

Белих І.А., к.біол.н., доцент, Самойленко С.І., к.техн.н., доцент, Близнюк О.М., д.техн.н., професор, Масалітіна Н.Ю., к.техн.н., доцент, Белінська А.П., к.техн.н., доцент, Варанкіна О.О., к.техн.н., доцент, Чечуй О.Ф., к.біол.н., доцент, Звягінцева О.В. к.біол.н., доцент

## ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В БІОТЕХНОЛОГІЇ ДРІЖДЖІВ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ

Національний технічний університет "Харківський політехнічний інститут", Харків

**Ключові слова:** бродіння, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, життєздатність клітин, нефелометрія, проліферативна активність, технологічний процес, ферментаційний процес, чиста культура мікроорганізмів.

### Вступ

Органолептичні та фізико-хімічні показники таких продуктів, як вино, спирт, пиво, квас, хлібопекарські дріжджі, а також ефективність технологічних операцій визначаються не тільки якістю вихідної сировини, а також інтенсивністю обмінних процесів дріжджової культури. Фізіолого-біохімічний стан дріжджів та здатність їх адаптації до умов конкретного середовища суттєво впливають на швидкість та глибину споживання сухих речовин середовища, мікробіологічну та колоїдну стабільність продукту, утворення як основних продуктів спиртового бродіння, так і вторинних та побічних компонентів, формують ароматичний та смаковий профіль готового напою [1].

Проліферативні процеси, що протікають у дріжджовій клітині, досить легко піддаються регуляції. Тому, знаючи залежність між конкретними умовами навколишнього середовища та тими чи іншими сторонами життєдіяльності дріжджової культури, можна цілеспрямовано змінювати її зростання, розвиток та обмін речовин. Створення та підтримання певних умов культивування дріжджів дозволяє керувати ходом ферментаційного процесу [1].

У процесі виробництва, залежно від прийнятої технології розведення чистої культури, здійснення бродіння сусла, знімання, зберігання та підготовки до наступного циклу ферментації дріжджі піддаються різним видам несприятливих впливів. Виділяють стресові фактори, що визначаються складом середовища (концентрацією сухих речовин, вмістом кисню, спирту, вуглекислоти, дефіцитом поживних компонентів, наявністю токсичних речовин) [2, 3] та умовами проведення вище перелічених процесів (температурним режимом, осмотичним та гідростатичним тиском, електромагнітним випромінюванням) [2, 3, 4].

Кожен із розглянутих факторів може впливати самостійно, але найчастіше в сукупності з іншими, що посилює проблеми, які існують на підприємстві, пов'язані з життєвою активністю дріжджів. Усі ці фактори вимагають від технологів застосовувати різні способи активації дріжджів для нормального протікання технологічного процесу та отримання готового продукту з відповідними стандарту органолептичними та фізико-хімічними показниками [5].

Для активзації життєдіяльності росту та розвитку дріжджової культури, використовують різні способи і прийоми.

### Дослідження існуючих рішень проблеми

У біотехнологічній промисловості виділяють три основні шляхи зміни проліферативних та технологічних властивостей дріжджів: фізичний [4, 5, 6], хімічний [7, 8, 9, 10] та комбінацію фізичних і хімічних факторів [5, 11].

Перша група способів підвищення життєвої активності дріжджів включає види фізичної обробки як одиничними факторами: температурою, випромінюванням (оптичним, ультрафіолетовим, ультразвуковим), електромагнітним полем, електричним струмом (постійним або змінним), гідро- або аероіонізацією, так і комплексним їх впливом: молекулярним киснем та магнітним полем); негативно зарядженими частинками (включаючи кисень в іонній формі) та струмом постійної частоти. Також до фізичних методів активації життєдіяльності дріжджів, крім ряду вищенаведених, віднесено лазерну та механічну обробку [6].

До другої групи включають використання ферментів, антимікробних препаратів, мінеральних речовин (цинку, заліза, міді, селену) [7, 8, 9], вітамінів, спеціальних підживлень для дріжджів, мінеральних добавок (діоксиду кремнію, солей амонію, марганцю, калію, магнію, фосфору, цинку, селену) [7, 8, 9], органічних (кисню, гідролізатів, автолізатів мікробної клітинної біомаси, органічних кислот, різних видів рослинної сировини, продуктів та відходів переробки молока), мінерально-органічних комплексів солей (поєднання неорганічних солей, амінокислот, вітамінів та біомаси мікроорганізмів, суміш інактивованих дріжджів із природними мінералами) [7, 8, 9]. В літературі описано використання цитратів металів як біологічно активних стимуляторів для дріжджових клітин, що дозволяє інтенсифікувати процес зброджування сусла [10].

Доведено доцільність використання для стимуляції проліферативної активності дріжджів та активізації процесу ферментації на прикладі пивного сусла, факторів росту (вітамінів) [1] та активаторів бродіння – екзогенних речовин [10, 11, 12].

Крім цього, виділяють третю групу способів, що є комбінацією в різних поєднаннях фізичних та хімічних [5, 11].

Незважаючи на те, що фізичні методи активації проліферативної активності клітин не передбачають використання хімічних речовин, і це є їх перевагою, вони не знайшли широкого застосування у промисловості, тому що вимагають спеціальної, апаратури, їх складно застосувати щодо великих обсягів виробництва.

Одним із способів, зміни фізіолого-біохімічних та технологічних властивостей дріжджів у практиці пивоварної, спиртової, виноробної, дріжджової промисловості є застосування комерційних препаратів для підживлення субстратів.

Нами був проаналізований міжнародний ринок препаратів, які випускаються для підживлення дріжджів [12]. У табл. 1 наведено склад цих препаратів. Аналізуючи рецептуру препаратів, необхідно звернути увагу на те, що у складі багатьох із них присутні мінеральні речовини у вигляді солей та синтетичні вітаміни.

Поряд з препаратами для підживлення, що випускаються в промислових масштабах, пропонується використання інших, значно дешевших, стимуляторів і активаторів метаболізму дріжджів, і тим самим, прискорення технологічних процесів і підвищення якості готового продукту. Джерелом ростових речовин та біостимуляторів для дріжджів є в більшості випадків сировина рослинного та тваринного походження [1, 10–16]. Як допоміжні речовини, часто використовують відходи або продукти їх переробки різних галузей промисловості: солодової (витяжка із солодових паростків), пивоварної (надлишкові пивні дріжджі та препарати, що одержують з них – гідролізати, автолізати, плазмолізати, ферментолізати, пивна дробина) [14], крохмале-патокової (картопляна добавка) [15], молочної (сироватка) [16], виноробної (шкірка та насіння винограду),

спиртової (гідролізна барда, післяспиртова барда, залишкові дріжджі), продукти та відходи сільського господарства [17]. Розглянуто вплив екстрактів плодів глоду та шишини на процеси бродіння, також встановлено позитивний вплив екстрактів на технологічні властивості дріжджів [18].

Таблиця 1 – Склад препаратів для підживлення дріжджів [12]

Найменування препарату	Виробник	Склад препарату
Алкотен	Murphy & Son LTD, Великобританія	Суміш амінокислот та вітамінів групи В
Допомога для дріжджів		Екстракт автолізованих дріжджів з цинком та міддю
Іст-Віт		Суміш неорганічних речовин, мікроелементів (цинку, марганцю, калію, магнію, йоду), вітамінів (В1, В2, В6, Н), міоінозиту, похідних вітамінів РР та В5, амінокислот
Істлайф екстра		Суміш пептонів, 13 амінокислот, мінералів та 7 вітамінів
Родію Зумесит		Суміш фосфату діамонію та метабісульфіту калію
Сульфат цинку		98,5 % гепегідрату цинка ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )
Екстра Хідер		Суміш неорганічних солей, вітамінів та мікроелементів у поєднанні з пропіленглікольальбінатом
Істекс	I.E.Siebel Son's Company, США	Суміш фосфату діамонію, сульфатів марганцю та цинку
Іноферм	Институт Энології, Франція	Сульфат амонію та тіамін
Тіамін		Вітамін В1
Фермівіт В		Інактивовані дріжджі, целюлоза та інертні оболонки
Істфілд	S.C. Core SA, Румунія	Суміш неорганічних речовин (фосфату діамонію, метабісульфіту калію, сульфатів марганцю та цинку), амінокислот (аланіну, лейцину, серину), дисперганту
Вітамон® Комбі	Ербсле Гайзенхайм АГ, Німеччина	Фосфат діамонію та тіамін
Вітамон® СЕ		Фосфат діамонію, вітамін В1, клітинні стінки дріжджів, целюлоза
Вітамон Ульт-ра		Суміш автолізату дріжджів, фосфату діамонію та тіаміну
ВітаФерм® Ультра Ф3		Дезактивовані дріжджі (джерело амінокислот, пептидів, маннопротеїнів та інших адсорбуючих полімерів, вітамінів, ненасичених жирних кислот та стеролів), фосфат діамонію, вітамін В1
Хай-Віт	Hydralko Hydrocolloide GmbH, Німеччина	Суміш неорганічних речовин (фосфату діамонію, сульфатів марганцю та цинку), вітамінів групи В, амінокислот (аспарагінової, аспартамової, глутамінової) та пептону

Широке застосування знаходять органічні кислоти [1, 20], особливо, бурштинова кислота, яка є природним метаболітом живих організмів, що підвищує енергетичні та антиоксидантні можливості клітини [21].

Зміна складу поживного середовища може проводитися не тільки збагаченням будь-якими добавками безпосередньо перед проведенням ферментації, але й іншими прийомами, причому на більш ранніх стадіях технологічного процесу: частковою або повною заміною основної вихідної сировини на нетрадиційну для даного виробництва (наприклад, використання топінамбуру) [23], обробкою сировини механічним [4, 6] або біохімічним способами [9, 12].

У виробництвах, де одним із основних видів сировини є вода, її обробка з метою пом'якшення, знезараження, вилучення токсичних елементів, також впливає на хімічний склад суслу і надалі – життєву активність дріжджів. Досліджено ефективність застосування електрохімічно активованої води для регідратації сухих спиртових дріжджів виду *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, що регідратовані в католіті та аноліті дріжджі при подальшому культивуванні мали кращий фізіологічний стан за усіма показниками, зокрема, збільшувалася кількість клітин, які активно розмножувались в експоненціальній фазі [24].

#### Мета та основні задачі дослідження

Метою роботи була розробка складу комплексного вітамінного препарату та оцінка його впливу на проліферативну активність дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

Для вирішення даної мети були поставлені наступні задачі:

- провести постановку експерименту по культивуванню культури дріжджів *S. cerevisiae* та обрати біологічно активні речовини для підвищення проліферативної активності клітин;
- дослідити вплив біологічно активних речовин (комплексний препарат бурштинової та аскорбінової кислот, фолієвої кислот) на проліферативну активність клітин *S. cerevisiae*;
- провести порівняльний аналіз впливу різних концентрацій препаратів бурштинової/аскорбінової та фолієвої кислот на ріст дріжджової культури.

#### Матеріали та методи досліджень

В роботі застосовувались основні загальноприйняті методи досліджень і культивування клітин, що використовуються для біотехнологічної промисловості, а саме: культивування дріжджів; оцінка життєздатності по колонієутворенню на агаризованих середовищах (чашковий метод Коха); нефелометричний метод для визначення проліферативної активності дріжджів [19].

Об'єктом дослідження були дріжджі *S. cerevisiae*, виробництва ПРАТ «Компанія Ензим», торгова марка «Львівські дріжджі», «Дріжджі швидкодійочі» 006 5 24.02.17.

Дріжджі вирощували у лабораторних біореакторах місткістю 1 дм<sup>3</sup> фірми «BIOSTAT® A plus», при температурі 28 °С, протягом 180 хвилин. Відбір проб для аналізу проводили кожні 30 хвилин. Витрата повітря на аерацію становила 0,2 – 0,5 дм<sup>3</sup>/хв., частота обертання мішалки – 20 об./хв.

Підрахунок дріжджів у культуральній рідині проводили за допомогою камери Горяєва [19].

Як поживне середовище використовували 20 % розчин сахарози.

Як біологічно активні речовини, використовували комплексний препарат бурштинової і аскорбінової кислот та фолієвої кислоти.

Комплексний препарат бурштинової (150 мг) та аскорбінової кислоти (20 мг), виробник ТОВ Фармаком, Україна, м. Харків.

Препарат фолієвої кислоти 1 мг. Виробник ПрАТ «Технолог», Україна, м. Умань.

Початкова концентрація дріжджових клітин становила  $5 \cdot 10^6$  КУО/мл.

Зміну кінетики росту клітин дріжджів досліджували оптичними методами за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 [19, 25]. Проліферативну активність культури клітин дріжджів досліджували нефелометричним методом за зміною інтенсивності розсіяного світлового потоку [25].

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням «Statistica V.6.» програмного забезпечення.

### Результати дослідження

Для проведення експерименту з використанням комплексного препарату бурштинової та аскорбінової кислот, готували розведення клітинних культур  $5 \cdot 10^6$  КУО/мл.

В першій серії експериментів досліджували зміну проліферативної активності дріжджів з додаванням різної концентрації комплексного препарату бурштинової та аскорбінової кислот відповідно (0,001/0,00015 мг/мл; 0,0015/0,0002 мг/мл; 0,002/0,00025 мг/мл; 0,0025/0,0003 мг/мл; 0,003/0,0004 мг/мл).

На рис. 1 представлені кінетичні криві росту дріжджів *S. cerevisiae* на середовищі з 20 % складом сахарози та додаванні препарату бурштинової та аскорбінової кислот різних концентрацій. Температура культивування 28 °С, час культивування складав 180 хв.

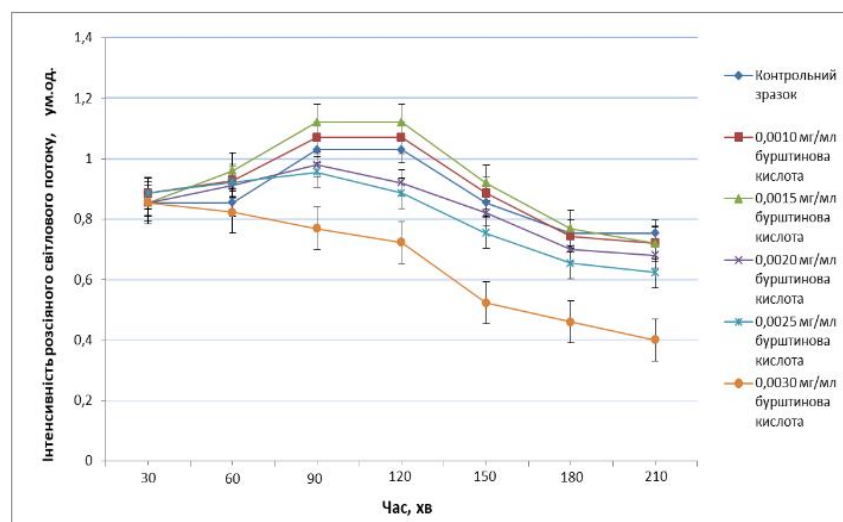


Рисунок 1 – Кінетичні криві росту періодичної культури дріжджів *S. cerevisiae* при додаванні бурштинової кислоти різної концентрації

Кінетичні криві росту, окрім четвертого, п'ятого та шостого зразка, мали S-подібну форму, з добре вираженими лаг-фазою, фазою прискореного росту, експоненціальною фазою, фазою сповільненого росту, стаціонарною фазою та фазою відмирання.

У контрольному зразку дріжджів, без додавання бурштинової кислоти, активація проліферації розпочиналась на 60 хв., процес активного поділу клітин відбувався до 90 хв., далі розпочиналась стаціонарна фаза росту, після чого спостерігалось відмирання клітин [22].

Кінетична крива росту клітин дріжджів другого зразка, в якому концентрація бурштинової та аскорбінової кислот складала 0,0010/0,00015 мг/мл, мала виражену S-подібну форму, що складалася з лаг-фази, фази прискореного росту, фази експоненціального росту, стаціонарної фази та фази відмирання [39]. На відміну від контрольного зразка, у другому зразку поділ клітин розпочався на 30 хв. та продовжувався до 90 хв. культивування культури, далі спостерігалась фаза стаціонарного росту, після 120 хв. розпочалося поступове відмирання клітин. Таким чином, додавання бурштинової кислоти, навіть, в невеликій концентрації активує процес поділу клітин дріжджів [22].

Після додавання 0,0015/0,0002 мг/мл бурштинової/аскорбінової кислот до третього зразка, активація проліферативної активності відбулася на 60 хв. і продовжилася до 90 хв. В цьому зразку була найбільша інтенсивність розсіяного світлового потоку. Це означає, що комплексний препарат бурштинової та аскорбінової кислот в концентрації 0,0015/0,0002 мг/мл мав найбільший вплив на поділ клітин, як видно з графіку. Цей зразок також має S-подібну криву, що складалася з лаг фази, фази прискореного росту експоненціальної фази, фази сповільненого росту, стаціонарної та фази відмирання клітин [22].

Ріст клітин дріжджів відбувався і у третьому зразку при додаванні 0,0020/0,00025 мг/мл бурштинової/аскорбінової кислот. Але на відміну від попереднього зразка та контролю, активність поділу клітин була нижчою. Кінетична крива росту складалася лише з експоненціальної фази та фази відмирання, та не мала лаг-фази та стаціонарної фази [22].

У кривій росту п'ятого зразка (при додаванні 0,0025/0,0003 мг/мл бурштинової/аскорбінової кислот) спостерігалась відсутність лаг фази, одразу розпочався поділ клітин, але, на відміну від четвертого зразка, відмирання клітин розпочалося відразу після досягнення максимального поділу, воно не було різким та мало більш плавний процес.

Додавання 0,0030/0,0004 мг/мл бурштинової кислоти до шостого зразка привело до інгібування росту культури клітин дріжджів. На початку зростання культури ніяких процесів не відбувалось, але вже на 60 хв. культивування розпочався процес відмирання клітин, який тривав до закінчення процесу культивування клітин дріжджів. Запропонована концентрація препарату виявилася зavelикою та призвела до пригнічення проліферативної активності дріжджів.

Активацію проліферації клітин дріжджів бурштиновою кислотою можна пояснити тим, що вона є інтермедіатом циклу Кребса та має вплив на швидкий ресинтез АТФ, що робить її стимулятором вироблення енергії. Бурштинова кислота також підвищує ферментативну активність ферменту фосфофруктокінази, що прискорює зброджування мальтози [1, 22].

Аскорбінова кислота, що входить до складу комплексного препарату, завдяки своїй антиоксидантній активності, допомагає дезактивувати вільні радикали, сприяючи збереженню цілісності клітинних структур і самої клітини [1].

Проаналізувавши результати експерименту можна зробити висновок, що бурштинова кислота сумісно з аскорбіновою в певній кількості є активатором проліферації клітин дріжджів *S. cerevisiae*, що корелюється з результатами, отриманими раніше [22]. Але для того, щоб отримати бажаний результат необхідно використовувати відповідну

концентрацію кислоти. Як видно з рис. 1 активація поділу клітин відбувається при концентраціях бурштинової кислоти 0,0010–0,0015 мг/мл.

Найбільш оптимальна концентрація дріжджів для активації поділу клітин –  $1 \cdot 10^8$  КУО/мл.

В другій серії експериментів досліджували вплив фолієвої кислоти різних концентрацій (0,004 мг/мл; 0,006 мг/мл; 0,008 мг/мл; 0,01 мг/мл; 0,02 мг/мл) на кінетику росту дріжджів.

На рис. 2 представлені кінетичні криві росту дріжджів *S. cerevisiae* у середовищі сахарози при додаванні фолієвої кислоти різних концентрацій. Температура культивування 28 °С, час культивування 180 хв.

Криві росту окрім четвертого, п'ятого та шостого зразків, мали S-подібну форму, з добре вираженими лаг-фазою, фазою прискореного росту, експоненціальною фазою, фазою сповільненого росту, стаціонарною та фазою відмирання.

У контрольному зразку активація проліферації розпочалася на 60 хв., пік активного поділу клітин відбувся на 90 хв., далі слідувала фаза стаціонарного розвитку клітин, після 120 хв. розпочалася фаза відмирання клітин [21].

Кінетична крива росту клітин дріжджів у другому зразку мала S-подібну форму, що складалася з лаг-фази, фази прискореного росту, експоненціальної фази, фази сповільненого росту, стаціонарної фази та відмирання клітин. На відміну від контрольного зразка, поділ клітин розпочався вже на 30 хв. культивування дріжджів. Відмирання клітин розпочалося через 30 хвилин. Таким чином, додавання фолієвої кислоти в концентрації 0,004 мг/мл активує процес проліферації клітин дріжджів *S. cerevisiae* [21].

Третій зразок мав S-подібну криву, що складалася з лаг фази, фази прискореного росту, експоненціальної фази, фази сповільненого росту, стаціонарної та фази відмирання. При додаванні 0,006 мг/мл фолієвої кислоти у третьому зразку активація проліферативної активності відбулася на 30 хв. і продовжилася до 90 хв. далі розпочалася стаціонарна фаза, яка тривала до 120 хв. Саме в цьому зразку спостерігалась найбільша інтенсивність розсіяного світлового потоку, це означає, що фолієва кислота у концентрації 0,006 мг/мл мала найбільший вплив на проліферативну активність клітин [21].

Активація проліферації клітин дріжджів також відбулась у четвертому зразку при додаванні 0,008 мг/мл фолієвої кислоти. Але, на відміну від попередніх зразків активність поділу клітин була нижчою. Крива росту не мала лаг-фази та стаціонарної фази, а складалася лише з експоненціальної фази та фази відмирання [21].

У кінетичній кривій росту п'ятого зразка після додавання 0,01 мг/мл фолієвої кислоти одразу розпочався поділ клітин, який тривав до 90 хв, далі спостерігалась стаціонарна фаза та відмирання клітин [21].

Додавання 0,02 мг/мл фолієвої кислоти до шостого зразка привело до інгібування росту культури клітин дріжджів. Процес відмирання клітин розпочався на 60 хв. та тривав до закінчення процесу культивування клітин дріжджів. Концентрація фолієвої кислоти 0,02 мг/мл інгібує проліферативну активність дріжджів, в результаті чого зменшується приріст біомаси [21].

Відновлена форма фолієвої кислоти приймає участь у синтезі ДНК, амінокислот та утворенні нових клітин, що є результатом збільшення біомаси дріжджів [1, 21].

Пригнічення росту клітин можна пояснити тим, що поживних речовин у вигляді сахарів, не достатньо для великої концентрації фолієвої кислоти, через те, що в її присутності відбувається швидке розщеплення сахарів через деякий час клітинам немає чим житись, тому і відбувається процес інгібування.

Проаналізувавши результати експерименту можна зробити висновок, що фолієва кислота в певній кількості є активатором проліферації клітин дріжджів *S. cerevisiae*. Але для того, щоб отримати бажаний результат необхідно використовувати відповідну концентрацію кислоти. Бо як видно на рис. 2 активація поділу клітин відбувається лише при концентрації 0,006 мг/мл та в незначній мірі при концентрації 0,004 мг/мл.

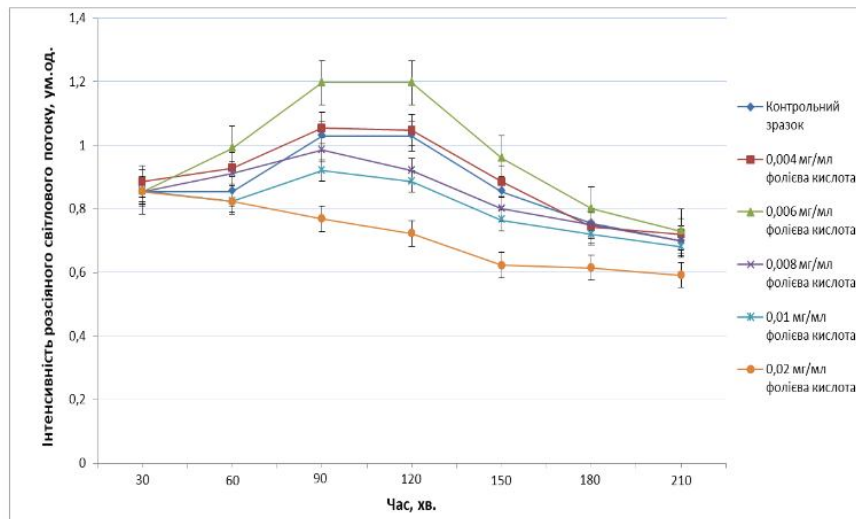


Рисунок 2 – Кінетичні криві росту періодичної культури дріжджів *S. cerevisiae* при додаванні фолієвої кислоти різної концентрації

Це пояснює той факт, що культивування клітин дріжджів повинно відбуватися на багатofакторних поживних середовищах, так як використання лише одного джерела вуглеводів недостатньо для активного процесу розмноження клітин дріжджів. Експериментальне дослідження показує, що біологічно активні речовини мають концентрації, які позитивно впливають на клітини, та критичні межі, додавання яких запускають протилежні процеси – інгібування росту та розвитку клітин, що в результаті приводить до їх відмирання [1, 21].

Найбільш оптимальна концентрація дріжджів для активації поділу клітин (при температурі культивування 28 °С, поживне середовище з 20 % вмістом сахарози) –  $1 \cdot 10^8$  КУО/мл.

Порівнюючи між собою максимальні показники росту клітин дріжджів у двох групах можна зробити висновок, що фолієва кислота на відміну від бурштинової/аскорбінової кислот викликала більш активний процес поділу клітин дріжджів. Активний поділ клітин у першому та другому експерименті спостерігався протягом 60 хв.

Наступним кроком було об'єднання препаратів бурштинової/аскорбінової (0,0015/0002 мг/мл) та фолієвої кислот (0,006 мг/мл) та розрахунок питомої швидкості росту дріжджів *S. cerevisiae*. У процесі проведення експерименту було встановлено, що найбільша питома швидкість росту клітин спостерігалась у комплексному препараті, до складу якого входили три органічні кислоти. Експериментально доведено, що питома швидкість розмноження дріжджів, у комплексному препараті підвищилася в середньому на 30–35 % відносно контрольного зразка. Підвищення питомої швидкості росту на 20–25 % дріжджів спостерігалось також і в середовищі з фолієвою кислотою, додавання бурштинової/аскорбінової кислот не значно підвищувало питому швидкість (приблизно на 10 %) росту культури дріжджів *S. cerevisiae*.



Таким чином, біологічно активні речовини мають певні концентрації, які активують поділ клітин і сприяють їх активному розвитку та критичні межі, додавання яких призводить до інгібування розвитку та росту дріжджових клітин.

На рис. 3 представлені графіки порівняльної характеристика препаратів фолієвої кислоти бурштинової/аскорбінової кислоти.

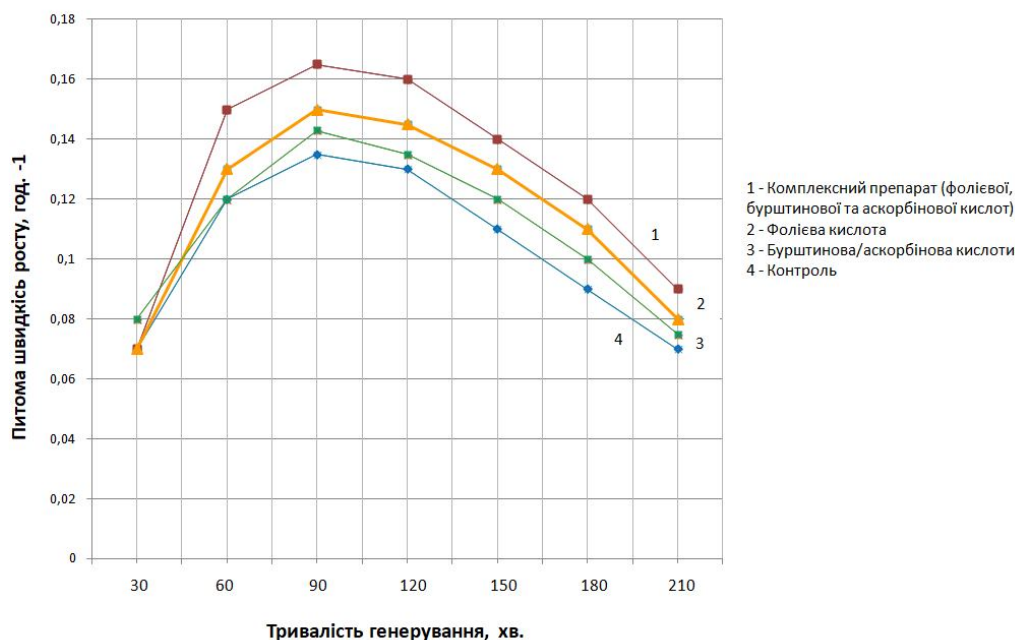


Рисунок 3 – Графіки питомої швидкості росту клітин дріжджів під дією препаратів фолієвої кислоти, бурштинової та аскорбінової кислот

### Висновки

Досліджено вплив біологічно активних речовин на проліферативну активність клітин *S. cerevisiae*. Було встановлено концентрації та доказано регулюючу дію препаратів фолієвої кислоти, бурштинової та аскорбінової кислот на проліферативну активність клітин дріжджів.

Проведено порівняльний аналіз впливу різних концентрацій біологічно активних речовин на ріст культури мікроорганізмів. Встановлено найбільш оптимальні концентрації препаратів для активації поділу клітин дріжджів: комплексний препарат бурштинова/аскорбінова кислоти – 0,0015/0002 мг/мл; фолієва кислота – 0,006 мг/мл.

Рекомендовано застосовувати комплексний препарат бурштинової, аскорбінової та фолієвої кислот для підвищення проліферативної активності дріжджів в біотехнологічній, біофармацевтичній та харчовій промисловості.

### Література

1. Косів Р.Б., Паляниця Л.Я., Березовська Н.І., Харандюк Т.В. Інтенсифікація зброджування високогустинного пивного суслу за участю вітамінів // Харчова наука і технологія. № 10, Т. 3. 2016. С. 39–44.

2. Gasch A.P., Werner-Washburne M. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation // *Functional & integrative genomics*. 2002. Vol. 2 (4–5). P. 181–192.
3. Hohmann S., Mager W.H. *Yeast Stress Responses*. Berlin: Springer-Verlag, 2003. 389 p.
4. Маринченко Л.В., Ніжельська О.І., Маринченко В.О. Стимуляція накопичення біомаси та бродильної активності культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за допомогою надвисокочастотного електромагнітного випромінювання // *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2011. № 3. С. 68–73.
5. Мелетьєв А.Є., Тодосійчук С.Р., Кошова В.М. Технохімічний контроль виробництва солоду, пива і безалкогольних напоїв. Вінниця: Нова Книга, 2007. 392 с.
6. Лавренчук Г.Й., Бундюк Л.С., Чоботько Г.М., Гурандо Г.М. Модифікаційний вплив низькоінтенсивних електромагнітних хвиль міліметрового діапазону на клітини *in vitro*, опромінюваних іонізуючою радіацією // *Фізика живого*. 2007. № 1. С. 113–124.
7. Кошова В.М., Яжло В.С., Каплуненко В.Г., Огородник Ю.І. Підвищення бродильної активності пивоварних дріжджів за допомогою наноаквахелату цинку // *Східно-європейський журнал передових технологій*. 2015. 4/10 (76). С. 40–44.
8. Трегуб Н.С., Капрельянц Л.В. Кінетичні параметри накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* на середовищах із селеном // *Наукові праці*. 2014. В. 46, Т. 2. С. 112–115.
9. Eszenyi P., Sztrik A., Babka B. Elemental, nano-sized (100–500 nm) Selenium production by probiotic lactic acid bacteria // *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 2011. Vol. 1, N 2. P. 74–79.
10. Mudrak T., Kuts A., Kovalchuk S., Kurylenko R., Bondar N. Selection of the complex of enzyme preparation for the hydrolysis of the constituents of grain at the fermentation of the wort of high // *Food Science and Technology*. 2018. № 12 (2). P. 19–25.
11. Ковальчук С.С., Мудрак Т.О. Інноваційна технологія зброджування висококонцентрованого суслу із зернової сировини // *Prospects and priorities of research in science and technology: collective monograph*. Riga, Latvia : Baltija Publishing, 2020. P. 60–100.
12. Белих І.А., Самойленко С.І., Варанкіна О.О., Ларінцева Н.В., Висеканцев І.П. Вплив деяких екзогенних речовин на проліферативну активність продуцентів в біотехнології // *Вісник Національного технічного університету «ХПІ»*. Сер.: Інноваційні дослідження у наукових роботах студентів. Харків : НТУ «ХПІ». 2018. № 18 (1294). С. 74–79.
13. Hammond, J., K. Smart. *Yeast growth and nutrition [Text]*. // *Brewing Yeast Fermentation Performance*. Oxford, UK: Oxford Brookes University Press, 2000. P. 77–85.
14. Карпутіна М.В., Романова З.М., Сидор В.М. Сучасні способи активації процесів розмноження та ферментації пивоварних дріжджів [Електронний ресурс]: К.: НУХТ, 2012. 8 с.
15. Дробот В. І., Ба сок Б. І., Ободович М. О., Семенко О. Ю. Спосіб активації пресованих хлібопекарських дріжджів. Пат. 54219 Україна, МПК С 12 N 1/18 заявник та патентовласник Національний університет харчових технологій (Україна). № 2002064865; заявл. 13.08.2002; опубл. 17.02.2003, Бюл. № 2. 8 с.
16. Ткаченко Л.В., Вітряк О.П. Перспективи використання молочної сироватки для інтенсифікації біотехнологічних процесів // *Міжнародна науково-практична інтернет-конференція: Наукові дослідження та їх практичне застосування. Сучасний стан та*

шляхи розвитку 3–15 жовтня 2013р. Режим доступу: <http://www.sworld.com.ua/konfer32/645.pdf>.

17. Hammond J. Yeast growth and nutrition. *Brewing Yeast Fermentation Performance*. Oxford, UK: Oxford Brookes University Press, 2000. P. 77–85.

18. Лебеденко Т.Є., Кожевнікова В.О., Соколова Н.Ю. Удосконалення процесу активації дріжджів шляхом використання фітодобавок // Біопроцеси, біотехнологія харчових продуктів, БАР. Т. 9, № 2, 2015, С. 25–35.

19. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В., Коломієць Ю.В., Корзун Д.Ю., Київ: ФОП Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник 2014. 252 с.

21. Белих І.А., Варанкіна О.О., Самойленко С.І. Дослідження впливу фолієвої кислоти на проліферативну активність культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали І міжнародної наук.-практ. інтернет-конф. (25 березня 2021 р., м. Харків). Електрон. дані. Х. : НФаУ, 2021. 389 с.

22. Белих І.А., Яремінець Н.С., Самойленко С.І., Ларінцева Н.В. Вплив бурштинової кислоти на біотехнологічний процес культивування дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* // Materialy XIV Miedzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji “Naukowa mysl informacyjnej powieki 2018”. Przemysl : Nauka i studia. Vol. 5. P. 59–64.

23. Погожих, М.І., Гніцевич В.А., Слащева А.В. Оптимізація концентрації добавки топінамбура і кратності подрібнення модельних фаршевих систем: зб. наук. пр. // Прогресивні ресурсозберігаючі технології та їх економічне обґрунтування у підприємствах харчування. Економічні проб лемі торгівлі. Х.: ХДУХТ, 2005. Ч. 1. С. 81–86.

24. Паляниця Л.Я., Березовська Н.І., Косів Р.Б., Зуб Н.О. Вплив умов регідратації сухих дріжджів на їх активність // Вісник Львівської політехніки. В. 1, № 1. 2018. С. 88–93.

25. Мураєва О.О. Конспект лекцій з дисципліни «Фізико-хімічні методи аналізу води» Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова. Харків : ХНУМГ ім. О.М. Бекетова, 2015. 64 с.

#### Bibliography (transliterated)

1. Kosiv R.B., Palianytsia L.Ia., Berezovska N.I., Kharandiuk T.V. Intensyfikatsiia zbrodzhuvannia vysokohustynnoho pyvnoho susla za uchastiu vitaminiv // Kharchova nauka i tekhnolohiia. № 10, Т. 3. 2016. P. 39–44.

2. Gasch A.P., Werner-Washburne M. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation // *Functional & integrative genomics*. 2002. Vol. 2 (4–5). P. 181–192.

3. Hohmann S., Mager W.H. *Yeast Stress Responses*. Berlin: Springer-Verlag, 2003. 389 p.

4. Marynchenko L.V., Nizhelska O.I., Marynchenko V.O. Stymuliatsiia nakopychenia biomasy ta brodylnoi aktyvnosti kultury drizhdzhiv *Saccharomyces cerevisiae* za dopomohoiu nadvysokochastotnoho elektromahnitnoho vyprominiuvannia // Naukovi visti NTUU «KPI». 2011. № 3. P. 68–73.

5. Meletiev A.Ie., Todosiichuk S.R., Koshova V.M. Tekhnokhimichni kontrol vyrobnytstva solodu, pyva i bezalkoholnykh napoiv. Vinnytsia: Nova Knyha, 2007. 392 p.

6. Lavrenchuk H.I., Bundiuk L.S., Chobotko H.M., Hurando H.M. Modyfikatsiinyi vplyv nyzkointensyvnykh elektromahnitnykh khvyl milimetrovoho diapazonu na klityny in vitro, oprominiuvanykh ionizuiuchoiu radiatsiieiu // *Fizyka zhyvoho*. 2007. № 1. P. 113–124.

7. Koshova V.M., Yazhlo V.S., Kaplunen V.H., Ohorodnyk Yu.I. Pidvyshchennia bro-dylnoi aktyvnosti pyvovarnykh drizhdzhiv za dopomohoiu nanoakvkhelatu tsynku // Skhid-no-yevropeyskyi zhurnalпередovykh tekhnolohii. 2015. 4/10 (76). P. 40–44.
8. Trehub N.S., Kapreliants L.V. Kinetychni parametry nakopychennia biomasy *Lactobacillus acidophilus* na seredovyschchakh iz selenom // Naukovi pratsi. 2014. Vyp. 46, Tom 2. P. 112–115.
9. Eszenyi P., Sztrik A., Babka B. Elemental, nano –sized (100–500 nm) Selenium production by probiotic lactic acid bacteria // International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. 2011. Vol. 1, N 2. P. 74–79.
10. Mudrak T., Kuts A., Kovalchuk S., Kyrylenko R., Bondar N. Selection of the complex of enzyme preparation for the hydrolysis of the constituents of grain at the fermentation of the wort of high // Food Science and Technology. 2018. №12 (2). P. 19–25.
11. Kovalchuk S.S., Mudrak T.O. Innovatsiina tekhnolohiia zbrodzhuvannia vysokokontsentrovanoho susla iz zernovoi syrovyny // Prospects and priorities of research in science and technology : collective monograph. Riga, Latvia : Baltija Publishing, 2020. P. 60–100.
12. Bielykh I.A., Samoilenko S.I., Varankina O.O., Larintseva N.V., Vysekantsev I.P. Vplyv deiakykh ekzohennykh rehovyn na proliferatyvnu aktyvnist produtsentiv v biotekhnolohii // Visnyk Natsionalnoho tekhnichnoho universytetu «KhPI». Ser.: Innovatsiini doslidzhennia u naukovykh robotakh studentiv. Kharkiv : NTU «KhPI». 2018. № 18 (1294). P. 74–79.
13. Hammond, J., K. Smart. Yeast growth and nutrition [Text] // Brewing Yeast Fermentation Performance. — Oxford, UK: Oxford Brookes University Press, 2000. P. 77–85.
14. Karputina M.V., Romanova Z.M., Sydor V.M. Suchasni sposoby aktyvatsii protsesiv rozmnozhenia ta fermentatsii pyvovarnykh drizhdzhiv [Elektronnyi resurs]: K.: NUKhT, 2012. 8 p.
15. Drobot V. I., Ba sok B. I., Obodovych M. O., Semenko O. Yu. Sposib aktyvatsii presovanykh khlibopekarskykh drizhdzhiv: Pat. 54219 Ukraina, MPK S 12 N 1/18 / zaiavnyk ta patentovlasnyk Natsionalnyi universytet kharchovykh tekhnolohii (Ukraina). – № 2002064865; zaiavl. 13.08.2002; opubl. 17.02.2003, Biul. № 2. 8 p.
16. Tkachenko L.V., Vitriak O.P. Perspektyvy vykorystannia molochnoi syrovatky dlia intensyfikatsii biotekhnolohichnykh protsesiv // Mizhnarodna nauково-praktychna internet-konferentsiia: Naukovi doslidzhennia ta yikh praktychne zastosuvannia. Suchasnyi stan ta shliakhy rozvytku 3–15 zhovtnia 2013 r. Rezhym dostupu: <http://www.sworld.com.ua/konfer32/645.pdf>.
17. Hammond J. Yeast growth and nutrition. Brewing Yeast Fermentation Performance. Oxford, UK: Oxford Brookes University Press, 2000. P. 77–85.
18. Lebedenko T.Ie., Kozhevnikova V.O., Sokolova N.Iu. Udoskonalennia protsesu aktyvatsii drizhdzhiv shliakhom vykorystannia fitodobavok // Bioprotsesy, biotekhnolohiia kharchovykh produktiv, BAR. T. 9, № 2. 2015. P. 25–35.
19. Melnychuk M.D., Kliachenko O.L., Borodai V.V., Kolomiets Yu.V., Korzun D.Iu., Kyiv: FOP Zahalna (promyslova) biotekhnolohiia: navchalnyi posibnyk 2014. 252 p.
21. Bielykh I.A., Varankina O.O., Samoilenko S.I. Doslidzhennia vplyvu foliievoi kysloty na proliferatyvnu aktyvnist kultury drizhdzhiv *Saccharomyces cerevisiae* Problemy ta dosiahnennia suchasnoi biotekhnolohii: materialy I mizhnarodnoi nauk.-prakt. internet-konf. (25 bereznia 2021 r., m. Kharkiv). Elektron. dani. Kh. : NFaU, 2021. 389 p.
22. Bielykh I.A., Yareminets N.S., Samoilenko S.I., Larintseva N.V. Vplyv burshtynovoi kysloty na biotekhnolohichni protses kulyvuvannia drizhdzhiv *Saccharomyces*

*cerevisiae* // *Materialy XIV Miedzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji "Naukowa mysl informacyjnej powieki 2018"*. Przemysl : Nauka i studia. Vol. 5. P. 59–64.

23. Pohozykh, M.I., Hnitsevych V.A., Slashcheva A.V. Optyimizatsiia kontsentratsii doba-vky topinambura i kratnosti podribnennia modelnykh farshevykh system [Tekst]: zb. nauk. pr. // *Prohresyvni resursozberihaiuchi tekhnolohii ta yikh ekonomichne obgruntuvannia u pidpriemstvakh kharchuvannia. Ekonomichni prob lemy torhivli*. Kh.: KhDUKht, 2005. Ch. 1. P. 81–86.

24. Palianytsia L.Ia., Berezovska N.I., Kosiv R.B., Zub N.O. Vplyv umov rehidratatsii sukhykh drizhdzhiv na yikh aktyvnist // *Visnyk Lvivskoi politekhniki*. V. 1, № 1. 2018. P. 88–93.

25. Muraieva O.O. Konspekt leksii z dystsypliny «Fyzyko-khimichni metody analizu vody» Kharkiv. nats. un-t misk. hosp-va im. O. M. Beketova. Kharkiv : KhNUMH im. O.M. Beketova, 2015. 64 p.

УДК 579.6;542.8

Белих І.А., к.біол.н., доцент, Самойленко С.І., к.техн.н., доцент, Близнюк О.М., д.техн.н., професор, Масалігіна Н.Ю., к.техн.н., доцент, Белінська А.П., к.техн.н., доцент, Варанкіна О.О., к.техн.н., доцент, Чечуй О.Ф., к.біол.н., доцент, Звягінцева О.В. к.біол.н., доцент

### **ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В БІОТЕХНОЛОГІЇ ДРІЖДЖІВ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ**

У роботі розглянуто вирішення питань, пов'язаних із підвищенням ефективності технологічних процесів та забезпеченням випуску готової продукції високої якості, що є актуальним для виробництв, заснованих на використанні дріжджів *S. cerevisiae*. У роботі описано основні причини необхідності регулювання обміну речовин дріжджової культури, розглянуті існуючі на практиці та запропоновані прийоми підвищення проліферативної активності.

Проліферативні процеси, що протікають у дріжджовій клітині, досить легко піддаються регуляції. Тому, знаючи залежність між конкретними умовами навколишнього середовища та тими чи іншими сторонами життєдіяльності дріжджової культури, можна цілеспрямовано змінювати її зростання, розвиток та обмін речовин. Створення та підтримання певних умов культивування дріжджів дозволяє керувати ходом ферментаційного процесу.

Досліджено вплив біологічно активних речовин на проліферативну активність клітин *S. cerevisiae*. Було встановлено концентрації та доказано регулюючу дію препаратів бурштинової та фолієвої кислот на проліферативну активність клітин дріжджів. Проведено порівняльний аналіз впливу різних концентрацій екзогенних речовин на ріст культури мікроорганізмів. Було встановлено найбільш оптимальні концентрації препаратів для активації поділу клітин дріжджів: бурштинова/бурштинова кислоти – 0,0015/0,0002 мг/мл; фолієва кислота – 0,006 мг/мл.

Розрахована питома швидкість розмноження дріжджів під час культивування у 20 % розчині сахарози з препаратами бурштинової/аскорбінової та фолієвої кислот. Встановлено, що найбільша питома швидкість росту клітин спостерігалась у комплексному препараті, до складу якого входили три органічні кислоти. Експериментально доведено, що питома швидкість розмноження дріжджів, у комплексному препараті під-

вищилася в середньому на 30–35 % відносно контрольного зразка. Підвищення питомої швидкості росту на 20–25 % дріжджів спостерігалось також і в середовищі з фоліевою кислотою, додавання бурштинової/аскорбінової кислот не значно підвищувало питому швидкість (приблизно на 10 %) росту культури дріжджів *S. cerevisiae*.

Доведено, що біологічно активні речовини мають певні концентрації, які активують поділ клітин і сприяють їх активному розвитку та критичні межі, при яких відбувається інгібування розвитку та росту дріжджових клітин.

**Ключові слова:** бродіння, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, життєздатність клітин, нефелометрія, проліферативна активність, технологічний процес, ферментаційний процес, чиста культура мікроорганізмів.

Белых И.А., к.биол.н., доцент, Самойленко С.И., к.техн.н., доцент, Близнюк О.Н., д.техн.н., профессор, Масалитина Н.Ю., к.техн.н., доцент, Варанкина А.А., к.техн.н., доцент, Чечуй О.Ф., к. биол.н., доцент, Звягинцева О.В. к.биол.н., доцент

### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В БИОТЕХНОЛОГИИ ДРОЖЖЕЙ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В работе рассмотрено решение вопросов, связанных с повышением эффективности технологических процессов и обеспечением выпуска готовой продукции высокого качества, актуальным для производств, основанных на использовании дрожжей *S. cerevisiae*. В работе описаны основные причины необходимости регулирования обмена веществ дрожжевой культуры, рассмотрены существующие на практике и предложены приемы повышения пролиферативной активности.

Проллиферативные процессы, протекающие в дрожжевой клетке, легко поддаются регуляции. Поэтому, зная зависимость между конкретными условиями окружающей среды и теми или иными сторонами жизнедеятельности дрожжевой культуры, можно целенаправленно изменять ее рост, развитие и обмен веществ. Создание и поддержание определенных условий культивирования дрожжей позволяет управлять ходом ферментационного процесса.

Исследовано влияние биологически активных веществ на пролиферативную активность клеток *S. cerevisiae*. Были установлены концентрации и доказано регулирующее действие препаратов янтарной и фолиевой кислот на пролиферативную активность клеток дрожжей. Проведен сравнительный анализ влияния различных концентраций экзогенных веществ на рост культуры микроорганизмов. Были установлены наиболее оптимальные концентрации препаратов для активации деления клеток дрожжей: янтарная/аскорбиновая кислоты – 0,0015/0,0002 мг/мл; фолиевая кислота – 0,006 мг/мл.

Рассчитана удельная скорость размножения дрожжей при культивировании в 20 % растворе сахарозы с препаратами янтарной/аскорбиновой и фолиевой кислот. Установлено, что наибольшая удельная скорость роста клеток наблюдалась в комплексном препарате, в состав которого входили три органические кислоты. Экспериментально подтверждено, что удельная скорость размножения дрожжей в комплексном препарате повысилась в среднем на 30–35 % относительно контроля. Повышение удельной скорости роста на 20–25 % дрожжей наблюдалось также и в среде с фолиевой кислотой, добавление янтарной/аскорбиновой кислот не значительно повышало удельную скорость (приблизительно на 10 %) роста культуры дрожжей *S. cerevisiae*.

Установлено, что биологически активные вещества имеют определенные концен-

нтрации, которые активируют деление клеток и способствуют их активному развитию и критические границы, при которых происходит ингибирование развития и роста дрожжевых клеток.

**Ключевые слова:** брожение, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, жизнеспособность клеток, нефелометрия, пролиферативная активность, технологический процесс, ферментационный процесс, чистая культура микроорганизмов.

Bielykh I.A., Samoilenko S.I., Bliznjuk O.N., Masalitina N.Yu., Belinska A.P.,  
Varankina O.O., Chechui H.F., Zviahintseva O.V.

**STUDY OF THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN YEAST BIOTECHNOLOGY AND PHYSICO-CHEMICAL METHODS OF ITS DETERMINATION**

The article discusses the solution of issues related to increasing the efficiency of technological processes and ensuring the release of high-quality finished products, relevant for production based on the use of *S. cerevisiae* yeast. The paper identifies major reasons for the need to regulate yeast culture metabolism, considers existing practice and proposes methods of changing its metabolic activity. The purpose of the research is to create the classification of the supplements / preparations from different origin to improve yeast vital activity by adjusting its culture medium composition with the use of complex hierarchical faceted method.

The proliferative processes taking place in the yeast cell are quite easily regulated. Therefore, knowing the dependence between the specific conditions of the environment and certain aspects of the yeast culture's vital activity, it is possible to purposefully change its growth, development and metabolism. Creating and maintaining certain conditions for the cultivation of yeast allows you to control the course of the fermentation process.

The influence of biologically active substances on the proliferative activity of *S. cerevisiae* cells was investigated. Concentrations were determined and the regulatory effect of succinic and folic acid preparations on the proliferative activity of yeast cells was proven. A comparative analysis of influence of different concentrations of exogenous substances on microorganisms culture growth was carried out. The most optimal concentrations of drugs for activation of yeast cell division were determined: succinic acid/ascorbic acid – 0.0015/0.0002 mg/ml; folic acid – 0.006 mg/ml.

Specific growth rate of yeast during cultivation in 20 % sucrose solution with succinic/ascorbic and folic acid preparations was calculated. It was established that the highest specific rate of cell growth was observed in the complex preparation, which included three organic acids. It was established that the specific rate of yeast reproduction in the complex preparation increased by an average of 30–35 % relative to the control sample. Increase in specific growth rate by 20–25 % of yeast was also observed in the medium with folic acid, the addition of succinic/ascorbic acids did not significantly increase specific rate (by approximately 10 %) of the growth of the *S. cerevisiae* yeast culture. It has been established that biologically active substances have certain concentrations that activate cell division and contribute to their active development and critical limits at which the development and growth of yeast cells are inhibited.

**Keywords:** fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* yeast, cell viability, nephelometry, proliferative activity, technological process, fermentation process, pure culture of microorganisms.