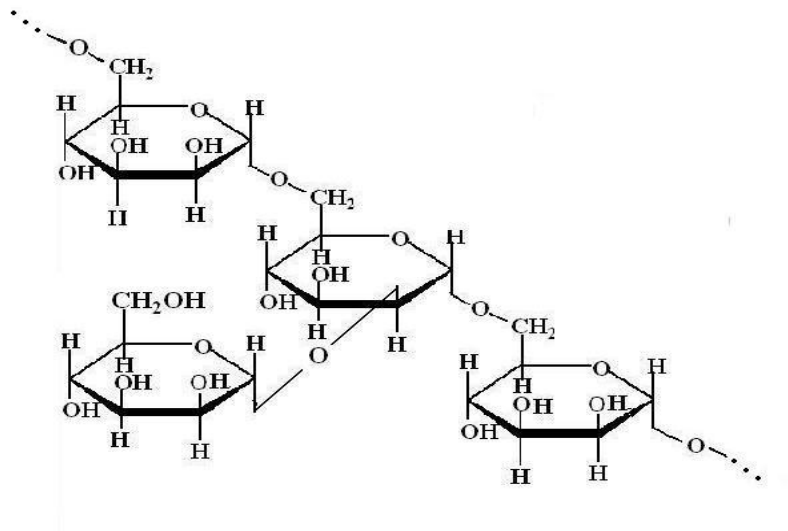


Рис. 1.4 Структура манану

Хітин було винайдено в 1811 р. професором H. Braconnot (Франція) при дослідженні складу шампіньйонів. Встановлено, що хітин складається із залишків 2-ацетамідо-2-дезокси- β-D-глюкопіраноз (N-ацетил-D-глюкозаміну), пов'язаних (1→4)-глікозидними зв'язками в однорідний, лінійний полімер. Хітин, що складається тільки із залишків N-ацетил-глюкозаміну, зустрічається в природі дуже рідко. Зазвичай в природному полімері невелика частина N-ацетілглюкозних ланок дезацетілірована до глюкозаміну [31].

Хітин у клітинних стінках дріжджів перебуває не у вільному стані (рис. 1.5), а пов'язаний іонними або глікозидними зв'язками з глюканом. Однак хітин дріжджів *Saccharomyce scerevisiae* присутній у незначних кількостях у місцях рубців, що утворюються під час брунькування [32,33].

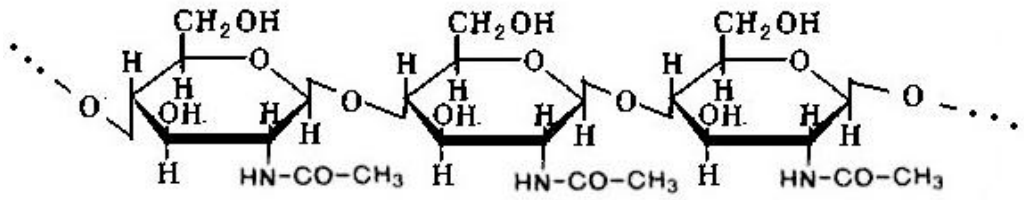


Рис. 1.5 Структура хітину

Бета-глюкан – основний структурний компонент клітинної стінки аскоміцетових дріжджів, відповідальний за підтримання її міцності.

Історія β-глюкану дріжджів починається в 1940-х роках з вивчення Луї Піллемером зимозану – препарату, що складається з білка, ліпідів і полісахаридів, виділених із клітинної стінки дріжджів [3]. Далі Ділузіо Н.Р. [34] проводить додаткові дослідження компонентів зимозану. Виявилося, що його активною складовою є β-(1→3)-D-глюкан.

У 1950 році Белл і Норхкотена основі аналізу результатів метилювання припустили, що глюкан є розгалуженим полісахаридом з β-(1→2)-глікозидними зв'язками, у якому на 9 моносахаридних залишків основного ланцюга припадає приблизно одне відгалуження. Однак 1958 року Піт, Вілан і Едвардс, ґрунтуючись на результатах дослідження продуктів часткового кислотного гідролізу глюкану дріжджів, дійшли висновку про наявність у ньому як β-(1→3), так і β-(1→6) глікозидних зв'язків [35].

У 1966 році Манерсс співавторами [36,37], використовуючи комплекс методів (метилювання, періодатне окислення, частковий кислотний гідроліз, ферментативну деструкцію), детально досліджували структуру дріжджового глюкану. У гідролізатах метильованого продукту автори виявили 2,3,4,6,-тетра-О-метил-D-глюкозу в кількості 6,4 %, 2,4,6-три-0-метил-D-глюкозу – 63,4 %, 2,3,4,-три- О -метил-D-глюкозу – 7,5 %, 2,4-ди- О -метил-D-глюкозу – 8,3 %, 4,6-ди-О-метил-D-глюкозу – 5,8 %. Крім того, в мінорних кількостях було знайдено 3,4,6-три-О-метил-D-глюкозу – 0,8 %, 2,6-ді-О-метил-D-глюкозу – 5,7 %, моно-О-метил-D-глюкозу і D-глюкозу – 2,1 %. На основі даних метилювання було зроблено висновок про те, що макромолекула глюкану розгалужена. На фрагмент основного ланцюга, що містить приблизно 15 D-глюкопіранозних ланок, пов'язаних β-(1→3)-зв'язками, припадає близько 7 % β-(1→6)-зв'язаних глюкопіранозних залишків. Цей факт надалі був підтверджений результатами періодатного окиснення і розпаду за Смітом [37].

Далі дослідженням структури та біологічної активності дріжджового глюкану починають займатися Дж. Паттерсон (Велика Британія), Д. Л. Вільямс (Велика Британія), Ват Ветвіска (Чехія, потім США), Д. Златковік (Сербія). Златковік (Сербія), Х. Кім (Корея) та ін.

Поряд із класичними методами хімії полісахаридів, у своїх дослідженнях вони застосовують спектроскопію ^{13}C-ЯМР, широко використовують ІЧ-спектроскопію та мас-спектрометрію. Так, у 2000 році Кім Х.Т. [38] і співавтори досліджували структуру глюкану дріжджів за допомогою ЯМР-спектроскопії. Віднесення сигналів у спектрах здійснювали, використовуючи як модельні сполуки. Отримані дані підтвердили наявність у головному ланцюзі глюкану β-(1→3)- і 3...6% β-(1→6)-зв'язків у бічних відгалуженнях [38,39].

Зековик Д. і співавтори виділили глюкан і довели його структуру за допомогою низки методів: ферментативної деструкції, метилювання, переодатного окислення, ІЧ-спектроскопії, ЯМР-спектроскопії. Аналіз продуктів гідролізу метильованого глюкану засвідчив наявність 2,3,4,6-тетра-О-метил-глюкози, 2,4,6-три-О-метил-глюкози та 2,4-ди-О-метил-глюкози в молярному співвідношенні 1:8:1. В ІЧ-спектрах отриманих зразків були виявлені: смуга поглинання 890 см-1, що підтверджує наявність β-конфігурацій, і низка смуг 2920, 1370, 1250 і 1200 см-1, що доводять наявність β-(1→3)-зв'язків. У спектрах ^{13}C-ЯМР (розчинник *DMSO-d_6*) були констатовані сигнали (ppm): 103.26, 86.47, 76.58, 73.05 і 68.69, що підтверджують наявність (1→3)-зв'язків у головному ланцюзі. У спектрах ^{13}C-ЯМР не виявлено сигналу, що відповідає α-конфігурації (100 ppm), а наявність β-аномерних атомів вуглецю було підтверджено сигналом за 104 ppm [40].

Аналогічні дані були отримані Златковиком Д. і співавторами [40], які досліджували дріжджовий глюкан за допомогою метилювання, періодатного окиснення, мас-спектрометрії, ЯМР-спектроскопії та ферментативного гідролізу. На основі отриманих результатів встановлено, що основою полісахариду є лінійний ланцюжок β-(1→3)-D-глюкопіраноз, частина з яких через позиції О-6 пов'язана з бічними відгалуженнями у вигляді залишків D-глюкопіраноз. Низьке оптичне обертання $[\alpha]_{20}D$ = -8,7°, а також результати ^{13}C-ЯМР та ІЧ-спектроскопії показали, що глікозидні зв'язки мають β-конфігурацію.

Таким чином, β-глюкан дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* являє собою нерозчинний у воді полісахарид, основний ланцюг якого складається із залишків

D-глюкопіраноз, з'єднаних β-(1→3)-глікозидними зв'язками. У положенні О-6 моносахаридних залишків кора приєднані бічні відгалуження, розмір яких варіює (рис. 1.6) [41,42].

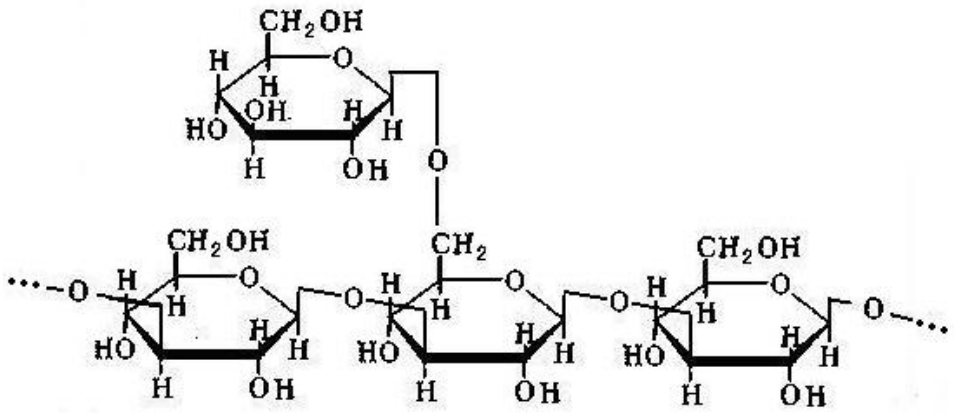


Рис. 1.6 Структура глюкану дріжджів.

За допомогою атомно-силової мікроскопії низка авторів показали, що в структурі глюкану дріжджів присутні як кристалічні, так і аморфні утворення[42].

Бета-глюкан дріжджів характеризується складною структурною організацією, в основі якої лежить конформація потрійної спіралі (рис. 1.7) [43]. Її наявність уперше було встановлено за допомогою рентгеноструктурного аналізу в 1992 р. Йошіокі Я. та співавторами [44], а подальше підтвердження воно отримало в роботах низки авторів, які використовували у своїх дослідженнях оптичний багаторівневий метод вимірювання дисперсності частинок, C^{13}ЯМР-спектроскопію, флуоресцентну спектроскопію, атомно-силову мікроскопію, а також метод класичної молекулярної динаміки.

Елементами структури β-глюкану є такі надмолекулярні утворення [43]:

1. Мультимер, що складається з потрійних спіралей, у вигляді кабельного утворення, що забезпечує міцність клітинної стінки.

2 Потрійна спіраль, що має форму нитки - компонент спіральних мультимерів.

3. Випадковий молекулярний клубок - елемент структури глюкана, що має найменший розмір.

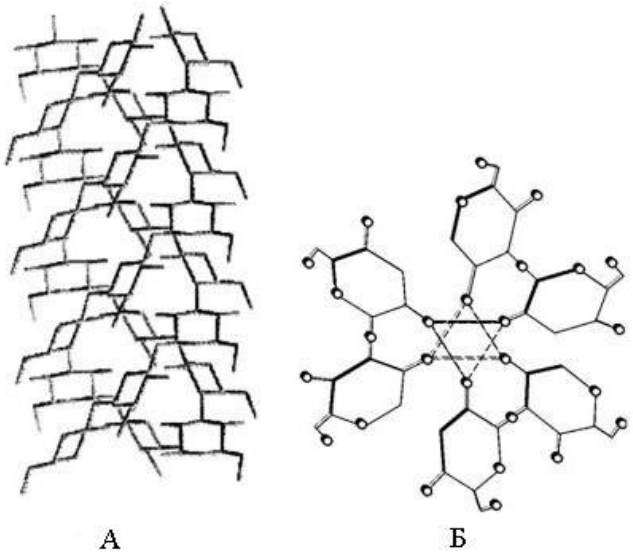


Рис. 1.7 А - потрійна спіраль β-(1→3)-D-глюкану; Б - утворення триплексу в просторі.

Бета-глюкани посідають чільне місце серед багатьох відомих і випробуваних імуномодуляторів. Вважається, що здатність впливати на імунну систему є найбільш важливою його біологічною активністю.

У 1970-х роках почалися медичні дослідження β-глюкану [45]. Цикл досліджень ефективності β-глюкану як засобу підтримання природних захисних сил організму був проведений у 2007 році для компанії LeiberGmbH (Брамше, Німеччина) фірмою «Analize&Realize» (Берлін, Німеччина). Застосування дріжджового бета-глюкану як засобу для підтримання природних захисних сил організму ґрунтується на доказах його сприятливого впливу на імунну систему і на цей час підтверджено великою кількістю наукових досліджень і клінічних апробацій. Експериментами *in vitro* і великим числом досліджень на тваринах підтверджено імуномодулювальний ефект дріжджового β-глюкану.

Одним із проявів імуномодуляції глюкану є його протипухлинна активність. Сьогодні в багатьох клініках США, Китаю та Японії дріжджові β-D-глюкани використовують як мультимодальні модулятори біологічної активності організму людини при лікуванні онкологічних захворювань. Дослідження в ряді європейських країн показало, що β-глюкан також має активність проти алогенних, сингенних і навіть автохтонних пухлин [46].

Крім вираженої імуномодулюючої дії, β-глюкани мають антиоксидантні

властивості, протизапальну і протиалергічну активність [42]. З відомих ефектів β-глюканів на особливу увагу заслуговує їхня здатність стимулювати процеси регенерації шляхом активації кератиноцитів і фібробластів. Крім того, дріжджовий β-глюкан виявився ефективним засобом зниження вмісту холестерину в сироватці крові [46-47].

Аналіз та узагальнення фармакодинамічних ефектів дріжджового β-глюкану дають змогу розглядати його як перспективний засіб профілактики та лікування бактеріальних, вірусних, грибкових, паразитарних інфекцій, а також у разі алергійних і серцево-судинних захворювань [48].

Активність глюкану залежить від молекулярної маси, ступеню розгалудження та від конформації його молекул. При виявленні взаємозв'язку між будовою полісахариду і біологічною активністю знайшли що, глюкозні залишки молекулах активного глюкану зв'язані β-1,3 и β-1.6 зв'язками, а в молекулах неактивного глюкану – лише β-1,3 зв'язками. Дослідники стверджують що зникнення β-1,6 – зв'язків при частковому кислотному гідролізі мовить про те що при цьому змінюється не лише молекулярна вага але й структурна молекула. Можливо, що ця зміна конфігурації молекул призводить до змін біологічної активності полісахариду [36].

Найбільш високою протипухлинною дією володіють β-глюкани зі ступенем розгалуження 0,20-0,33 і високою відносною молекулярною масою. У таблиці 1.4 наведено дані, що характеризують ступінь розгалуження β-глюканів [42].

Таблиця 1.4

Ступінь розгалуження β-глюканів в деяких дріжджах

Латинська назва	Ступінь розгаладження
Poria cocos	0,015 - 0,02
Saccharomyces cervevisial	0,03 - 0,21
Lentinus edodes	0,23 – 0,33
Pleourotus ostreatus	0,25
Sclerotium glucanicum	0,3

Латинська назва	Ступінь розгаладження
Amanita muscaria	0,3
Tylopilus felleus	0,33
*Schizophylum commun*t	0,33
Grifola frondosa	0,33
Saccharomyces carlsbergensis Hansen	0,25

Таким чином, фізіологічна ефективність глюкану дріжджів обумовлено багатьма факторами такими як: розгалуженість, тип зв'язків та інше.

1.3 Способи дезінтеграції клітинних стінок дріжджів для отримання полісахаридів

Для досягнення максимального виходу біологічно активних речовин з дріжджової клітини необхідно правильно підібрати спосіб руйнування клітинних оболонок. З одного боку всі процедури повинні бути досить жорсткими, щоб зруйнувати клітинну стінку, з іншого – такими, щоб запобігти денатурацію або руйнування цільового продукту. Для дезінтеграції клітин застосовують цілий набір методів, які можна віднести до трьох основних груп: механічні (фізичні), хімічні та ензиматичні (ферментативні).

З механічних (фізичних) способів успішно застосовують ультразвукове та газокомпресійне обладнання, балістичний спосіб із застосуванням бус Баллотіні, кварцового піску різноманітні преси та млини, а також так звані «азотні бомби».

При застосуванні ультразвукових дезінтеграторів з високою інтенсивністю частоти току можливо досягти повної руйнації дріжджової клітини. У зв'язку з цим цей спосіб застосовується при виробництві білкових препаратів [32], а також при визначенні ферментної активності дріжджів.

Газодекомпресійна дезінтеграція, заснована на створенні в камері з досліджуваним матеріалом, високого тиску і швидким скиданням його, що призводить до розриву клітинних стінок.

Для виділення білка з дріжджів застосовують різні млини: струшуючі, ударні, вібромлини та ін.

При застосуванні способу «азотної бомби» мікробні клітини спочатку насичують азотом під високим тиском, потім різко скидають тиск – виділяється газоподібний азот якби «підриває» клітини [43].

Хімічні способи дезінтеграції дріжджових клітин засновані на руйнації клітинних оболонок під впливом лужних розчинів, кислот, детергентів, інгібіторів синтезу оболонки клітини [49].

Одним з можливих хімічних способів руйнування є лужна екстракція з послідуючою мікрофільтрацією для концентрації високомолекулярних компонентів [50].

За способом, запропонованим в СРСР, для отримання біохімічно активних речовин, що утримуються в дріжджових клітинах, передбачається руйнування їх етилацетатом.

В Японії запатентований спосіб одержання активних компонентів дріжджів шляхом одночасної обробки неорганічними та органічними (лимонною, бурштиновою, молочною) кислотами при pH 2,5 протягом 30 хвилин.

Ензиматичні способи руйнування клітинних оболонок засновані на дії ферментів на дріжджову клітину та вивільнення з клітини білка, амінокислот і інших біологічно активних речовин. При застосуванні ферментного руйнування використовують літичні ферменти: лізоцим, отриманий з білка курячого яйця; ферментний комплекс, який знаходиться у кишковому тракті уліткі *Helix pomatia* чи виділяється деякими видами актиноміцетів, лізуючої оболонки еукаріотичних клітин, зокрема грибів [50].

Японські вчені для розчинення клітинної стінки дріжджів застосували фермент, що продукується штамами *Strepthomeces albideflavus*. Цей фермент повністю розчиняє клітинні стінки дріжджів, підданих попередньому нагріванню [50].

Аналіз усіх способів руйнації дріжджової клітини показав, що кожний з цих способів має свої недоліки: 1) при застосування механічних способів

виникає проблема з регулюванням процесу деструкції, що призводить до глибокої фрагментації субклітинних структур; 2) усі хімічні способи, як правило, призводять до змін вторинної структури полісахаридів, внаслідок чого зменшується їх біологічна активність, або викликають незворотні зміни структурної організації білкових молекул; 3) використання ензиматичних способів обмежується необхідністю використання для цих цілей ферментів високої вартості, що є економічно недоцільним.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Застосовані реактиви та апаратура

а) Застосовані реактиви

Як сировину в експериментах використовували пресовані пекарські дріжджі «Львівські» виробництва ПрАТ «Ензим» (ТУ У 15.8-00383320-001), «ДРОЖЖИ КРИВОРІЗЬКІ» виробництва компанією Listex (ТУ У 24532055-001-99) та Сухі дріжджі Saf-instant швидкодіючі виробництва Туреччина (ТУ У 10.8-30723648-007:2015).

Для руйнації клітинних стінок дріжджів використовували пероксид водню масовою концентрацією 50 %, з якої готували 3…24% розчини пероксиду водню. Для виділення супутніх речовин глюкану – 3% та 6 % розчини гідроксиду натрію та оцтову кислоту.

Органічні розчинники: петролейний ефір для визначення ліпідів, диметилсульфоксид (ДМСО) для розчинення водонерозчинного глюкану.

Ферментні препарати для ідентифікації полісахаридів:

- β-глюканаза Helix pomatia з ендо-β-(1→3)-глюканазною активністю (№67138 «Sigma Aldrich», Німеччина);
- β-глюканаза з β-(1→6)-глюканазною активністю (№67145 «Sigma Aldrich», Німеччина);
- α-Маннозидаза з *Canavalia ensiformis* (№M7257 «Sigma Aldrich» Німеччина);
- α-амілаза тваринного походження («Sigma», Німеччина).

б) Застосовані прилади та апаратура

Хімічний склад дріжджів, а саме білкові речовини визначали на автоматичному апараті К'єльдаля Вілітек серії АКВ-20, ліпіди на автоматичній системі для аналізу вмісту жиру методом екстракції розчинником (покращений метод Сокслета) SoxROC (Виробник: OPSIS LiquidLINE, Швеція).

Моносахаридний склад. Аналіз гідролізатів отриманих препаратів глюкану клітинних стінок дріжджів проводили методом високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі фірми Agilent

Technologies, модель 1100 (Німеччина), який укомплектований проточним вакуумним дегазатором G1379A, насосом градієнта низького тиску G13111A, автоматичним інжектором, колонками G1311A, рефрактометричним детектором G1362A. Для проведення аналізу використовували хроматографічні колонки «Supelcosil LC-NH2-NP», розміри яких становили 4,6×250 мм.

М і к р о с к о п і я . Мікрофотографії дріжджової клітини зроблено при збільшенні 40х на мікроскопі MICROmed Fusion FS-7520 з цифровою камеру-окуляр MDC-500.

П и т о м е о п т и ч н е о б е р т а н н я . Оптичну активність глюкану клітинних стінок дріжджів, отриманого пероксидним методом, досліджували на автоматичному поляриметрі P8000-T (виробник Akruss optronic GmbH, Німеччина), при температурі 20 °C і довжині хвилі лінії D-спектра натрію (589,3 нм); розчинник диметилсульфоксид.

І Ч - с п е к т р о с к о п і я . ІЧ-спектроскопічні дослідження проводили на спектрофотометрі «FTIR-8301PC». Зразки являли собою таблетки, що містили 4 мг полісахариду і 200 мг калій броміду.

А т о м н о - с и л о в а м і к р о с к о п і я . Атомно-силову мікроскопію (АСМ) використовували для характеристики надмолекулярної структури полісахаридів. Роботи проводились у дослідному комплексі ІНТЕГРА (м. Київ), у зондовій нанолабораторії Прима.

^{1}Н та ^{13}С Я М Р - с п е к т р о с к о п і я . ЯМР-спектроскопічні дослідження проводили на спектрофотометрі "Bruker Avance 400 wb" (Німеччина). Спектри знімали із робочою частотою 125,1 МГц. Як внутрішній стандарт використовували дейтероацетон.

2.2 Методики проведення експерименту

2.2.1 Визначення азоту за методом К'єльдаля

Наважку 1 г досліджуваного зразку поміщають в колбу К'єльдаля і додають 25 см^3 концентрованої H_2SO_4, при цьому з'являється чорне забарвлення. Колбу ставлять для спалювання наважки.

По закінченню спалювання колбу К'єльдаля охолоджують , додають вносили 10 см^3 розчину NaOH масовою долею 30-40% та з попередньо підготовленого пароутворювача, пускали пару. Відгін тривав 15-20 хвилин.

У колбі для приймання повинно змінитися забарвлення (з червоного перейти в зелений). Завершення процесу перегонки перевіряють лакмусовим папірцем (pH = 5). Потім отриманий розчин у колбі для приймання титрували 0,01 н розчином H_2SO_4 до рожевого забарвлення.

Кожний 1 см^3 0,01 н розчину H_2SO_4 пов'язується з амоніаком в кількості, відповідній 0,14 мг азоту. Перемножив кількість 1 см^3 зв’язаної H_2SO_4 на поправку до її титру та на цей коефіцієнт, отримували вміст азоту у рідині, яка була взята для відгону амоніаку.

Розраховували вміст азоту за формулою:

$$x = \frac{a \times T \times 100 \times V \times 0{,}14}{n \times 10}, \%$$

де a - кількість 0,01 н розчином H_2SO_4 витраченого на титрування, см^3;

T - поправка на титр 0,01 н розчином H_2SO_4;

V - об'єм розчину в мірної колбі після спалювання, см^3;

0,14 - кількість азоту (мг), який зв'язується у вигляді амоніаку 1 см^3 точно 0,01 н розчином H_2SO_4;

100 - коефіцієнт переведення в%;

n - маса абсолютно сухої речовини, см^3;

10 - кількість см^3 розчину, взятого для відгону амоніаку, см^3.

2.2.2 Визначення жирів методом Сокслета

Екстракцію проводять в апараті Сокслета, що складається з екстрактора, в який поміщають паперову гільзу з досліджуваним матеріалом, холодильника і екстракційної колби. Як розчинник використовують петролейний ефір, а також дихлоретан.

В процесі проведення екстракції розчинник разом з розчиненим у ньому жиром стікає в екстракційну колбу. Жир залишається в колбі, а пари розчинника

знову піднімаються і екстрагують нову порцію. Таким чином, досліджуваний об'єкт, піддаючись багаторазової екстракції, повністю зжирюється. Орієнтовна тривалість екстракції 6…8 ч.

Після закінчення екстрагування гільзу виймають з екстрактора, висушують і зважують. Кількість жиру визначають по різниці між масою гільзи з матеріалом до екстракції і після неї за формулою:

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \cdot 100\ \%,$$

де ω – вміст жиру,%;

m_1 – маса гільзи з матеріалом до екстрагування, г;

m_2 – маса гільзи з матеріалом після екстрагування, г;

m_0 – маса наважки, г

Кількість жиру можна також визначити, зваживши екстракційну колбу з витягнутим жиром, з якого попередньо був видалений розчинник. В цьому випадку вміст жиру розраховували за формулою:

$$X = \frac{(a - a_1) * 100}{н},$$

де а – маса колби з жиром, г;

a_1- маса чистої колби, г;

н – маса наважки, г.

2.2.3 Визначення полісахаридів

Наважку досліджуваного зразку поміщають у колбу і додають розчин HCl масовою долею 2 %, гідромодуль 10. Колбу з підключеним зворотним холодильником ставлять на киплячу водяну баню на чотири години, охолоджують. Надосадову рідину відділяють від осаду центрифугуванням, і визначають у ній вміст редукуючих речовин за методом Хагедорна-Іенсена.

Визначення вмісту редукуючих речовин за методом Хагедорна-Іенсена

В кожну з чотирьох пробірок вносять по 2 $см^3$ розчину K_3FeCN_6, в три з них вносять по 0,5 $см^3$ отриманого гідролізату, четверта пробірка – контроль.

Пробірки поміщають на киплячу водяну баню на 15 хвилин. Після охолодження в кожну пробірку вносять по 3 $см^3$ розчину $KI \cdot ZnSO_4$, 2 $см^3$ оцтової кислоти масовою долею 3 % і пару крапель розчину крохмалю масовою долею 1 %, в якості індикатора і титрують 0,005 н розчином натрій гіпосульфітом до зникнення забарвлення.

Вміст цукрів розраховують за формулою:

$$X = \frac{a \times V \times 100}{1000 \times b \times g},\ \%$$

де a - маса глюкози знайдена за таблицею (додаток 2), мг

V - загальний об'єм досліджуваного гідролізату, $см^3$

b - об'єм гідролізату, взятого на досвід, $см^3$

g - маса наважка, взятої на гідроліз, мг

Визначення важкогідролізованих полісахаридів (ВГП)

Твердий залишок після гідролізу легкогідролізованих полісахаридів висушують при температурі не вище 50 °С і зважують, переносять в колбу і заливають 10 кратним об'ємом розчином H_2SO_4 масовою долею 72 %. Отриману суміш ретельно перемішують протягом двох з половиною годин, так щоб наважка практично повністю розчинилась у кислоті.

Після розчинення в колбу додають певний об'єм дистильованої води і ставлять на киплячу водяну баню з підключеним зворотним холодильником на п'ять годин. Потім розчин охолоджують і далі дослідження проводять за методом Хагедорна-Іенсена.

Визначення маси залишку після гідролізу важкогідролізованих полісахаридів

Твердий залишок фільтрують через попередньо висушений до постійної маси стаканчик Шотта (скляний пористий фільтр №1). Промивають залишок гарячою водою до нейтральної реакції. Сушать залишок зі стаканчиком до постійної маси при t=105 °С.

Маса залишку після гідролізу важкогідролізованих полісахаридів розраховують за формулою (в перерахунку на суху речовину):

$$X = \frac{a \times 100 \times 100}{g \times (100 - w)}, \%$$

де а – маса отриманого залишку в г.

g – наважка сировини в г;

w – вологість сировини в %

Визначення амінополісахаридів за Елсоном-Морганом

Визначення амінополісахаридів проводили за методом Елсона-Моргана. В кожну з чотирьох пробірок вносили по 1 $см^3$ розчину ацетил ацетону в 1,25 н розчині карбонату натрію з масовою долею 4 %, в три з них вносили по 0,5 $см^3$ отриманого гідролізату, отриманого після гідролізу ВГП, четверта пробірка – контроль, в яку вносили дистильовану воду. Пробірки протягом 1 год при 90 °С. Після охолодження в кожну пробірку вносили по 8 $см^3$ C_2H_5OH, 1 $см^3$ розчину 1,6 г двічі перекристалізованого з 80 %-ного спирту N,N-диметил-n-амінобензальдегіду в суміші 15 $см^3$ C_2H_5OH та 15 $см^3$ концентрованої HCl. Реакційна суміш в пробірці набуває красного кольору. На фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 560 нм визначали оптичну густину розчину (за контроль брали контрольну пробу).

Вміст амінополісахаридів розраховували за формулою:

$$X=(a \times V \times 100) / 1000 \times b \times g \text{ , } \%$$

де а – маса амінополісахаридів знайдена за калібрувальним графіком, мг;

V – загальний об’єм досліджуваного гідролізату, $см^3$;

b – об’єм гідролізату, взятого на дослід, $см^3$;

g – маса наважка, взятої на гідроліз, мг.

2.2.4 Визначення вуглеводів методом Антрона

Метод заснований на розщепленні складних вуглеводів до моносахаридів в сильнокислому середовищі з подальшою їх дегідратацією і утворенням гідроксиметилфурфурола, що утворює при реакції з антроном комплексне з'єднання синювато-зеленого кольору.

Приготування антронового реактиву: 1 мг реактиву Антрону розчиняють у 1 см^3 концентрованої H_2SO_4.

У пробірку поміщають 3 см^3 розчину досліджуваного препарату, обережно доливають 6 см^3 1 % антронового реактиву, перемішують і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 15 хв., охолоджують і вимірюють оптичну щільність досліджуваного і стандартного розчинів на спектрофотометрі в максимумі поглинення при довжині хвилі 670 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм відносно розчину порівняння.

Вміст цукрів в 1 см^3 розчину випробуваного препарату знаходять по калібрувальній кривій (рисунок 2.1) залежності оптичної щільності калібрувальних розчинів від вмісту стандартного зразка глюкози в 1 см^3 розчинника.

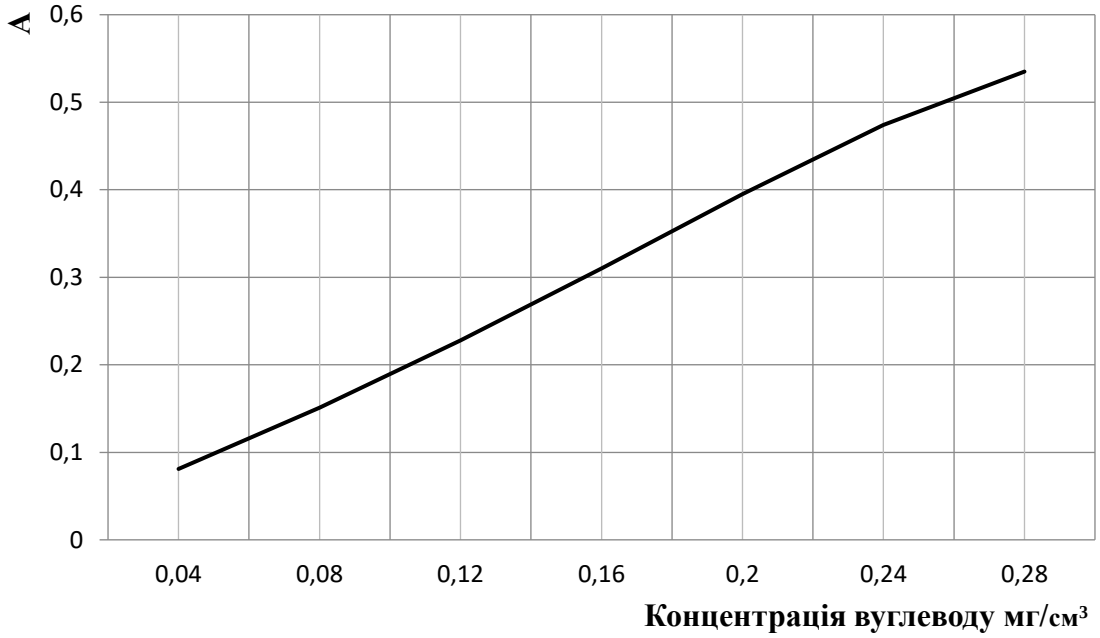


Рис. 2.1 Градуювальний графік визначення масової концентрації глюкози (мг / см^3).

2.2.5 Визначення моносахаридного складу хроматографічним методом.

Режими хроматографування: швидкість подачі рухомої фази 0,75 см^3/хв; елюент водний 75 % розчин ацетоннітрилу; температура термостата колонки 25 °С; об'єм проб близько 5 мкл. Параметри рефрактометричного детектування:

час сканування 0,5 сек.

Паралельно при аналізі моносахаридного складу гідролізатів застосовували метод хроматографії на папері. Використовували папір 1 Chr (Whatman), розчинник - н-бутанол : оцтова кислота : вода в об'ємному співвідношенні 4:1:5, проявник - анілінфталат.

2.2.6 Стандартний метод виділення полісахаридів з дріжджів

Метод передбачав суспендування 1 кг свіжих пресованих дріжджів у 800 $см^3$ 6 %-ого розчину NaOH. Далі суспензію нагрівали при перемішуванні до температури 60 °С, розбавляли дистильованою водою до 3 $дм^3$, тверду фазу відокремлювали від рідкої центрифугуванням.

Тверду фазу суспендували в 1,5 $дм^3$ 3%-ого розчину NaOH і витримували 3 години, потім розбавляли дистильованою водою до об'єму 3 $дм^3$, суспензію центрифугували. Твердий залишок суспендували в дистильованій воді об'ємом 1,5 $дм^3$, суміш нагрівали до температури 80 °С, доводили 0,1 н розчином HCl до pH = 4,5 і центрифугували.

Твердий залишок знову нагрівали з 800 $см^3$ 3 %-ого розчину NaOH за температури 80 °С протягом 2 годин. Після центрифугування твердий залишок суспендували у воді, доводили pH суміші 0,1 н розчином HCl до 4,5 і відокремлювали залишок від рідкої фази центрифугуванням.

Далі залишок суспендували в 300 $см^3$ 0,5 н розчину оцтової кислоти і нагрівали до температури 75 °С. Після охолодження драглеподібну масу відокремлювали від надосадової рідини центрифугуванням, тричі промивали водою, нагрітою до температури 75 °С, гомогенізували в 300 $см^3$ 0,02 М розчину ацетату натрію (pH = 7,0) та автоклавували при температурі 135 °С протягом 1 години.

Після охолодження реакційну суміш розбавляли 300 $см^3$ води, відокремлювали твердий залишок центрифугуванням, далі його повторно автоклавували при температурі 135 °С з 500 $см^3$ води і промивали до негативної якісної реакції промивних вод на глікоген (буро-червоне забарвлення з розчином

йоду).

Студнеподібну масу відокремлювали центрифугуванням, промивали етанолом та ефіром. Отриманий глюкан містив 90,3 % полісахаридної складової, 0,6 % азоту, його вихід становив 2,6 % у розрахунку на суху речовину дріжджів.

2.2.7 Фізико-хімічні методи дослідження

ІЧ -спектороскопія

Кількісний аналіз ІЧ-спектрів аналізованих продуктів проводили за значеннями відносної оптичної густини, застосовуючи метод базисної лінії та внутрішнього стандарту.

Як внутрішній стандарт використовували максимум смуги поглинання при 1425 $см^{-1}$, що відповідає деформаційним коливанням СН-груп. Індекс кристалічності біополімерів визначали як співвідношення оптичних густин смуг поглинання при 1430 $см^{-1}$ і 900 $см^{-1}$ [51]. Індекс симетричності оцінювали за відношенням ширини високочастотної та низькочастотної частин поглинання в ділянці 3000...3750 $см^{-1}$, виміряних від середини перпендикуляра, проведеного через максимум смуги поглинання ОН-груп, і базисну лінію [51].

Кількісний диференціальний аналіз ІЧ-спектрів глюканів, виділених різними методами, здійснювали за величиною відносної оптичної густини (ВООГ), використовуючи метод базисної лінії та внутрішнього стандарту. Після математичної обробки отриманих даних побудували диференціальні спектри.

Розраховані ВООП обраних смуг поглинання знаходили як співвідношення:

$$ВООП = \frac{Д_X}{Д_{СТ}}, \qquad (2.1)$$

де $Д_X$ - оптична густина досліджуваної смуги поглинання з хвильовим числом х;

$Д_{СТ}$ - оптична густина внутрішнього стандарту.

Величину оптичної густини розраховували за формулою:

$$Д = \lg \frac{T_0}{T_X}, \qquad (2.2)$$

де T_0 - пропускання у % точки на базисній лінії;

T_X - пропускання у % відповідної точки спектрограми.

Атомно-силова мікроскопія.

Приготування зразків: наважку полісахариду масою 10 мг розчиняли в 100 см^3 диметилсульфоксиду при кімнатній температурі протягом 24 годин при періодичному перемішуванні. Перед нанесенням розчин полісахариду нагрівали і витримували при температурі 100 °С протягом 10 хвилин.

Нанесення зразків на заздалегідь приготовані кремнієві підкладки розміром 12х25 мм проводили методом осадження крапель. При цьому діаметр краплі становив не більше 10 мм, товщина шару – менше 2 мм. Зразки висушували за кімнатної температури, розчинник випаровувався природним шляхом.

Перед роботою на атомно-силовому мікроскопі було проведено попереднє налаштування: встановлений кантилевер, визначено його резонансні характеристики, здійснено підбір параметрів для цього виміру: коефіцієнт зворотного зв'язку, амплітуда коливань тощо.

Сканування на мікроскопі проводили в конфігурації «напівконтактний» метод.

Зразки встановлювали на спеціальні підкладки, розміри яких становили 24х19х0,5 мм. Для закріплення зразків використовували двосторонній скотч. Після чого підводили зразки до зонда на відстань 0,5-1,0 мм, максимальна візуалізація діапазону становила ~15 мкм, сканування проводили на частоті 1 Гц за допомогою зондового датчика (кантілевер) типу CSG10, використовуючи програму управління мікроскопом «NOVA». Отримані зображення були оброблені за допомогою програмного модуля Image Analysis.

^{1}H та ^{13}C ЯМР-спектроскопія.

Попередньо висушені зразки глюкану поміщали в стандартну ампулу (діаметром 5 мм і висотою 178 мм) і мікродозатором додавали розчинник (*ДМСО-d6*), після чого вміст ампули ретельно перемішували до отримання прозорого розчину (включення нерозчинних часток не допускалося).

Маса наважки полісахариду для отримання протонного спектра (^{1}H) становила близько 5 мг, для отримання спектра на ядрах ^{13}C – 20...30 мг.

Спектри знімали з робочою частотою 125,1 МГц. Співвідношення β-1→3- і β-1→6-зв'язків у досліджуваному зразку розраховували за співвідношенням інтегральних інтенсивностей сигналів аномерних атомів вуглецю β-1→3- і β-1→6-зв'язків.

2.3 Результати та їх обговорення

2.3.1 Визначення хімічного складу дріжджів

Для виділення полісахаридів дріжджів необхідно вибрати джерело, в якому вміст полісахаридів буде максимально високим. За для того дослідили хімічний склад дріжджів від різних виробників (табл.2.1).

Як видно з таблиці 2.1, у пресованих дріжджах «Львівські» вміст вуглеводної складової найвищий, що зумовлювало вибір цієї сировини як джерела отримання полісахаридів клітинних стінок.

Таблиця 2.1

Хімічний склад дріжджів, % с.р.

Показник	Пресовані дріжджі		Сухі дріжджі
	Львівські	Криворізькі	Saf-instant
Білки	40,5	48,1	49,6
Вуглеводи	48,3	25,6	40,1
Ліпіди	1,1	8,1	6,0
Зола	7,1	11,1	5,0
Вологість	72,0	66,0	12,0

Під час аналізу хімічного складу пекарських дріжджів досліджували гідролізат вуглеводного комплексу сировини. У його складі ідентифіковано галактозу (Gal), глюкозу (Glc), манозу (Man) і фукозу (Fuc) у відсотковому співвідношенні 21,2 : 36,9 : 33,6 : 8,3.

2.3.2 Розроблення методу виділення полісахаридів

Методи виділення полісахаридів дріжджів, що є структурною основою клітинної стінки, ґрунтуються на видаленні низькомолекулярних сполук, присутніх у дріжджовій клітині, і супутніх йому білка [52].

Отримання цільового глюкану задовільного ступеня чистоти є складним завданням. Основна проблема полягає у видаленні біополімерів – манану і білка, які являють собою міцнозв'язаний комплекс. Її розв'язують як за допомогою їх екстракції, використовуючи відповідні агенти в доволі жорстких умовах, так і шляхом їх гідролітичної деструкції ферментними препаратами. Іноді на першому етапі застосовують різні механічні прийоми, що сприяють руйнуванню дріжджової клітини, збільшують тим самим доступність біополімерів до дії ферментів і підвищують їхню розчинність.

У літературі є відомості про те [53], що обробка мікроорганізмів розчинами пероксиду водню низької концентрації (0,1...1 %) збільшує проникність цитоплазматичної мембрани і тим самим сприяє екстракції клітинного вмісту.

У Франції для отримання білкових добавок було запропоновано спосіб руйнування клітинної оболонки дріжджів, який передбачає їх обробку розчинами пероксиду водню концентрацією 0,1...10 % і температурі від 0 до 100 °С [52].

У медицині 3 % розчин H_2O_2 застосовують як дезінфікувальний агент. Із цією ж метою розчини пероксиду водню застосовують і в харчовій промисловості: ними обробляють технологічні поверхні обладнання, які безпосередньо контактують із продукцією [53].

Пероксид водню використовують також під час одержання деяких полісахаридів як агента, що сприяє дезінтеграції зв'язків у лігновуглеводному

комплексі рослинної клітини та деградації її окремих компонентів. Так, здерев'янілі рослинні тканини піддають обробці надоцтовою кислотою, яку отримують взаємодією оцтового ангідриду з пероксидом водню концентрацією 30...33 % [53]. При цьому має місце делігніфікація, порушуються зв'язки між окремими компонентами вуглеводного комплексу сировини, що забезпечує можливість виділення індивідуальних полісахаридів.

Враховуючи викладене вище, розглянули можливість застосування розчинів пероксиду водню для руйнування клітинних стінок пекарських дріжджів як початкового етапу виділення з них полісахаридів.

Ефективність дії цього реагенту на дріжджові клітини оцінювали, констатуючи зміни, які відбуваються, за допомогою мікроскопа (рис. 2.2...2.4). Дріжджі змішували з розчином окислювача і витримували за кімнатної температури. Температура реакційного середовища мимовільно зростала до 45...50 °С за рахунок екзотермічного характеру процесу.

Результати проведених експериментів показали, що використання 1...2 % розчинів H_2O_2 призводить лише до часткового руйнування клітинних стінок, а їхня повна дезінтеграція досягається при збільшенні концентрації пероксиду до 3 % і вище.

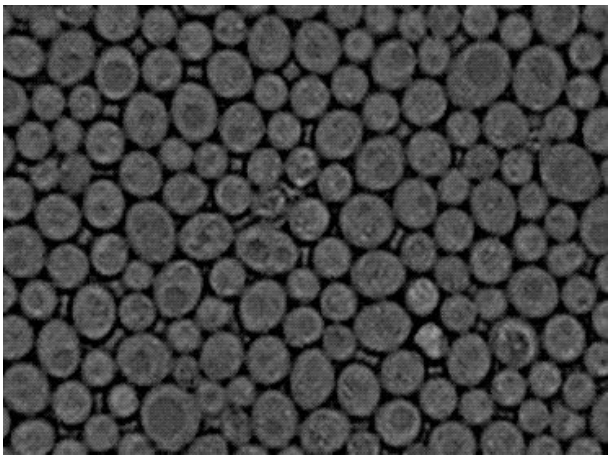


Рис. 2.2 Клітини дріжджів Saccharomyces cerevisiae до обробки H_2O_2.

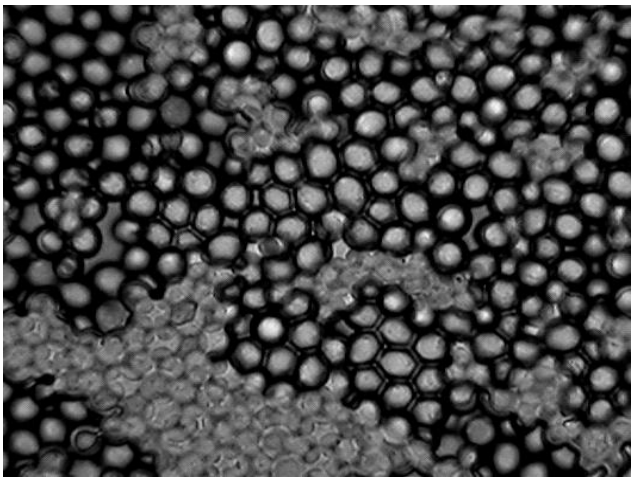


Рис. 2.3 Дріжджові клітини, оброблені 3 % розчином H_2O_2 протягом 30 хвилин.

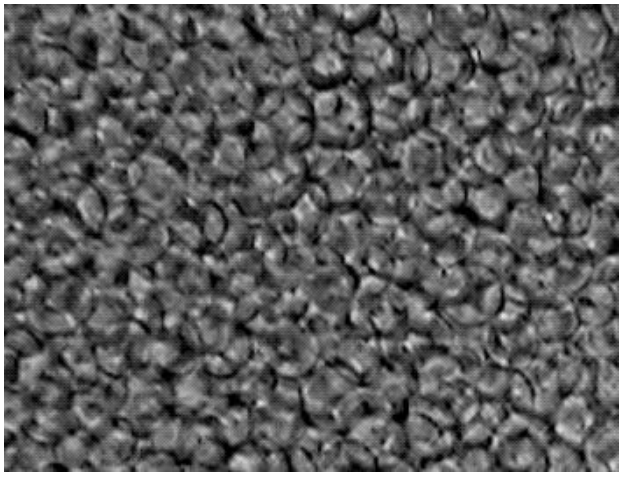


Рис. 2.4 Дріжджові клітини, оброблені 3 % розчином H_2O_2 протягом 60 хвилин.

У подальшому для дезінтеграції клітинних оболонок дріжджів використовували розчин H_2O_2 різної концентрації та варіювали співвідношення твердої і рідкої фаз, а також термін обробки.

Під час виділення глюкану з дріжджової маси, підданої дії пероксиду водню, основним завданням було видалення таких полісахаридів, як манан і глікоген, а також білкової складової, масова частка якої досягала 58,8 %.

Згідно з літературними даними, манан, що входить до складу клітинних оболонок дріжджів, є лугорозчинним полісахаридом [54], міцно зв'язаним із частиною білка в «манопротеїновий комплекс», у зв'язку з чим, для його видалення доцільно використовувати лужну екстракцію. Водночас слід

підібрати такі умови, які зумовлюють максимальне видалення манопротеїнового комплексу, не призводячи до необоротної денатурації білка, що може призвести до «забруднення» ним цільового продукту.

Під час дослідження полісахаридів дріжджів Норхкот Д.Х. [54] екстрагував манан гарячим розчином 3 % гідроксиду натрію, а потім для вилучення глікогену отриманий залишок обробляв 0,5 н розчином оцтової кислоти за температури 75 °С.

У низці робіт із вивчення будови та фізіологічних властивостей глюкану клітинних стінок дріжджів використовували стандартну методику його виділення. Її представлено в розділі 2, пункт 2.2.8. За її реалізації вихід кінцевого продукту становить 2,6 % у розрахунку на суху речовину дріжджів, вміст полісахариду в ньому – 90,3 %, білка – 3,8 %. При цьому слід підкреслити, що ця чистота полісахариду є еталонною.

Виходячи з викладеної вище інформації, нами була зроблена спроба очистити глюкан від супутніх речовин обробкою реакційної маси 3 % розчином NaOH для отримання манопротеїнового комплексу з подальшою екстракцією глікогену 0,5 н розчином оцтової кислоти. Однак отриманий у цих умовах продукт мав низьку чистоту – масова частка глюкану не перевищувала 32 %. Збільшення концентрації лугу в розчині до 6 % також не дало змоги очистити глюкан від манану та білкових компонентів.

Тому надалі використовували дворазову лужну обробку. Причому спочатку проводили лужну екстракцію при кімнатній температурі з тим, щоб запобігти руйнуванню вторинної і третинної структур білка і перевести його в розчин, а потім обробляли реакційну масу розчином NaOH при 60 °С.

Для визначення тривалості екстракції контролювали динаміку накопичення супутніх манану та білка в розчині (рис. 2.5 – 2.6). Процес вважали завершеним після досягнення сталості їхньої концентрації.

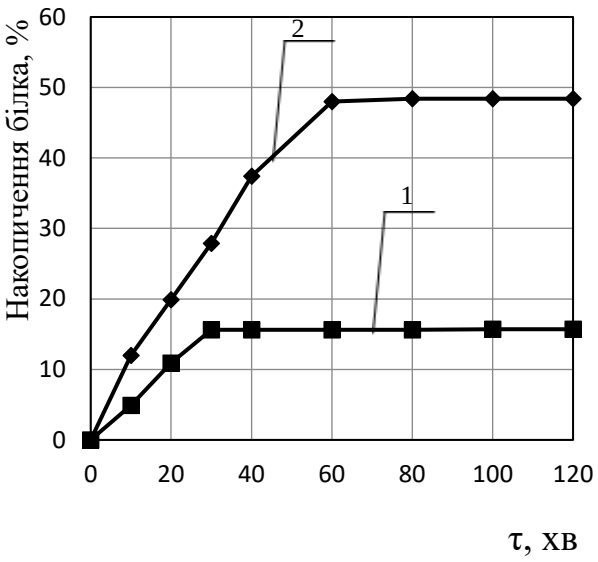


Рис. 2.5 Вміст білка в екстракту

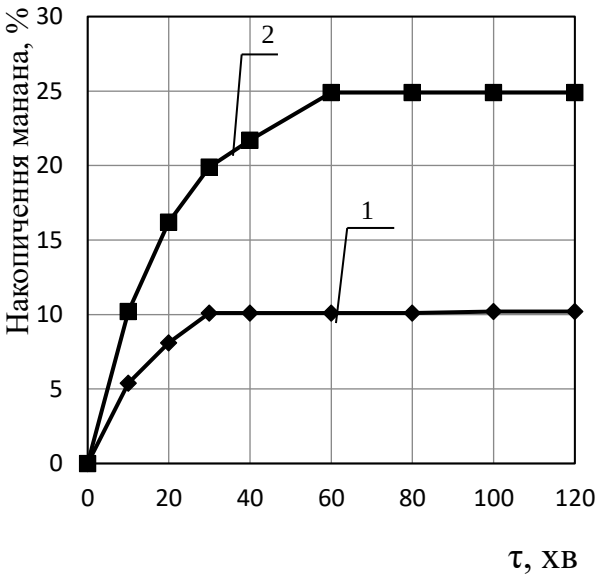


Рис. 2.6 Вміст манана в екстракту

1 –3 % розчин NaOH, 2 –6 % розчин NaOH.

На підставі цих результатів було визначено тривалість обробки реакційної маси екстрагентами: розчином 3 % NaOH – 30 хв, 6 % NaOH – 60 хв. Виходячи з цього, нами було розглянуто три варіанти отримання глюкану за такою схемою:

- з використанням дворазової екстракції супутніх речовин 3% розчином NaOH (перший варіант);
- з використанням дворазової екстракції 6 % розчином NaOH (другий варіант);
- з використанням послідовної екстракції 3 % розчином і 6 % розчинами NaOH (третій варіант).

Для оцінки внеску окремих операцій у процес очищення глюкану від супутніх вуглеводів контролювали (таблиця 2.2):

- моносахаридний склад полісахаридів, що перейшли в розчин,
- моносахаридний склад твердого залишку.

З даних, наведених у табл. 2.2, видно, що в усіх розглянутих варіантах лужною екстракцією видаляють переважно манан. Після першої лужної обробки полісахаридний комплекс твердого залишку містить приблизно рівні кількості глюкану і манану, після другої екстракції – це практично чистий глюкан. При

цьому слід зазначити, що перший і третій варіанти обробки дають змогу більш ефективно очистити глюкан від домішки манану.

Таблиця 2.2

Моносахаридний склад гідролізатів екстракту і твердого залишку за різних умов обробки сировини (n = 3; p ≥ 0,95)

№ варіанту	Екстрагент	Екстракт		Залишок	
		Моносахариди	Відсоткове співвідношення	Моносахариди	Відсоткове співвідношення
Перший	3 % NaOH	Gal : Glc : *Man* : Fuc	34,1: 3,5 : 47,2 : 15,2	Glc : *Man*	54,1 : 45,9
	3 % NaOH	Glc : *Man*	10,3 : 89,7	Glc : *Man*	99,1 : 0,9
	0,5 н CH_3COOH	Glc	100	Glc	100
Другий	6 % NaOH	Gal : Glc : *Man* : Fuc	28,1: 10,5 : 47,2 : 14,2	Glc : *Man* : Fuc	50,2 : 49,8 : сліди
	6 % NaOH	Glc : *Man :* Fuc	10,3 : 89,7 : сліди	Glc : *Man*	94,1 : 5,9
	0,5 н CH_3COOH	Glc	100	Glc : *Man*	97,0: 3,0
Третій	3 % NaOH	Gal : Glc : *Man* : Fuc	34,1:3,5: 47,2: 15,2	Glc : *Man*	54,1:45,9
	6 % NaOH	Glc : *Man*	4,0 : 96	Glc : *Man*	99,3:0,7
	0,5 н CH_3COOH	Glc	100	Glc	100

За найбільш м'яких умов лужної обробки сировини (варіант 1) було отримано глюкан, що не містить домішок інших вуглеводів. Однак масова частка полісахариду в ньому не перевищувала 70 %, а на частку білкових речовин припадало понад 25 %. Це свідчить про те, що дворазове оброблення сировини 3 % розчином лугу не забезпечує достатньо повного видалення білка.

При жорсткішій лужній обробці (варіант 2) було отримано продукт, який містив 78,8 % вуглеводів і 18,7 % білка, проте в ньому були домішки манану.

Імовірно, ці умови (дворазова екстракція 6 % розчином лугу) призводять до денатурації білка, що входить до манопротеїнового комплексу. Тим самим ускладнюється його екстракція, що й обумовлює наявність домішок манану в цільовому продукті.

Аналіз отриманих даних дав змогу вважати доцільним використання ступеневої екстракції 3 %, а потім 6 % розчинами NaOH для видалення манану і білка та 0,5 н розчином CH_3COOH – для видалення глікогену (варіант 3). У цьому випадку одержуваний продукт містив 91,7 % глюкану, домішок білкової природи – 5,0 %. Його вихід досягав 14,7 %, що в 5,6 раза більше, ніж у разі використання стандартної схеми отримання цього полісахариду.

Таким чином, метод виділення β-глюкану з використанням пероксиду водню має переваги порівняно зі стандартною схемою його добування: він дає змогу одержати продукт із вищим виходом без застосування трудомістких та енергоємних операцій. Крім того, додатково можна отримати препарати манопротеїнового комплексу з лужних екстрактів.

2.3.3 Характеристика отриманих продуктів

Б е т а - г л ю к а н

Для підтвердження належності отриманого полісахариду до категорії β-(1→3)/(1→6)-глюканів використовували поляриметрію, ІЧ-спектроскопію та ферментативні методи [55].

У гідролізатах досліджуваних полісахаридів виявлено тільки глюкозу. Величини їхнього питомого оптичного обертання перебувають в інтервалі від -8,5° до -9,0° ($[\alpha]_{20}D$ стандартного глюкану становить -8,7) і відповідають літературним даним [40,41].

Отримані глюкани дають негативну реакцію з йодом, що свідчить про відсутність у них домішки глікогену, який входить до складу дріжджів. Крім того, під час обробки досліджуваних зразків α-амілазою, яка розщеплює глікоген і крохмаль, утворення водорозчинних вуглеводів - продуктів гідролізу глюканів - виявлено не було. І навпаки, ці полісахариди розщеплюються ферментними

препаратами з β-(1→3)- і β-(1→6)-глюканазною активністю.

З літературних джерел відомо, що для ІЧ-спектрів β-глюканів характерні смуги поглинання при 1080 см$^{-1}$, 1040 см$^{-1}$, 994 см$^{-1}$, 960 см$^{-1}$, 893 см$^{-1}$ і 794 см$^{-1}$ [40]. Також є дані, що наявність смуг поглинання за 2920 см$^{-1}$, 1370 см$^{-1}$, 1250 см$^{-1}$, 1200 см$^{-1}$, 1155 см$^{-1}$ і 1075 см$^{-1}$ притаманна глюканам, головний ланцюг яких побудовано з β-(1→3)-D-глюкопіранозних залишків [41,56].

ІЧ-спектри всіх досліджуваних препаратів (рис. 2.7 – 2.8), зокрема й стандартного зразка, подібні до спектрів β-глюканів дріжджів, описаних у літературі, у них виявлено всі смуги поглинання, характерні для β-(1→3)-D-глюкану.

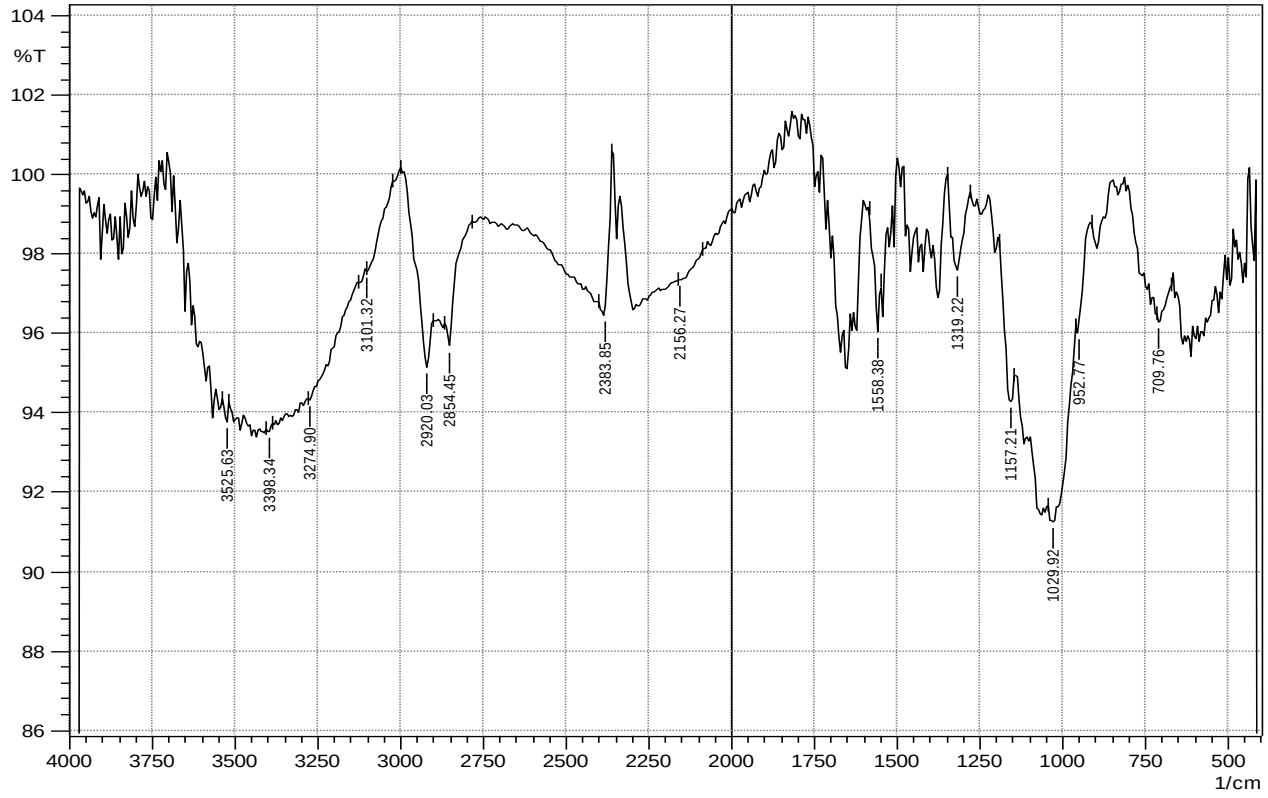


Рис. 2.7 ІЧ-спектр β-глюкану, отриманого стандартним методом.

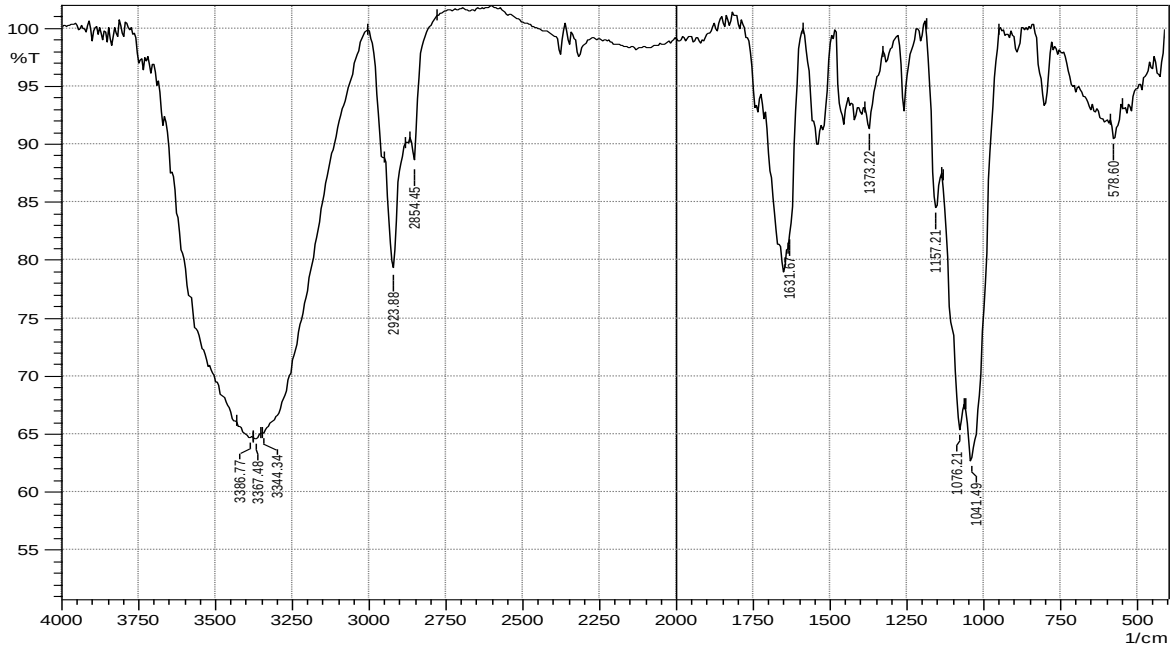


Рис. 2.8 ІЧ-спектр β-глюкану, отриманого пероксидним методом

У досліджуваному зразку були виявлені також смуги поглинання при 1542 $см^{-1}$ (1550…1575 $см^{-1}$ – амід II), що свідчить про наявність у них залишку білкових речовин. Це узгоджується з результатами дослідження їхнього хімічного складу.

Смуги поглинання, властиві карбонільним і карбоксильним групам, наявності яких можна було очікувати в спектрах зразку, отриманого пероксидним способом, виявлені не були.

У диференціальному спектрі (рис. 2.9) глюкану, отриманого стандартним методом, відносно глюкану клітинних стінок дріжджів виявлено збільшення інтенсивності смуг поглинання в ділянці 900...1500 $см^{-1}$, яка характеризує коливання С-Н, С-О і О-Н-зв'язків, коливання глікозидного зв'язку і глюкопіранозного кільця. Збільшення інтенсивності смуг за 1035, 1015 і 1000 $см^{-1}$, що належать до валентних коливань С-О-зв'язків первинної спиртової групи, смуги за 1155 $см^{-1}$, яка відповідає валентним коливанням місткового зв'язку С-О-С, смуги за 1430 $см^{-1}$, яка відповідає деформаційним коливанням CH_2 та смуги за 1202 $см^{-1}$, яка належить до симетричних валентних коливань глікозидного зв'язку, свідчить про вищий ступінь чистоти отриманого β-глюкану порівняно з вихідним.

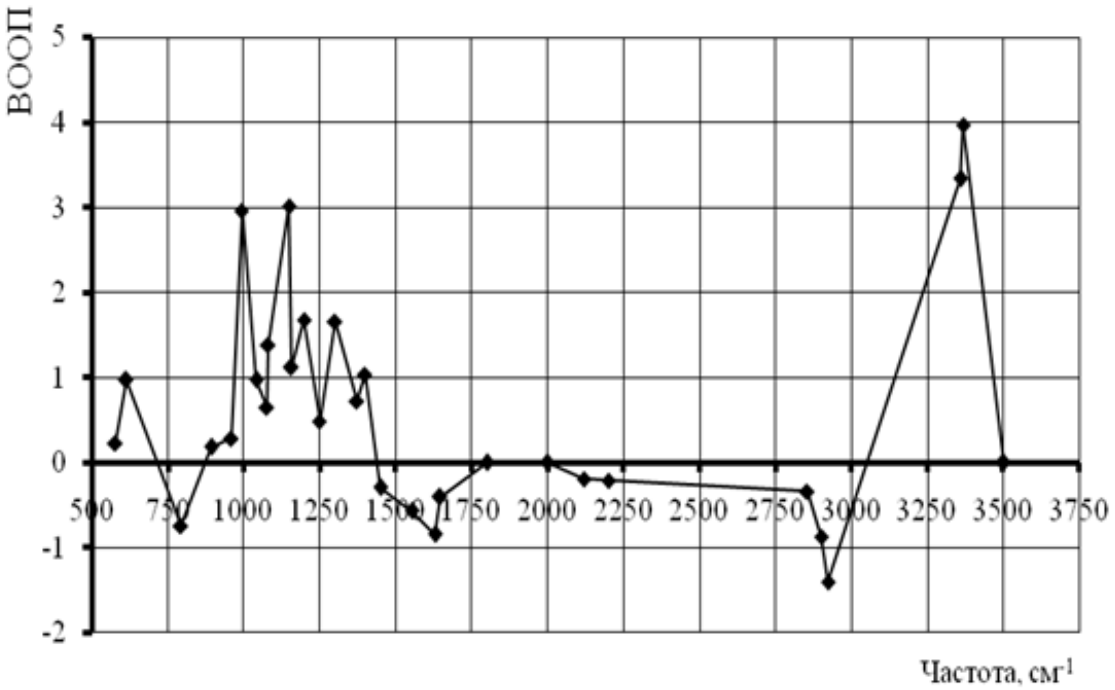


Рис. 2.9 Диференціальний спектр порівняння глюкану клітинних стінок дріжджів, отриманого стандартним відносно глюкану – пероксидним методом.

Спостерігається збільшення інтенсивності смуг поглинання в ділянці 3100...3500 $см^{-1}$, що відповідає валентним коливанням гідроксильних груп, які беруть участь в утворенні міжмолекулярних водневих зв'язків, що вказує на міцнішу сітку водневих гідроксильних груп у структурі досліджуваного зразку, що узгоджується з результатами розрахунків індексів кристалічності полісахаридів, проведених за їхніми ІЧ-спектрами.

Одним з основних методів, що дають змогу судити про характер зв'язків між моносахаридними залишками в полісахаридах, є спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР). Тому наступним етапом характеристики будови глюкана здійснювали за допомогою методів ^{1}H і ^{13}C ЯМР-спектроскопії (рис. 2.10 і 2.11 відповідно).

На спектрі (рис. 2.10) 1Н ЯМР (розчинник *ДМСО-d6*) виявлено інтенсивний пік (4,5 ppm), що ототожнюється з наявністю β-аномерної форми макромолекул. Хімічні зрушення протонного магнітного резонансу при 3,00...4,50 ppm вказують, що цей полімер є сполукою вуглеводної природи. На

спектрі спостерігаються сигнали протонів при аномерних атомах вуглецю 4.47 ppm (H^1 β-1→3-зв'язана глюкопіраноза) і при 4.36 (H^1 β-1→6-зв'язана глюкопіраноза). Відношення інтенсивності цих сигналів дало змогу визначити співвідношення β-1→3- і β-1→6-зв'язків у досліджуваному зразку - 7,8:1,0.

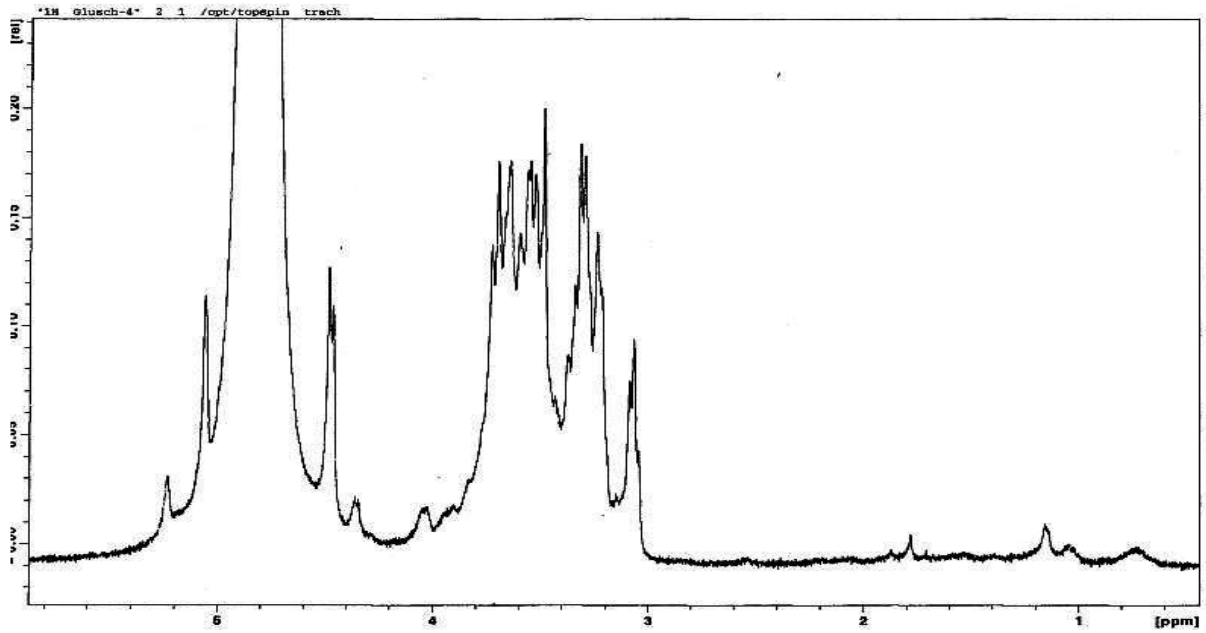


Рис. 2.10 ^{1}H ЯМР-спектр.

На спектрі (рис.2.11) ^{13}C ЯМР ідентифіковано сигнал при 102.4 ppm, який свідчить про наявність виключно β-аномерних атомів вуглецю, що узгоджується з даними спектроскопії ^{1}H ЯМР.

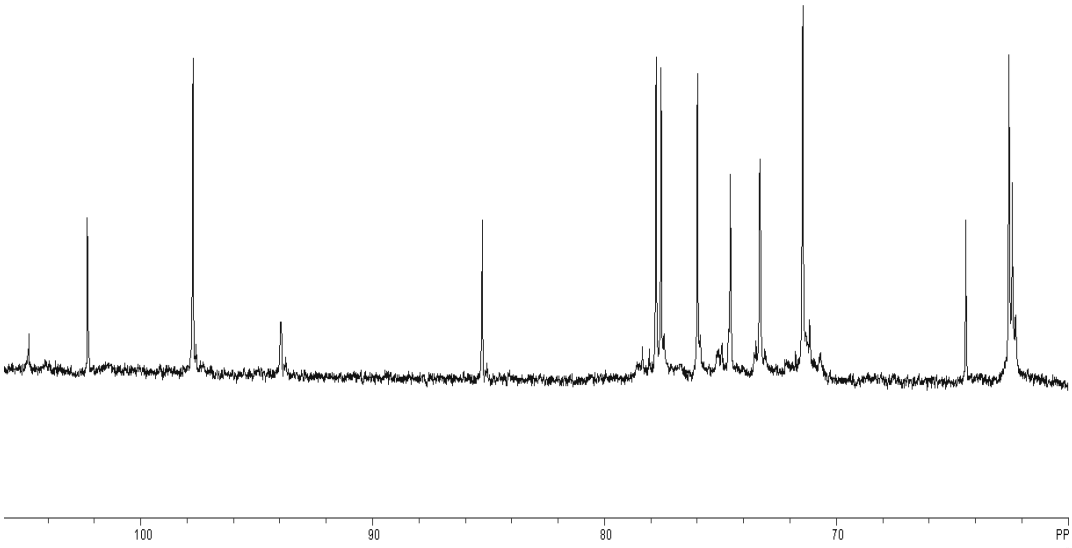


Рис. 2.11 ^{13}C ЯМР-спектр досліджуваного глюкана

У таблиці 2.3 подано літературні дані, що характеризують хімічні зсуви сигналів у спектрах ^{13}C ЯМР глюканів різної структури та результати, отримані під час відповідних досліджень дослідного зразка глюкану.

Таблиця 2.3

Хімічні зсуви сигналів у спектрах ^{13}C ЯМР глюкану

Вуглеводні залишки	Хімічні зсуви, ppm						Глюкан
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
→3)-β-Glc-(1→	102.4	72.9	85.6	71.5	73.4	62.5	Досліджу-ваний зразок
→3,6)-β-Glc-(1→	104.6				75.8		
→3)-β-Glc-(1→	102.85	72.94	85.95	68.41	76.26	60.91	Глюкан клітинних стінок дріжджів [57]
→3)-β-Glc-(1→	102.49	72.46	85.76	68.18	76.02	60.67	Глюкан клітинних стінок дріжджів [58]
→6)-β-Glc-(1→	104.66	74.71	76.57	71.14	77.25	70.48	Грибів [59]
→3,6)-β-Glc-(1→	102.96	73.04	85.76	68.53	74.96	68.68	Грибів [60]
→3,4)-β-Glc-(1→	103.02	73.69	85.34	68.99	76.48	61.97	Ячменю [61]

На спектрі ^{13}C ЯМР досліджуваного зразка також виявлено шість інтенсивних сигналів 102,4 (C1), 72,9 (C2), 85,6 (C3), 71,5 (C4), 73,4 (C5) та 62,5 (C6) ppm, притаманні β-(1→3)-глюканам. Присутність сигналів при 104,6 (C1) і 75,8 (C5) ppm, свідчить про наявність β-(1→6)-зв'язаних залишків глюкози у вигляді відгалужень, приєднаних до основного ланцюга. Співвідношення інтенсивностей сигналів 102,4 і 104,6 ppm дало змогу визначити співвідношення β-1→3- і β-1→6-зв'язків у досліджуваному зразку, яке становило 8,0:1,0, що узгоджується з даними ^{1}H ЯМР-спектроскопії.

Аналізуючи дані таблиці 2.3, можна зробити висновок, що результати ^{13}C ЯМР-спектроскопії отриманого глюкану відповідають літературним даним і свідчать про те, що будова ідентична будові інших β-D-(1→3)/(1→6)-глюканів. Його основний ланцюг побудований із залишків β-D-глюкопіраноз, які з'єднані між собою (1→3)-глікозидними зв'язками. До положень О-6 моносахаридних залишків кора приєднуються бічні відгалуження, одне відгалуження припадає в середньому на 8 моносахаридних ланок кора, що відповідає ступеню розгалуження 0,12.

Наступним етапом роботи було вивчення надмолекулярної структури отриманого продукту. За своєю надмолекулярною структурою глюкан дріжджів подібний до целюлози. Його молекули містять кристалічні й аморфні ділянки, що відрізняються реакційною здатністю, утворюють мікро- і макрофібрили [54-55]. В аморфних утвореннях реакції відбуваються швидше, ніж у кристалічних, що мають вищий ступінь упорядкованості.

Надмолекулярну структуру глюканів (контрольного та дослідного зразків) досліджували, використовуючи методи ІЧ-спектроскопії та кислотного гідролізу, а також за допомогою атомно-силової мікроскопії.

На підставі результатів ІЧ-спектрокопії визначили індекси кристалічності та симетрії зразків (табл. 2.4). Перші характеризують співвідношення кристалічних і аморфних ділянок, другі – щільність і міцність сітки водневих зв'язків.

Зростання індексу кристалічності свідчить про збільшення частки кристалічної фракції в зразку, збільшення індексу симетрії – про зниження впорядкованості структури.

Таблиця 2.4

Індекси кристалічності та симетрії препаратів (n = 3; p ≥ 0,95)

Зразок	Індекс кристалічності	Індекс симетрії
Контроль	0,95	1,25
Досліджуваний зразок	2,55	0,86

Контрольний зразок має найменший індекс кристалічності і, відповідно, - найбільший індекс симетрії, що характеризує його як найменш впорядкований у ряду досліджуваних препаратів.

Використання пероксиду водню для виділення препаратів глюкану супроводжується значним підвищенням ступеня їхньої кристалічності порівняно з контрольним зразком. Це було очікувано, оскільки під дією розчинів H_2O_2, більш імовірним є руйнування ділянок полісахаридів з аморфною структурою. Між собою зразки, отримані пероксидним методом, різняться значно менше, проте все ж таки простежується тенденція збільшення їхньої впорядкованості зі зростанням концентрації розчину пероксиду водню, яким обробляли сировину.

Відомо, що швидкість і глибина гідролізу полісахаридів, яким притаманна надмолекулярна структура, розведеними розчинами мінеральних кислот залежать від вмісту в них аморфної фракції. На рис. 2.12 представлено криві, що ілюструють кінетику гідролізу зразків глюкану 2 % розчином хлористоводневої кислоти.

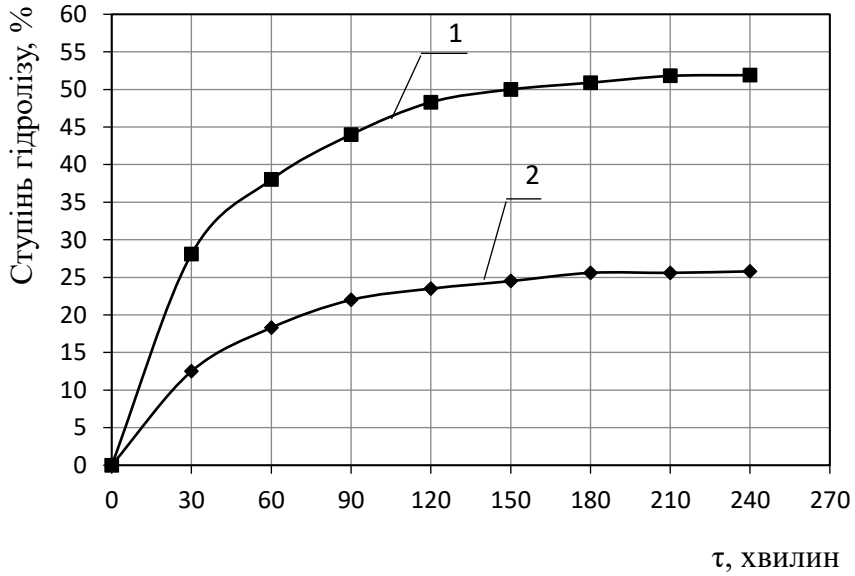


Рис. 2.12 Кінетика кислотного гідрозу β-глюканов: 1 – стандартний; 2 – досліджуваний

Як видно з наведених даних, глибина гідролізу β-глюкану, виділеного стандартним методом, значно – практично вдвічі – вище, ніж полісахариду, отриманих із застосуванням пероксидного реагенту, що може бути обумовлено

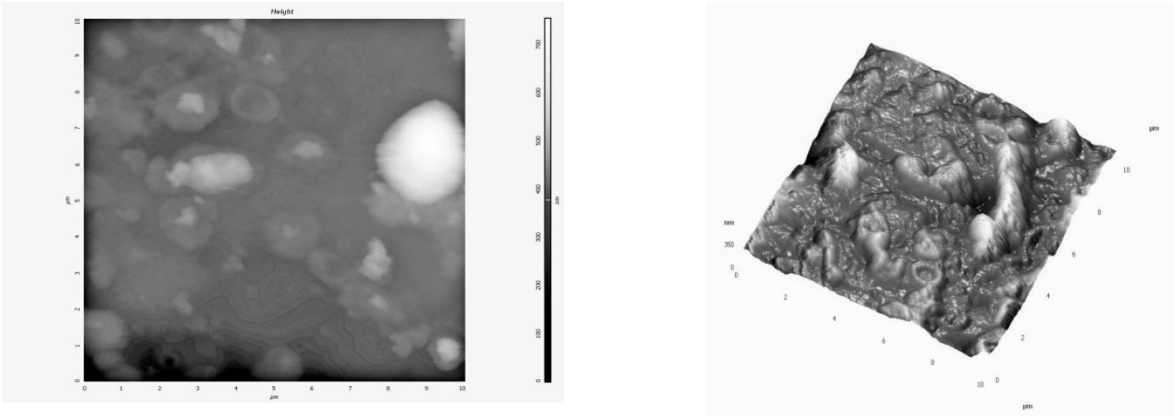
меншою впорядкованістю його структури. Ці результати узгоджуються з даними визначення індексів кристалічності та симетрії (табл. 2.4), розрахованих на підставі даних ІЧ-спектроскопії.

Сукупність отриманих результатів є свідченням вищого ступеня впорядкованості структури глюканів, отриманих пероксидним методом, що є наслідком деструкції аморфних ділянок макромолекул під впливом пероксиду.

Використання атомно-силового мікроскопа (АСМ) дає можливість атомному рівні проводити аналіз структур різноманітних матеріалів. Крім того, АСМ забезпечує отримання 3D-зображень поверхневих ультраструктур з молекулярною роздільною здатністю в режимі реального часу.

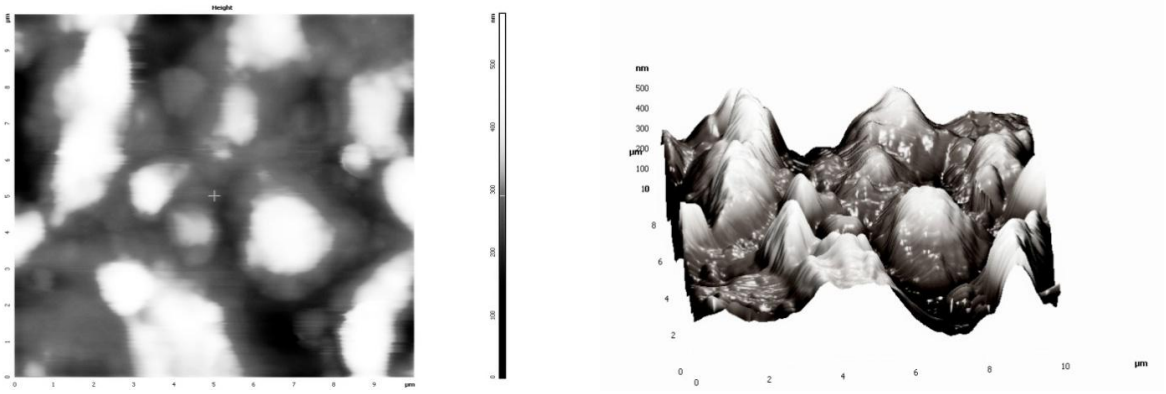
Завдяки своїм можливостям, АСМ успішно застосовується для візуалізації ряду полісахаридів, у тому числі курдлану, шизофілану, склероглюкану, карагінанам, зернових глюканів та ін [61].

На рис. 2.13 та 2.14 представлено двовимірні та 3D-мірні зображення зразків глюканів (рис. 2.13 – глюкан, виділений стандартним методом; рис. 2.14 – отриманого пероксидним методом), одержаних за допомогою АСМ.



А. – двомірне зображення Б. – 3D- зображення

Рис. 2.13 Зображення поверхні стандартного глюкану, побудовані за результатами АСМ при 10×10 нм.



А. – двомірне зображення Б. – 3D- зображення

Рис. 2.14 Зображення поверхні глюкану, отриманого пероксидним методом, побудовані за результатами АСМ при 10×10 нм.

Як видно з наведених даних, в глюканах присутня фібрилярна ультраструктура. Розміри волокон дослідних зразків знаходяться в межах від 0,6 до 13 нм, контрольного – 12 нм. Різниця в розмірах волокон може бути пояснена тим, що під дією окислювача, крім руйнування аморфних ділянок (на рис. 2.14 ці ділянки відбиваються біло-сірим відтінком), відбувається зменшення розмірів мікроволокон. При цьому зазначені розміри відповідають даним, що є в літературі і становлять трохи більше 1,8 нм [62].

М а н о п р о т е ї н о в и й к о м п л е к с

Одним з продуктів переробки пекарських дріжджів є лужний розчин, який використовували для видалення білкового компоненту та манану. Отриманий екстракт нейтралізували хлоридною кислотою до pH =7 та осаджували спиртом біополімерну складову. Хімічний склад отриманих продуктів представлено у таблиці 2.5.

Таблиця 2.5

Характеристика отриманих продуктів

№	Концентрація гідроксиду натрію, %	Вуглеводи,%	Білок, %	Вихід, %
1	3	40,2	47,1	41,5
2	6	80,0	15,4	32,4

Як видно з представлених даних, при обробці дезентегрованих клітинних стінок пекарських дріжджів 3 % розчином NaOH отримано продукт, в якому масова доля вуглеводів не перевищала 50 %, а мономерний склад гідролізату показав, що домінуючим моносахаридом є маноза та у невеликій кількості залишки глюкози, що може свідчити про екстракцію не тільки манану, а й частково глюкану, який входить до складу клітинної стінки дріжджів. При екстракції 6% розчином NaOH, дозволило отримати продукт, в якому суттєво зменшено вміст білкової компоненти, а вуглеводної, навпаки, значно збільшився. Гідролізат продукту, отриманого при використанні 6 % розчину NaOH містив включно залишки манози. Очевидно, що в процесі виділення при таких умовах має місце не тільки видалення супутніх вуглеводів, а ще і білкових речовин. Отже продукт містив біля 80% вуглеводів і 15% білка.

Для підтвердження отриманого продукту до категорії манопротеїну проводили ферментативну деструкцію, ці полісахариди розщеплюються ферментними препаратами з мананазною активністю. Крім того, ІЧ-спектри (рис.2.15) містять смуги поглинання, що виникають від ν(CC) валентні коливання ν(COC) при 1152 $см^{-1}$, призначені смуги при 810 $см^{-1}$ до відповідної α-маннозидної (C1–H) деформації, а також найбільша інтенсивність в смуги ν(OH) на нижчій частоті (3425 $см^{-1}$ і 3416 $см^{-1}$).

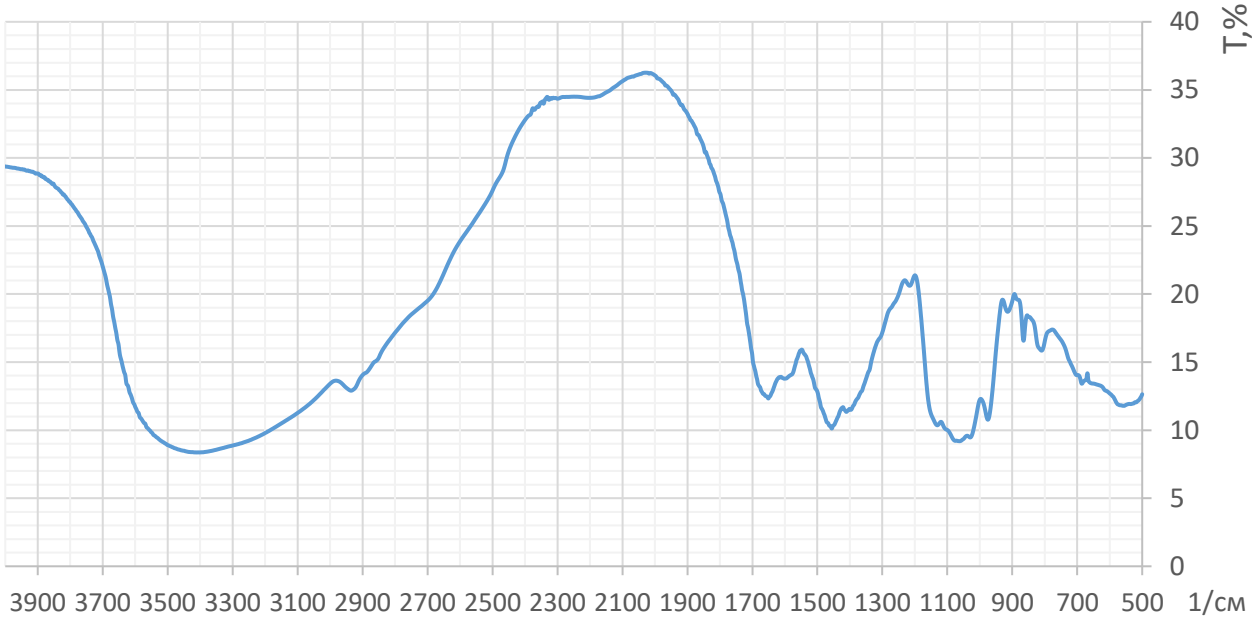


Рис. 2.15 ІЧ-спектр манопротеїнового комплексу

Наявність смуг карбонільної групи при 1650 $см^{-1}$ виявилося як залишковий білок в складі манопротеїнового комплексу. Смуги поглинання при 1029, 914, 883 та 814 $см^{-1}$, при яких манан дріжджів містить невелику кількість глюкану відсутні [63].

ВИСНОВКИ

На основі результатів теоретичних та експериментальних досліджень розроблено метод виділення полісахаридів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Розроблено спосіб отримання β-глюкану та манопротеїну з клітинних оболонок дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae*, який відрізняється простотою виконання і дозволяє одержувати цільові продукти з високим виходом і вмістом полісахаридної складової.
2. Обґрунтовано спосіб виділення структурного β-глюкану клітинних стінок дріжджів з використанням пероксиду водню як реагенту для дезінтеграції клітинних оболонок. Визначено режими екстракції речовин, що супроводжують глюкану: манопротеїнового комплексу – за допомогою ступінчастої обробки 3 % NaOH (t = 18…23 °C, τ = 30 хв) та 6 % NaOH (t = 50…60 °C, τ = 60 хв); глікогену - 0,5 н CH_3COOH.
3. На основі ІЧ та ЯМР спектроскопії, встановлено будову глюкану клітинних стінок дріжджів, отриманого пероксидним методом: його макромолекула має розгалужену структуру, в основі якої лежить кор, що складається із залишків D-глюкопіраноз, які з'єднані β-(1→3)-глікозидними зв'язками. До положень О-6 моносахаридних залишків кора приєднуються бічні відгалуження, ступінь розгалуження 0,12.
4. Показано, що в структурі глюкану присутні ділянки з різним ступенем упорядкованості. Обробка дріжджів H_2O_2 супроводжується деструкцією аморфних утворень і збільшенням ступеня кристалічності препаратів глюкану в 2,6 рази в порівнянні зі стандартним зразком.
5. На основі даних ІЧ-спектрів підтверджено отримання з лужної екстракції біополімеру, який відносить до категорії манопротеїну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Tzianabos, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. // Clin. Microbiol. Rev. 2000. –13, –523–533 p.
2. Yin, M. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. / M. Yin, Y. Zhang, H. Li // Front. Immunol. 2019. – 10, –145 p.
3. Di Carlo, F.J. On the composition of zymosan / F.J. Di Carlo, J.V. // Fiore Science 1958. – 127, – 756–757 p.
4. Мікробіологія. Том 1 : підручник / Сергійчук М. Г., Сківка Л. М., Сергійчук Т. М. та ін. — К. : ФОП Маслаков, 2020. — 500 с.
5. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
6. Штам дріжджів Saccharomyces cerevisiae ІМВ-У-5016 для одержання пресованих хлібопекарських дріжджів в двопродуктовому виробництві спирту і хлібопекарських дріжджів: пат. № 47821 Україна : МПК C12N1/18, //(C12N1/18, C12R1:865) ; заявл. 28.09.2001 ; опубл. 15.01.2004, Бюл. № 1.
7. Trey Sato. Saccharomyces cerevisiae YB210 v1.0. Joint Genome Institute – JGI MycoCosm. Nucleic Acids Res. 2014. – 42(1), –26-31 p.
8. Виробництво дріжджів, сировина і основні стадії технологічного процесу: [Веб-сайт]. URL: https://www.systopt.com.ua/article-vyrobnyctvo-drizhdzhiv-syrovyna-i-osnovni-stadiyi-tehnologichnogo-procesu?srsltid=AfmBOoryo9szykRw1bJj3urAE5VBrdzQStOQ3Zw2tTnA7mS_OHv_az68 (дата звернення: 10.09.2024).
9. Inada, T. One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins / T. Inada, E. Winstall, S. Z. Tarun, R. Yates Cambridge University Press – 2002. – № 8 – 948-958 p.
10. Ostrowicz, C. W. Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics / C. W. Ostrowicz, C. T. Meiringer, C. Ungermann, Department of Biology, Biochemistry Section, University of Osnabrück, Osnabrück, Germany. – 2008. – Т. 4. – №1 – 5-19 p.

11. Cadou, A. Chapter 3 - The Nucleus-Vacuole Junction in Saccharomyces cerevisiae / A. Cadou, A. Mayer // Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. 2015. – Volume 7: Role of Autophagy in Therapeutic Applications, – 69-77 p.
12. Thelen, N. Visualization of Chromatin in the Yeast Nucleus and Nucleolus Using Hyperosmotic Shock / N. Thelen, J. Defourny, Denis L. J. Lafontaine, M. Thiry // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – 22(3), –1132 p.
13. Jonathan, L. Mechanisms of chromosome number evolution in yeast / L. Jonathan, L. Gordon, P. Byrne // PLoS Genet – 2011. – №7, – 7-20 p.
14. Bertolo, A. P. Yeast (Saccharomyces cerevisiae): evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility / A. P. Bertolo, A. P. Biz, A. P. Kempka, E. Rigo, D. Cavalheiro // J Food Sci Technol. – 2019. – 56(8), – 3697–3706 p.
15. Onofre, Sideney B., et al. Chemical Composition of the Biomass of Saccharomyces cerevisiae - (Meyen ex E. C. Hansen, 1883) Yeast obtained from the Beer Manufacturing Process. // International Journal of Advanced Engineering Research and Science 2018. – vol. 5(8), – 568-562 p.
16. Watson, T. G. Amino-acid pool composition of Saccharomyces cerevisiae as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source / T.G. Watson, Journal of General Microbiology, – 1976. – 96, – 263-268 p.
17. Frank, A. Proteins of yeast (Saccharomyces cerevisae) / A. Frank, C. Sonka // J. Biol. Chem., – 1995. – Vol 2, – 703-715 p.
18. Yamada, E.A. Yeast (Saccharomyces cerevisiae) Protein Concentrate: Preparation, Chemical Composition, and Nutritional and Functional Properties // J. Agric. Food Chem. 2005. – 53(10), – 3931–3936 p.
19. Rattray, J.B. Lipids of yeasts. / Rattray JB, Schibeci A, Kidby DK. // Bacteriol Rev. 1975. – 39(3), – 197-231.
20. Jones, E. W. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae / E. W. Jones, J. R. Broach, J. R. Pringle. // New York – 1992. – 810 p.

21. Gancedo, J.M. Carbohydrate Metabolism in Yeast. / Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells. 1986 – 245–286 p.
22. Усов, A. I. Polysaccharides / ed. by G. O. Aspinall, N.Y. – 1983, – V.2. – *195-285 p.*
23. Fales, F.W. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells // Journal of Biological Chemistry. 1951. – 193(1), – 113-124 p
24. Yoon, S.H. Specificity of yeast (Saccharomyces cerevisiae) in removing carbohydrates by fermentation. / S.H. Yoon, R. Mukerjea, J.F. Robyt // Carbohydr Res. 2003. – 1;338(10), – 1127-1132 p.
25. Chenxi, Qiu. Dynamictuning yeast storage carbohydrate improves the production of acetyl-CoA-derived chemicals Chenxi Qiu, Huilin Tao, Yu Shen, Qingsheng Qi, Jin Hou // iScience, 2023. – Volume 26(1), –105817
26. Aspinall, G. O. Structural chemistry of the hemicelluloses. / Adv Carbohydr Chem 1959. – 14, – 429–468
27. Frevert, J. Saccharomyces cerevisiae structural cell wall mannoprotein / J. Frevert, C.E. Ballou // Biochemistry. 1985. – № 24. – P. 753-759.
28. Ivanova, V. Residual brewing yeasts as a source of beta-glucans / V. Ivanova, E. Antontceva, R. Harbah, T. Meledina, M. Shamtsyan / E 3S Web of Conferences – 2020, – 164, – 7 p.
29. Harbah R., Meledina T. V., Manshin D. V., Andreev V. V. Mannan: structure, biosynthesis, and methods extraction from yeast Saccharomyces cerevisiae. Journal of International Academy of Refrigeration. 2021. No 1. p. 59–65.
30. Sun-sang, J. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages / J. Sun-sang, S. Nelson, C. Silverstein, J. // Cell biology – 1993. – № 96. – 160-167 p.
31. Khoushab, F. Chitin Research Revisited / F. Khoushab, M. Yamabhai // Mar. Drugs. 2010. – 8(7), – 1988-2012 p.
32. Cabib, E. Presence of a large β(1-3)glucan linked to chitin at the Saccharomyces cerevisiae mother-bud neck suggests involvement in localized growth control / E. Cabib, N. Blanco, J. Arroyo, Eukaryot Cell. – 2012, – 11(4): – 388–400 p.

33. Kapteyn, J. C. Altered extent of cross-linking of β 1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in Saccharomyces cerevisiae mutants with reduced cell wall β-1,3-glucan content. / J. C. Kapteyn // J. Bacteriol. – 1997 – 179: – 6279-6284 p.
34. Di Luzio, N. R. Comparative tumor-inhibotory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. / Di Luzio N.R., Williams D.L. // Int J Cancer, – 1979; – 24(6) – 773-779 p.
35. Di Luzio, N. R. Glucan induced inhibition of tumor growth and enhancement of survival in a variety of transplantable and spontaneous murine tumor models. / N.R. Di Luzio, R. B. McNamee, D.L. Williams, K.M. Gilbert, M.A. Spanjers // Adv. Exp. Med. Biol. – 1980; –121 – 269-290 p.
36. Manners, D. J. The structure of a beta-(1-3)-D-glucan from yeast cell walls / D. J. Manners, J.C. Patterson J. // Biochem, – 1973; –135 (1)– 19-30 p.
37. Manners, D. J. A Re-examination of the molecular structure of yeast glucan / D.J. Manners, A. J. Masson, J.C. Patterson // J. Biochem, – 1965; – 98 – 19-20 p.
38. Kim, Y.T. Structural characterization of [beta]-D-(1 → 3, 1 → 6)-linked glucans using NMR spectroscopy / Y.T. Kim, E.H. Kim, D.L. Williams, S.T. Lim // Carbohydrate research. 2000; – 328(3) – 331–341 p.
39. Kim, Y.T. Enhanced production of (1-3)-b-D-glucan by a mutant strain of Agrobacterium species. / Y.T. Kim, K.E. Ryu, W.A. Choi, I.Y. Lee. // J Biochem – 2003; – 16 – 163-168 p.
40. Zekovic, D.B. Mild pfitzner-moffat oxidation of the (1→3)-β-D-glucan from Saccharomyces cerevisiae / D. B.Zekovic, M. Radulovic, A. Nastasovic, M. M. Vrvic, G. Kogan // Chemical papers. – 2006, – 60 (3), – 243-248 p.
41. Zlatkovic, D. A glucan from active dry baker's yeast Saccharomyces cerevisiae: A chemical and' enzymatic investigation of the structure / D. Zlatkovic, D. Jacovljevic, D. Zekovic, // J. Serb. Chem. Soc. 2003. – 68, (11) – 805-809 p.
42. Korolenko, T. A. Glucan and Mannan—Two Peas in a Pod /T. A. Korolenko, N. P. Bgatova, V. Vetvicka // Int. J. Mol. Sci. 2019, – 20, – 318 p.
43. Kanagawa, M. Structural insights into recognition of triple-helical β-glucans by an insect fungal receptor / M. Kanagawa, T. Satoh, A. Ikeda, A. Yoshiyuki, O.

Naohito, Y.Yoshiki // J. of Biological chem – 2011, – Vol 286 – № 33 – 29158-29165 p.

44. Hunter, K. W. Microparticulate b-glucan upregulates the expression of B7. 1, B7. 2, B7-H1, but not B7-DC on cultured murine peritoneal macrophages / Hunter K.W. Gault R.A., Berner M.D. // Immunol Lett, – 2002; – 93(1) – 71-78 p.
45. Vetvicka, V. Effects of glucan on immunosuppressive actions of mercury. V. Vetvicka, J. Vetvickova // J. Med. Food 2009, – 12. – 1098–1104 p.
46. Novak, M. Glucans as biological response modifiers. Endocr. Metab. Immune Disord. / M. Novak, V. Vetvicka. // Drug Targets 2009. – 9,– 67–75 p.
47. Petravic-tominac, V. l. Biological effects of yeast β-glucans / Vlatka Petravic-tominac, Vesna Zechner-krapan, Slobodan Grba, Siniša Srecec // Agriculturae Conspectus Scientificus – 2010. – Vol. 75. – 149–158 p.
48. Tirunavalli, S.K. Protective effect of β-glucan on Poly-induced acute lung injury/inflammation: Therapeutic implications of viral infections in the respiratory system. / Tirunavalli SK and all // Life Sci. 2023. – 330, – 122027 p.
49. Лобова О.В., Левішко А.С., Гуменюк І.І. Біотехнології: Навч. посібник. – К.: Видавництво НУБіП України 2021. 548 с.
50. Рибалкін М. В. Визначення оптимального методу дезінтеграції клітин грибів Candida albicans та Candida tropicalis / М. В. Рибалкін // Актуал. питання фармац. та мед. науки та практики. - 2014. - № 2. - 71-75 с.
51. A comparative investigtion of the ir spectra of a carbohydrate / Sinyayev V. A. // Journal of Chemical Technology and Metallurgy 2020 – 55(4), – 724-729 p.
52. Methods in Carbohydrate Chemistry: General carbohydrate methods Melville Lawrence Wolfrom / Academic Press, 1962 – 603 p.
53. Zarrabi, A. Use of Hydrogen Peroxide Vapour for Microbiological Disinfection in Hospital Environments: A Review / A. Zarrabi, L. Tian // Bioengineering (Basel). 2024. – 11(3), – 205 p.
54. Northcote, D. H. Yeast cell-wall synthesis / R. Sentandreu, D. H. Northcote // J. Biochem. – 1969 – 116, – 231-240 p.

55. Dalonso, N. β-(1→3),(1→6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons / Nicole Dalonso, Gustavo Henrique Goldman, Regina Maria Miranda Gern // Appl Microbiol Biotechnol. – 2015 – 99(19), – 7893-906 p.
56. Bacic, A. Isolation and characterization of polysaccharides / A. Bacic, B.A. Stone // Carbohydr. Res. – 2005. Vol. 7. –325–330 p.
57. Medeiros, S. V. Effects of purified saccharomyces cerevisiae (1→3)-β-glucan on venous ulcer healing / S. V. Medeiros, S. L. Cordeiro, J. E. Cavalcanti, K. M. Melchuna and all Int. J. Mol. Sci. – 2012. – 13, – 8142-8158 p.
58. Freimund, S. A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. / S. Freimund, M. Sauter, O. Käppeli, H. Dutler, Carbohydr. Polym. 2003. – 54, – 159-171 p.
59. Bi, H. A novel water-soluble β-(1→6)-D-glucan isolated from the fruit bodies of Bulgaria inquinans (Fries)./ Bi, H.; Ni, Z.; Liu, X.; Iteku, J.; Tai, G.; Zhou, Y.; Zhao, J. Carbohydr. Res. 2009. – 344, – 1254–1258 p.
60. Khaytmetova, S. B. Isolation, physico-chemical characteristics and acute toxicity determination of water-soluble polysaccharide from basidial raw material Ganoderma lucidum / Saida Baqijanovna Khaytmetova, Turaev A.S., Gulnoza Khalilova, Bahtiyor Muhitdinov //Bioorganic chemistry: 2024. – 50(1), – 37-50 p.
61. Dias, P. High-field, C-N.M.R. spectroscopy of β–D glucans, amylopectin and glucogen / P. Dias, A.S. Perlin // Carbohydr. Res. – 1982. –Vol. 100. № 1. – 103–116 p.
62. Abu-Lail, N.I. Polysaccharide properties probed with atomic force microscopy. / N.I. Abu-Lail, T.A. Camesano // J. Microscopy. 2003. –212, – 217-238 p.
63. Kwang-Rim Baek. Yeast cell wall mannan structural features, biological activities, and production strategies / Kwang-Rim Baek, Sudha Rani Ramakrishnan, Soo-Jung Kim, Seung-Oh Seo // Heliyon. 2024. – 10(6), – e278962024p.

ДОДАТОК А

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСІТЕТ

ЗБІРНИК ТЕЗ ДОПОВІДЕЙ

МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ

«ТЕХНОЛОГІЇ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ І КОМБІКОРМІВ»

Одеса 2024

ОСОБЛИВОСТІ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ПОЛІСАХАРИДІВ ДРІЖДЖІВ

Науменко К. І., к.т.н., доцент, **Черно Н. К.,** д.т.н., проф.,
Одеський національний технологічний університет,
Снігур Д. В., к.х.н. доцент,
Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

Полісахариди – природні полімери, які широко використовуються в харчових технологіях. Деякі представники цього класу застосовуються як харчові добавки для створення продуктів харчування із заданими функціонально-технологічними характеристиками. Одним з актуальних напрямів використання полісахаридів є створення на їхній основі біологічно активних добавок до їжі, які виявляють широкий спектр функціонально-фізіологічних властивостей. До таких полісахаридів, що містяться в дріжджах, відносяться манан і бета-глюкани. Ідентифікація цих сполук має значне значення як для фундаментальних досліджень, так і для практичних застосувань у харчовій, фармацевтичній та біотехнологічній галузях.

Першим кроком в ідентифікації полісахаридів є їх екстракція. Для цього використовуються різні методи, включно з гарячою водою, спиртовими розчинами та ферментативними обробками. Правильний вибір методу екстракції критичний для отримання чистого зразка, оскільки він впливає на подальший аналіз.

Для розділення та ідентифікації полісахаридів застосовують хроматографічні методи, такі як високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) і газова хроматографія (ГХ). Ці методи дають змогу визначити молекулярну масу і структуру полісахаридів. Крім того, спектроскопічні методи, такі як інфрачервона (ІЧ) і ядерно-магнітна резонансна (ЯМР) спектроскопія, використовуються для вивчення функціональних груп і структурних особливостей полісахаридів.

Ідентифікація полісахаридів включає також вивчення їхньої біологічної активності. Багато полісахаридів, як бета-глюкани, мають антиоксидантні, протизапальні та імуностимулювальні властивості, що робить їх перспективними для медичних і фармацевтичних застосувань.

Таким чином, ідентифікація полісахаридів дріжджів є багатогранним процесом, що включає в себе різні методи екстракції, аналізу та вивчення біологічної активності. Однак методи виділення у чистому вигляді глюкану та манану мають ряд недоліків: трудоємкість, недостатня ступінь чистоти, модифікації отриманих продуктів та інше. Тому розробка простого та доступного методу виділення цих полісахаридів є актуальною задачою. У зв'язку з чим, метою роботи є розроблення простого способу виділення полісахаридів дріжджів та характеристика отриманих продуктів, а саме β-глюкану та манану, як перспективних функціонально-фізіологічно активних інгредієнтів у фармацевтичній та харчовій промисловості.

Розроблений спосіб передбачає два етапи: руйнацію клітинних оболонок та подальшу обробку реагентами для видалення супутніх глюкану речовин.

Для дезінтеграції клітинних оболонок хлібопекарських дріжджів використовували розчин H_2O_2 різної концентрації та варіювали співвідношення твердої і рідкої фаз, а також термін обробки. На наступному етапі дріжджову масу промивали дистильованою водою і центрифугували. Твердий залишок обробляли спочатку 3 %-им розчином NaOH впродовж 30 хвилин при кімнатній температурі, а потім 6 %-им розчином NaOH впродовж 60 хвилин при температурі 50…60 °С з періодичним перемішуванням для видалення білка та манану, центрифугували, промивали дистильованою водою та додавали 0,1 н розчин HCl до pH середовища 5,0. Далі отриманий залишок суспендували у 0,5 н розчині оцтової кислоти та нагрівали до температури 75 °С для видалення глікогену, промивали дистильованою водою та висушували. Отримані препарати являли собою дрібнодисперсний порошок білого кольору.

В отриманих препаратах визначали вміст полісахаридів і білка. Ступінь чистоти отриманих препаратів характеризували за вмістом полісахариду, який коливався в межах від 82,6 до 97,3 %. Як свідчать наведені дані, при збільшенні концентрації H2O2 спостерігається збільшення ступеня чистоти полісахариду. Проте, використання реагенту більш високої концентрації суттєво збільшує вартість цільового продукту. У зв'язку з цим, згідно з представленими даними, найбільш прийнятними умовами обробки, що забезпечують достатньо високий вихід продукту у поєднанні з його високою чистотою і низькою витратою використовуваного реагенту, є наступні: обробка дріжджів 3 % розчином H_2O_2 при співвідношенні твердої і рідкої фаз 1:2 впродовж 3 годин.

Результати визначення моносахаридного складу отриманих препаратів методом паперової хроматографії свідчать, що досліджувані полісахариди побудовані виключно із залишків глюкози, тобто являють собою глюкани.

Методом ІЧ спектроскопії встановлено ідентичність глюкану, отриманого даним способом і однойменного дріжджового полісахариду, виділеного класичним методом.

На ІЧ спектрі цих зразків присутня смуга поглинання при 890 $см^{-1}$, яка характерна для β-конфігурації глікозидних зв'язків. Смуги поглинання притаманні карбонільним і карбоксильним групам, наявність яких можна було б очікувати у досліджуваному зразку, відсутні. Додатковим свідченням, що підтверджує відсутність цих груп у досліджуваному полісахариді, були негативні результати їх визначення хімічними методами.

Висновки. Розроблено новий спосіб отримання β-глюкану з клітинних оболонок хлібопекарських дріжджів роду Saccharomyces cerevisiae, який відрізняється простотою виконання і дозволяє одержувати цільовий продукт з високим виходом і вмістом полісахариду.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЖИТОМИРСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
ВІННИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИХАЙЛА КОЦЮБИНСЬКОГО
ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ «КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
ПОЛТАВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Г. КОРОЛЕНКА
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

IV ВСЕУКРАЇНСЬКА ІНТЕРНЕТ-КОНФЕРЕНЦІЯ МОЛОДИХ ВЧЕНИХ

«Перспективи хімії в сучасному світі»

ЗБІРНИК МАТЕРІАЛІВ КОНФЕРЕНЦІЇ

20 листопада 2024 року, м. Житомир

Житомир 2024

НАПІВПРОВІДНИКІВ ШЛЯХОМ РЕГУЛЮВАННЯ ГІДРОДИНАМІЧНИХ УМОВ	
Олексюк О. Ю., Камінський О. М., Денисюк Р. О., Чайка М. В., Писаренко С. В., Євдоченко О. С., Свиридюк К.П., Панасюк Д. Ю. АДСОРБЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ МАГНІТОЧУТЛИВИХ НАНОШПІНЕЛЕЙ	118
Панченко Т. В., Камінський О. М., Євдоченко О. С., Денисюк Р. О., Чайка М. В., Писаренко С. В., Панасюк Д. Ю. АДСОРБЦІЙНА АКТИВНІСТЬ НІКЕЛЕВОГО НАНОФЕРИТУ, МОДИФІКОВАНОГО ГІДРОКСИАПАТИТОМ	120
Прокопенко В. С., Камінський О. М., Денисюк Р. О., Тітов Ю. О., Писаренко С. В., Панасюк Д. Ю. ДОСЛІДЖЕННЯ ПИТОМОЇ ПЛОЩІ ПОВЕРХНІ ІТРІЄВИХ ГРАНАТІВ ЕКСИКАТОРНИМ МЕТОДОМ	122
Севрук Є. С., Камінський О. М., Тітов Ю. О., Євдоченко О. С., Денисюк Р. О., Чайка М. В., Писаренко С. В., Панасюк Д. Ю. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОМАТЕРІАЛІВ	124
Свиридюк А. В., Камінський О. М., Чумак В. В., Чайка М. В., Писаренко С. В., Панасюк Д. Ю. ДОСЛІДЖЕННЯ МОДИФІКОВАНИХ ФЕРИТІВ МЕТОДАМИ ІЧ-ФУР'Є СПЕКТРОСКОПІЇ	126
Хімчик О. С., Камінський О. М., Тітов Ю. О., Євдоченко О. С., Денисюк Р. О., Чайка М. В., Писаренко С. В., Панасюк Д. Ю. «ЗЕЛЕНИЙ» СИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК КУПРУМ ФЕРИТУ	128
Ходюк О. В., Тітов Ю. О., Денисюк Р. О., Писаренко С. В., Камінський О. М. ПРОЦЕСИ ВИЛУГОВУВАННЯ ТИТАНУ(IV) З ІЛЬМЕНІТУ РІЗНИМ ЗА СКЛАДОМ ЛУЖНИМ ВИЛУГОВУВАЧЕМ	130
<u>СЕКЦІЯ 5: ПРИКЛАДНІ АСПЕКТИ ХІМІЇ (ФАРМАЦЕВТИЧНА, КОСМЕТИЧНА, ХАРЧОВА, КРИМІНАЛІСТИЧНА, КОМП'ЮТЕРНА, МЕДИЧНА ХІМІЇ, АГРОХІМІЯ)</u>	**132**
Naumenko K., Snigur D. PREPARATION AND CHARACTERISATION OF BETA-GLUCAN FROM YEAST CELL WALLS	133
Lukaniuk L., Mykytyn I., Prokipchuk I. DETERMINATION OF THE PZC OF ENTEROSORBENTS	134
Бідовська К. В., Авдєєва О. Ю. ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА КОСМЕТИЧНІ ЗАСОБИ ПІНОМИЙНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ	136
Вигівська К. Р., Авдєєва О. Ю. ВИКОРИСТАННЯ ІННОВАЦІЙНИХ МЕТОДІВ У ВИГОТОВЛЕННІ КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБІВ	137
Галатонов В. І., Рацук М. Є. РОЗРОБКА РЕЦЕПТУРИ БАЛЬЗАМУ ДЛЯ ГУБ ІЗ СОНЦЕЗАХИСНИМ ЕФЕКТОМ	139
Галушко Ю. М., Чайка М. В., Камінський О. М., Денисюк Р. О., Томашик В. М. ВПЛИВ БАГАТОАТОМНИХ ОРГАНІЧНИХ СПИРТІВ НА ЗАКОНОМІРНОСТІ ХІМІЧНОГО РОЗЧИНЕННЯ МОНОКРИСТАЛІВ CdTe ТА ТВЕРДИХ РОЗЧИНІВ НА ЙОГО ОСНОВІ У БРОМВИДІЛЯЮЧИХ ТРАВНИКАХ	140
Давидчук Р. В., Авдєєва О. Ю. ОСОБЛИВОСТІ РЕЦЕПТУР ШАМПУНІВ ДЛЯ ДІТЕЙ	142
Єременко І. О., Авдєєва О. Ю. ВИКОРИСТАННЯ ТИТАН ДІОКСИДУ В КОСМЕТИЧНІЙ ГАЛУЗІ	144
Забродський І. О., Авдєєва О. Ю. ВИКОРИСТАННЯ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ В КОСМЕТОЛОГІЇ	145
Зав'язун С. А., Авдєєва О. Ю. ОСОБЛИВОСТІ ТЕХНІКИ СКЛАДАННЯ ПАРФУМЕРНИХ КОМПОЗИЦІЙ	148
Зозуля В. П., Авдєєва О. Ю. НАНОТЕХНОЛОГІЇ В КОСМЕТИЧНІЙ ГАЛУЗІ	150
Костенко Н. С., Авдєєва О. Ю. АЛЕРГЕНИ В КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБАХ	152
Крупська А. М., Большаніна С. Б. ДОСЛІДЖЕННЯ КАТІОННОЇ ЄМНОСТІ ҐРУНТІВ У ВОРОНКАХ ВІД СНАРЯДІВ	153

PREPARATION AND CHARACTERISATION OF BETA-GLUCAN FROM YEAST CELL WALLS

Naumenko Krystyna,
Student of the 2nd year of Master's programme, shapkinak@gmail.com
Odesa I. I. Mechnikov National University, Ukraine

Snigur Denys,
Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor of the Department of Analytical and Toxicological Chemistry, snigur@onu.edu.ua
Odesa I. I. Mechnikov National University, Ukraine

Beta-glucans are polysaccharides present in the cell walls of various cereal crops (oats, barley), algae, microorganisms and fungi. In recent years they have attracted much attention as immunomodulators, substances with cancer and radio-protective properties. Beta-glucans from different sources have some differences in their structure. For example, grain β-glucans have a linear macromolecule structure, which includes blocks of β-(1→4)-linked D-glucopyranose residues separated by β-(1→3)-links. The block fragments are either tri- or tetramers, the ratio of which varies. Beta-glucans of yeasts and fungi, unlike grain glucans, have a branched structure. The main chain of their macromolecules consists of β-D-glucopyranose residues connected by (1→3) glycosidic bonds. Side branches, the frequency and size of which are variable, are connected to it at positions O-6 [1].

The biological effect of β-glucans is determined by many factors: the type and configuration of bonds between monosaccharide residues, branching and conformation of the macromolecule, the degree of its polymerization; water solubility, etc. [3]. The β-(1→3), (1→6)-D-glucan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was found to exhibit the highest physiological activity compared to other glucans [4]. Yeast β-glucan is located in the inner layer of the cell wall [5] where it is combined with protein, manan and chitin. These components are linked by covalent bonds which complicates the technology of cell wall glucan production.

There are different approaches to the isolation of β-glucan from the cell wall of baker's yeast. They are mainly based on the destruction of the cell membrane by physical treatment (ultrasound treatment, freezing, etc.) followed by treatment with alkali or enzymes to remove associated substances. There are data on the production of cell wall glucan by direct treatment of yeast biomass with enzyme preparations which contribute to the destruction of its associated compounds. A method of β-glucan production has been described that involves sequential treatment of yeast with solutions of sodium hydroxide, acetic acid, and sodium acetate followed by autoclaving to remove protein, glycogen, and mannan. However, these methods are labour and energy intensive.

The above determines the relevance of this work, devoted to the development of a simplified method for the production of yeast β-glucan.

The essence of the developed method consists in the use of yeast treatment with hydrogen peroxide to disintegrate cell membranes and subsequent removal of compounds associated with glucan through their stepwise extraction from disintegrated yeast biomass. In the cell membrane disintegration experiments, 3%, 15% and 24% H_2O_2 solutions were used, varying the duration of treatment and the mass ratio of yeast to hydrogen peroxide solution. The disintegrated yeast mass was washed with distilled water and centrifuged. To remove protein and mannan, the solid residue was treated with 3 % NaOH solution for 30 minutes at 18…22 °C and then with 6 % NaOH solution for 60 minutes at 50…60°C. The mixture was centrifuged, the solid phase was suspended in distilled water and 0.1 n HCl solution was added to pH 5.0. The supernatant was separated by centrifugation, the residue was suspended in 0.5 n acetic acid solution and heated to 75°C to remove glycogen, then washed several times with distilled water and dried.

The content of carbohydrate component in the obtained products varied in the range of 82.6 - 97.3 %, protein 0 - 14.5 %, glycogen was absent. The yield of the products was 8.1 - 19.7 %.

It was found that the conditions of yeast treatment with hydrogen peroxide providing high yield of the product in combination with low content of protein in it, are the following: concentration of H_2O_2 in the solution of 3 %, the ratio of yeast - hydrogen peroxide solution 1:2, duration of treatment 180 minutes. Under these conditions the yield of the target product is 14.7 %, its β-glucan content is 89.7 %, protein content is 8.3 %.

Thus, the method of β-glucan isolation using hydrogen peroxide has advantages over the existing methods of its preparation: it allows obtaining a product with higher yield without the use of labour- and energy-intensive operations.

1. Syed H.A. The world of β-glucans – a review of biological roles, applications and potential areas of research. *Thesis for the requirement of master of Science – Medical Biology*. 2009. P. 13-18.
2. Petravić-Tominac V., Zechner-Krpan V., Grba S., Srečec S., Panjkota-Krbavčić I., Vidović L. Biological effects of yeast β-glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2010. V. 75. P. 149–158.
3. Korolenko T.A., Bgatova N.P., Vetvicka V. Glucan and Mannan – Two Peas in a Pod. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, V. 20. P. 3189
4. Rodrigues M.V., Zanuzzo F.S., Koch J.F.A., de Oliveira C.A.F., Sima P., Vetvicka V. Development of Fish Immunity and the Role of β-Glucan in Immune Responses. *Molecules*. 2020. V. 25(22). 5378
5. Chen J., Seviour R. Medicinal importance of fungal β-(1→3), (1→6)-glucans. *Mycological research.* 2007. V. 111. P. 635–652.

DETERMINATION OF THE PZC OF ENTEROSORBENTS

Liubomyr Lukaniuk
M.Sc. student of the Chemistry Department, liubomyr.lukaniuk.22@pnu.edu.ua
Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ukraine

Ihor Mykytyn
Ph.D., Associate Professor of the Chemistry Department, ihor.mykytyn@pnu.edu.ua
Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ukraine

Iryna Prokipchuk
Leading specialist of the Chemistry Department, iryna.prokipchuk@pnu.edu.ua
Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ukraine

Enterosorbents are a widely used class of medicines in Ukraine, known for their sorption and detoxification properties. A diverse range of products on the domestic pharmaceutical market and affordable prices have contributed to popularity of enterosorbents among doctors and patients. In this study, we compared four medicines comprising enterosorbents widely available on Ukrainian pharmaceutical market: common activated carbon, Sorbex Ultra (active ingredient: highly dispersed activated carbon), Neo Sorb Active (active ingredient: silicon dioxide), Atoksil (active ingredient: highly dispersed silicon dioxide) and commercial materials, specifically activated carbon and silicon dioxide.

The point of zero charge (PZC) characterizes the surface charge of the sorbent [1]. Specifically, the surface charge is negative when the pH is greater than the pH_{PZC} and positive when the pH is lower than the pH_{PZC}. In essence, the pH_{PZC} represents the equilibrium point where the surface charge of the adsorbent is rendered neutral.

A series of experiments was conducted to determine the surface charge of the sorbent. The

Житомирський державний університет імені Івана Франка
1919

Університет зі столітньою історією та тисячолітніми традиціями

Сертифікат

свідчить про те, що

Naumenko Krystyna

брав(ла) участь у роботі
IV Всеукраїнської інтернет-конференції молодих вчених
«Перспективи хімії в сучасному світі»

20 листопада 2024 року
м. Житомир

Проректор **Володимир ЧУМАК**

Сертифікат від 20.11.2024

Підписав: Володимир Чумак
Серійний номер: 3FAA9288358EC
003040000008B522500EDDFBA00