



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1659053 A1

(51)5 A 61 K 35/76

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

2

(21) 4405765/13

(22) 07.04.88

(46) 30.06.91 Бюл. № 24

(71) Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного

(72) А. Г. Коваленко, А. Д. Бобырь, Т. Д. Граб-
на и А. А. Баркалова

(53) 577.15.072.632.981(088.8)

(56) Авторское свидетельство СССР
№ 687120, кл. С 12 Р 1/02, 1979.

Авторское свидетельство СССР
№ 302368, кл. С 12 Р 1/02, 1971

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИВИРУС-
НОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Изобретение относится к технологии
получения биологически активных препара-
тов для растениеводства и животноводства.

Цель изобретения – упрощение техно-
логического процесса получения антивирус-
ного препарата из дрожжей и повышение
выхода биомассы продукта

Цель достигается тем, что вместо рибо-
нуклеазы и фенола для очистки препарата
используют органическую кислоту пред-
почтительно уксусную, выполняющую одно-
временно и функцию активного
экстрагента. Кислота применяется в кон-
центрации 5–8%, не снижающей актив-
ности получаемого препарата, но
обеспечивающей его высокий выход и хоро-
шую очистку от примесей. По предлагаемо-
му способу в качестве исходного сырья
можно использовать не только дрожжевую
биомассу, выращенную в лабораторных ус-

(57) Изобретение относится к технологии
получения биологически активных препа-
ратов. Цель изобретения – упрощение тех-
нологического процесса получения
антивирусного препарата из дрожжей и по-
вышение выхода биомассы продукта. Для
этого отделенные от культуральной жидко-
сти и высушенные клетки гомогенизируют,
растворимые вещества из гомогената экс-
трагируют 5–6%-ной уксусной кислотой,
центрифугируют и осадок отбрасывают.
Экстракт упаривают в вакууме при 50°C и
охлаждают, целевой продукт из concentra-
та осаждают двумя объемами этанола, цен-
трифугируют, осадок растворяют в воде и
высушивают сублимацией. 9 табл.

ловиях, но и промышленные кормовые
дрожжи.

Отделенные от культуральной жидкости
и высушенные клетки гомогенизируют, рас-
творимые вещества из гомогената экс-
трагируют 5–6%-ной уксусной кислотой,
центрифугируют и осадок отбрасывают.
Экстракт упаривают в вакууме при 50°C и
охлаждают, целевой продукт из concentra-
та осаждают двумя объемами этанола, цен-
трифугируют, осадок растворяют в теплой
воде и высушивают сублимацией.

Выделенные данным способом препа-
раты состоят преимущественно из полиса-
харидов, хорошо растворимы в воде и
обладают высокой антивирусной активнос-
тью.

Пример 1. Дрожжи *Candida tropicalis*
K-41 выращивают в ферментерах на аэиро-
ванной жидкой среде следующего состава:
(NH₄)₂SO₄ 3 г/л, NaCl 0,3 г/л; MgSO₄ 0,4 г/л;

(19) SU (11) 1659053 A1

KH_2PO_4 1 г/л; K_2HPO_4 0,1 г/л; глюкоза 25 г/л; биотин 2 мкг/л.

Биомассу отделяют от культуральной жидкости центрифугированием (3000 об/мин, 15 мин), высушивают в сублимационной сушке (30°C, давление — 10^3 н/м²) и используют по мере получения антивирусного препарата. Дрожжевые клетки гомогенизируют с помощью шаровой мельницы, растворимые вещества экстрагируют 6%-ной уксусной кислотой (2 ч при +2°C), осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость доводят до нейтрального значения pH добавлением 5 н NaOH и концентрируют 1,5 упариванием (50°C) в вакууме. К охлажденному концентрату добавляют 2 объема 96%-ного этанола и осаждают целевой продукт при +2°C. Осадок собирают центрифугированием и растворяют в теплой (50°C) дистиллированной воде. Раствор центрифугируют, осадок отбрасывают, а препарат сушат в сублимационной сушке.

Выход очищенного препарата составляет 5,7% сухого веса дрожжей. Препарат имеет вид аморфного белого порошка, хорошо растворим в воде, термостабилен, не гигроскопичен и может длительно храниться в сухом месте без изменения порошкообразной консистенции и высокой антивирусной активности. В его составе более 80% углеводов, примесь белков составляет не более 3%, нуклеиновых кислот — следы.

Пример 2. В качестве исходного материала используют сухие кормовые дрожжи промышленного изготовления. Экстракцию и очистку антивирусного начала проводят по той же схеме, что и в примере 1. Для этого применяют уксусную кислоту в 5%-ной концентрации. Выход препарата несколько ниже (4,9%), однако антивирусная активность его выше, чем при экстракции 6%-ной кислотой. Препарат представляет собой аморфный порошок слабоборичневого цвета, хорошо растворим в воде, термостабилен, не гигроскопичен и может долго храниться в сухом месте без потери физических характеристик и антивирусной активности. Состоит преимущественно из полисахаридов, примеси белков не превышают 5%, нуклеиновых кислот — 0,4%.

Пример 3. Исходное сырье — промышленные кормовые дрожжи. Для экстракции и очистки антивирусного препарата используют уксусную кислоту в оптимальной концентрации (5,5%). Выход препарата достаточно высок — 5,2%, его антивирусная активность выше, чем при экстракции веществ 6%-ной уксусной кислотой.

В табл. 1 приводятся сведения о составе и активности препаратов, полученных из различных источников, в отношении вируса табачной мозаики на дурмане.

Пример 4. Сухие дрожжевые клетки (40 г) обрабатывают 6%-ной уксусной кислотой по предлагаемому способу или водой (по прототипу). Растворимые вещества отделяют центрифугированием и в полученных экстрактах определяют содержание углеводов (0,2%-ным антроном в концентрированной H_2SO_4) и белков (по микрометоду Бредфорда), а также антивирусную активность экстрактов (против ВТМ на листьях дурмана). Данные этого опыта приводятся в табл. 2, 3, 4.

Целевой продукт, экстрагированный 6% ной уксусной кислотой, по антивирусной активности существенно не отличается от продукта, полученного согласно способу-прототипу. Тем не менее содержание углеводов, являющихся действующим началом препарата, в этом препарате в 1,5 раза выше, чем в препарате, экстрагированном водой. В то же время большую долю (31%) последнего составляют белки, содержание которых в целевом продукте, экстрагированном 6%-ной уксусной кислотой, не превышает 2%.

Пример 5. 250 мг дрожжевых клеток *Candida tropicalis* K-41- высушенных лиофильно, гомогенизируют и целевой продукт из них экстрагируют 3%-, 5%-, 6%-, 8%-, 10%- или 15%-ной уксусной кислотой. Далее экстракт концентрируют упариванием в вакууме, осаждают спиртом. Определяют суммарное содержание белков и полисахаридов в препаратах и их способность ингибировать инфекционность ВТМ на листьях дурмана.

Данные этого опыта, приведенные в табл. 5, показывают, что по мере увеличения концентрации уксусной кислоты с 3 до 10% выход полисахаридов повышается, а выход белков, наоборот, снижается (с 3,4 до 1,4%). Дальнейшее увеличение концентрации кислоты (до 15%) сопровождается снижением выхода полисахаридов. Антивирусной активностью обладают все препараты. Однако наиболее высокую активность отмечают у препаратов, экстрагированных 5-6%-ной уксусной кислотой. Препараты, выделенные при более высокой концентрации кислоты (8-15%) в сравнимо низких (1 мкг/мл) концентрациях, не обладают активностью либо эта активность непостоянна. Намного меньшей оказалась и активность препарата, экс-

трагированного 3%-ной уксусной кислотой, вероятно, из-за присутствия примесей, снижающих активность ингибиторов, либо стимулирующих инфекционность вируса.

При испытании действия различных концентраций уксусной кислоты в качестве экстрагента целевого продукта в данном опыте нейтрализация ее щелочью сознательно не проводилась. Это дало возможность определить, насколько высокие концентрации водородных ионов могут отрицательно повлиять на активность антивирусного начала. Измерения показывают, что заданные определенной концентрацией кислоты значения pH существенно не повышаются в процессе концентрирования экстракта в вакууме благодаря испарению кислоты. Так, при концентрации кислоты 5-6% значение pH экстракта после концентрирования продукта в вакууме не выходит за пределы 1-2, при этом антивирусная активность целевого продукта (по сравнению с более низкой концентрацией экстрагента - 3%) не уменьшалась.

Таким образом, оптимальная концентрация уксусной кислоты, обеспечивающая достаточно высокий выход препарата, отсутствие в нем существенных примесей сопутствующих белков и хорошую сохранность антивирусной активности целевого продукта, находится в пределах 5-6%.

Пример 6. В опыте используют сухие клетки дрожжей *Candida tropicalis* K-41.

Получение антивирусного препарата по предлагаемому способу.

40 г дрожжевых клеток гомогенизируют и целевой продукт экстрагируют 400 мл 6%-ной уксусной кислоты (2 ч при температуре +20°C), экстракт отделяют от гомогената клеток центрифугированием и упаривают до 100 мл в вакууме. Целевой продукт из концентрата осаждают двумя объемами спирта, осадок растворяют в воде и лиофилизируют. На всех стадиях получения препарата определяют содержание углеводов, белков в экстрактах и антивирусную активность экстрагируемых веществ.

Получение антивирусного препарата по способу-прототипу.

40 г дрожжевых клеток гомогенизируют, целевой продукт экстрагируют 400 мл воды (2 ч при температуре +20°C), экстракт от гомогената клеток отделяют центрифугированием, а затем обрабатывают его РНКазой в концентрации 20 мкг/мл (2 ч, +25°C в 0,001 M NaCl). Экстракт концентрируют в вакууме до 100 мл, а затем эмульгируют в смеси фенола и хлороформа (9:1) в течение 30 мин при комнатной температуре, водную фазу с целевым продуктом отделя-

ют центрифугированием и подвергают диализу (24 ч) против воды. Целевой продукт из диализата осаждают 5 объемами этилового спирта, осадок растворяют в воде и лиофилизируют. На всех стадиях получения препарата определяют содержание белков и углеводов в экстрактах и антивирусную активность экстрагируемых веществ.

Данные сравнительной оценки предлагаемого способа и его прототипа приводятся в табл.6. Выход препарата, полученного по предлагаемому способу, в условиях этого опыта достигает 2,5%. В то время как, используя способ - прототип, удается получить лишь около 0,7% препарата от веса исходного сырья.

Пример 7. Листья дурмана обрабатывают препаратом (1 мг/мл) за 48 ч до или сразу после заражения X-вирусом картофеля (ХВК) путем погружения их в раствор испытуемого препарата. Контрольные листья аналогичным образом обрабатывают водой. Инфекционный титр вируса определяют через 5 дней посредством инокуляции экстрактами из листьев дурмана растений *Gomphrena globosa* и подсчетом образовавшихся в опыте и контроле местных вирусных поражений.

Данные, приведенные в табл.7, свидетельствуют о существенном профилактическом эффекте в откошении ХВК. Отмечено снижение титра вируса (на 31%) под влиянием препарата.

В системе табак - вирус бронзовости томатов (ВБТ) полученный антивирусный препарат (АВП) применяют путем трехкратного опрыскивания растений до (профилактика) или после (терапия) инокуляции их инфекционным соком с интервалом 2-3 дня между смежными обработками. Учитывают количество местных некрозов на инокулированных листьях а также число системно пораженных растений, отмечают одновременно характер и степень проявления внешних симптомов заболевания.

Данные этого опыта приведены в таблицах 8 и 9.

Как следует из приведенных результатов, полученный АВП обладает высоким профилактическим и существенным терапевтическим (снижение гибели растений на 50% при 100%-ной гибели их в контроле) действием в отношении болезни табака, вызываемой ВБТ.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения антивирусного препарата из дрожжей, включающий культивирование клеток их отделение от культуральной жидкости, экстракцию очи-

стку, и концентрирование экстракта в вакууме с последующим осаждением целевого продукта и его сублимационным высушиванием, отличающийся тем, что, с целью

упрощения технологического процесса и повышения выхода биомассы продукта, экстракцию и очистку проводят уксусной кислотой в концентрации 5-6%

5

Таблица 1.

Выход, состав и антивирусная активность препаратов, выделенных из дрожжей

Исходный материал	В ы х о д препара- та, %	Состав препарата, %			Концент- рация пре- парата, мкг/мл	Ингибиро- вание ин- фекцион- ности виру- са табач- ной мозаи- ки на лис- тях дур- мана, %
		углеводы	белки	РНК		
Клетки дрожжей <i>Candida tropicalis</i> К-41, выращенные в лабораторных условиях	5,7	82,5	3,0	следы	1000	100
					100	97
					10	76
					1	53
Кормовые дрожжи, полученные в производственных условиях	4,9	35,0	5,0	0,4	1000	100
					100	91
					10	76
					1	71

Таблица 2

Характеристика целевого продукта, экстрагированного из 40 г сухих дрожжей различными способами

Экстракция	Содержание биополимеров в экстрактах, мг			% белков от суммы биополимеров	Антивирусная активность	
	белков	углеводов	сумма		используе- мая концент- рация, мкг/мл	ингибирование ВТМ на листьях дур- мана, %
6 %-ной ук- сусной кис- лоты	21,4	1120	1141,4	1,9	75	93 ± 6
					15	80 ± 8
					3	41 ± 7
Водой (по прототипу)	378	840	1218	31,0	75	98 ± 5
					15	90 ± 4
					3	33 ± 12

П р и м е ч а н и е Концентрация рассчитывалась по содержанию углеводов в препарате

Таблица 3

Моносахаридный состав антивирусных препаратов, полученных с помощью известного и предлагаемого способа

Способ	Содержание моносахарида, %			
	манноза	глюкоза	галактоза	рамноза
Предлагаемый	96,4	2,3	0,7	2,6
Прототип	97,0	2,2	0,8	следы

Примечание. Содержание моносахаридов в препаратах определяют с помощью газо-жидкостной хроматографии. Препараты для ГЖХ получают путем гидролиза антивирусного препарата в 2 н серной кислоте (2 ч, 100°C).

Таблица 4

Действие гидролаз на антивирусную активность антивирусного препарата, выделенного из дрожжей с помощью заявленного способа

Ферментная обработка	Инфекционность ВТМ (некрозов на 1 лист дурмана)		Ингибирование вируса, %
	в опыте	в контроле	
Интakтный препарат (контроль)	0,8	78	99 ± 3
Препарат обработан			
ДНКазой	1,2	81	98 ± 5
РНКазой	1,4	92	98 ± 4
трипсином	0,9	72	99 ± 2
глюканазой	21	88	76 ± 9
маннаназой	32	84	65 ± 11
смесью маннаназа + глюканаза	86	85	0

Таблица 5

Выход и антивирусная активность целевого продукта, экстрагированного из дрожжевых клеток уксусной кислотой различной концентрации

Концентрация кислоты, %	Содержание биополимеров в препарате, мкг			% содержания белков	Испытуемая концентрация, мкг/мл	Снижение инфекционности ВТМ, %
	белков	полисахаридов	сумма			
3	160	4550	4710	3,4	1	1,41 ± 0,54*
					10	22 ± 30
					100	80 ± 7
5	154	5000	5154	3,1	1	38 ± 4
					10	70 ± 10
					100	75 ± 6
6	128	5300	5428	2,4	1	40 ± 18
					10	70 ± 11
					100	89 ± 7
8	118	6850	6968	1,7	1	12 ± 23
					10	78 ± 16
					100	93 ± 16
10	112	8050	8162	1,4	1	40 ± 13
					10	49 ± 8
					100	53 ± 21

Т а б л и ц а 7

Действие антивирусного препарата (АВП) из дрожжей на накопление X-вируса картофеля в изолированных половинках листьев дурмана

Время инкубации половинок листьев	Инфекционность экстрактов из листьев через 5 дней после заражения (некрозов) лист		
	Вода	АВП, 1 мг/мл	Ингибирование, %
48 ч до инокуляции	35	24	31,4 ⁺⁺⁺
48 ч после инокуляции	39	40	+1,0 ^o

+++ $r < 0,1\%$; $^o P > 5\%$.

Т а б л и ц а 8

Профилактическое действие антивирусного препарата из дрожжей на поражаемость табака сорта Иммунный 580 ВБТ*

Вариант	Количество местных поражений/лист	Количество растений с системными симптомами болезни, %
Вода (контроль)	11,0 ± 1,4	100
АВП, 0,02%	1,7 ± 0,03	0

* трехкратное опрыскивание растений с интервалом 3 дня до инокуляции растений ВБТ.

Т а б л и ц а 9

Терапевтическое антивирусное действие антивирусного препарата из дрожжей в системе табак сорта Иммунный 580 - ВБТ*

Вариант	Количество растений, %								
	10 дней п.и.			30 дней п.и.			50 дней п.и.		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Вода (контроль)	100	0	0	0	0	100	0	0	100
АВП, 0,02%	37,5	62,5	0	37,5	62,5	0	12,5	37,5	50,0

* трехкратное опрыскивание с интервалом 2 дня, начатое сразу после заражения растений ВБТ: 1 - с суровыми симптомами; 2 - с мягкими симптомами; 3 - погибшие.

Редактор В.Ковтун Составитель С.Пылова
Техред М.Моргентал Корректор Т.Колб

Заказ 1799 Тираж 464 Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101

