

УДК 577.114.4:663.126

ЧЕРНО Н.К., д-р техн. наук, професор, СТАНКЕВИЧ Г.Н., д-р техн. наук, професор,  
ШАПКИНА К.И., аспірант

Одесская национальная академия пищевых технологий

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БЕТА-ГЛЮКАНА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

Установлены оптимальные режимы дезинтеграции клеточных оболочек дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раствором пероксида водорода. Разработана и обоснована технология получения структурного глюкана дрожжей.

**Ключевые слова:** структурный полисахарид, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, математическое планирование многофакторного эксперимента.

The optimal modes of cell walls disintegration of yeast *Saccharomyces cerevisiae* by hydrogen peroxide solution were found. The technology of obtaining the yeast structural glucan was developed and substantiated.

**Keywords:** structural polysaharidami, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mathematical plans of multivariable experiment.

В настоящее время возрос интерес к  $\beta$ -глюканам как соединениям с широким спектром физиологических эффектов. Они являются веществами, которые обладают иммуномодулирующими, противоопухолевыми, радиопротекторными, антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, проявляют способность к снижению уровня холестерина и глюкозы в крови [1].

Анализ и обобщение фармакодинамических эффектов  $\beta$ -глюкана позволяют рассматривать его в качестве средства профилактики и лечения бактериальных, вирусных, грибковых, паразитарных инфекций, а также применять при аллергических и сердечно-сосудистых заболеваниях [2].

Одним из перспективных источников получения  $\beta$ -глюкана являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Медико-биологическими исследованиями было показано, что биологическая активность глюкана дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* значительно выше активности глюканов другого происхождения, что связано с особенностью структуры полисахарида [3].

В дрожжах  $\beta$ -глюкан выполняет функцию структурного полисахарида, который локализован в клеточной оболочке и прочно связан с маннопротеиновым комплексом [4]. Получение глюкана удовлетворительной степени чистоты является сложной задачей. Основная проблема заключается в удалении сопутствующих ему биполимеров — маннана и белка в виде прочно связанного маннопротеинового комплекса.

Известные способы получения структурного  $\beta$ -глюкана дрожжей имеют ряд недостатков, среди которых наиболее значимыми являются трудоемкость и энергоемкость производства, либо недостаточная степень очистки получаемого полисахарида. Кроме того, производство препаратов дрожжевых глюканов в Украине отсутствует, потребность в диетических добавках и функциональных продуктах с включением  $\beta$ -глюканов удовлетворяется за

счет импорта, что определяет актуальность разработки отечественных технологий  $\beta$ -глюкана дрожжей.

Нами предложен новый, более простой способ получения структурного  $\beta$ -глюкана дрожжей, который заключается в обработке дрожжей пероксидом водорода массовой долей 3...24 % с последующей экстракцией сопутствующих глюкану веществ растворами щелочей и кислот [5].

Цель настоящего исследования — определение оптимальных режимов дезинтеграции клеточных оболочек дрожжей пероксидом водорода и разработка с учетом полученных результатов технологии производства структурного глюкана *Saccharomyces cerevisiae*.

Для определения оптимальных условий дезинтеграции клеточных оболочек дрожжей раствором пероксида водорода, необходимо определить влияние концентрации раствора  $H_2O_2$  ( $C_{H_2O_2}$ ), соотношение твердой и жидкой фаз (гидромодуль  $GM$ ) и длительности процесса ( $\tau$ ) на выходные параметры — содержание белковых веществ в полученном препарате ( $y_1$ ) и выход полисахарида ( $y_2$ ), которые были приняты в качестве критериев оптимальности.

С целью сокращения количества опытов и получения достоверных данных о закономерности процесса дезинтеграции целесообразно использовать методы математического планирования многофакторных экспериментов. Для этого был реализован план полного трехфакторного эксперимента ПФЭ-2<sup>3</sup>.

Исходя из необходимости получения продукта, пригодного для введения в пищевые системы, и, опираясь на известную из литературных источников информацию, а также с учетом результатов наших предыдущих исследований, были выбраны уровни и интервалы варьирования факторов, влияющих на содержание белковых веществ и выход конечного продукта. Процесс дезинтеграции проводили при температуре окружающей среды 18...20 °С, исходя не только из сохранения нативной структуры белка, но с целью экономии энергозатрат, то есть без нагревания.

Опыты проводили в трех параллелях. Однородность результатов опытов оценивали по критерию Кохрена. Чтобы исключить влияние систематических ошибок, вызванных внешними условиями, и уменьшить случайные ошибки, опыты были рандомизированы [6].

Матриця плану експериментів і отримані результати процесу руйнування кліткових оболонок дріжджів (усередненні експериментальні  $\bar{y}_1$  і  $\bar{y}_2$ , а також розрахункові  $\hat{y}_1$  і  $\hat{y}_2$ ) приведені в таблиці. В цій же таблиці приведені відносні помилки

між паралельними експериментами ( $\delta_{\bar{y}_1}$  і  $\delta_{\bar{y}_2}$ ) і між експериментальними і розрахунковими значеннями вихідних параметрів ( $\delta_{\hat{y}_1}$  і  $\delta_{\hat{y}_2}$ ).

Таблиця

Матриця плану експериментів і результати залежності вмісту білка ( $y_1$ ) і виходу полісахариду ( $y_2$ ) при різних умовах процесу руйнування кліткових оболонок дріжджів

№ п/п	Умови експериментів в розмірності						Результати експериментів, %				Відносні помилки, %			
	натуральної			кодуваної			білок		полісахариди		білок		полісахариди	
	$C_{H_2O_2}$ , %	ГМ	$\tau$ , мин	$x_1$	$x_2$	$x_3$	експ. $\bar{y}_1$	расч. $\hat{y}_1$	експ. $\bar{y}_2$	расч. $\hat{y}_2$	експ. $\delta_{\bar{y}_1}$	расч. $\delta_{\hat{y}_1}$	експ. $\delta_{\bar{y}_2}$	расч. $\delta_{\hat{y}_2}$
1	3	1	60	-1	-1	-1	17,5	17,54	16,3	16,1	4,14	0,43	2,15	1,38
2	24	1	60	1	-1	-1	7,50	7,43	12,2	12,4	2,67	1,00	4,56	1,71
3	3	2	60	-1	1	-1	14,03	13,96	14,2	14,4	4,35	0,53	2,16	1,59
4	24	2	60	1	1	-1	3,77	3,84	12,0	11,8	4,06	1,99	3,82	1,74
5	3	1	300	-1	-1	1	5,37	5,37	10,9	11,2	9,19	0,00	3,21	2,06
6	24	1	300	1	-1	1	0,60	0,60	8,9	8,7	16,67	0,00	3,37	2,34
7	3	2	300	-1	1	1	5,10	5,10	9,7	9,4	7,07	0,00	3,37	2,34
8	24	2	300	1	1	1	0,3	0,33	7,9	8,1	4,85	0,00	3,88	2,65

Используя метод наименьших квадратов, последовательный регрессионный анализ и программу PLAN [6], были получены следующие уравнения регрессии, описывающие зависимость содержания белковых веществ ( $y_1$ , %) и выхода полисахарида ( $y_2$ , %) от исследуемых факторов:

$$y_1 = 6,7708 - 3,7208 \cdot C_{H_2O_2} - 0,9625 \cdot ГМ - 3,920 \cdot \tau + 1,3375 \cdot C_{H_2O_2} \cdot \tau + 0,8291 \cdot ГМ \cdot \tau, \quad (1)$$

$$y_2 = 11,5083 - 1,2667 \cdot C_{H_2O_2} - 0,5833 \cdot ГМ - 2,1667 \cdot \tau + 0,2750 \cdot C_{H_2O_2} \cdot ГМ + 0,3083 \cdot C_{H_2O_2} \cdot \tau. \quad (2)$$

В первом уравнении коэффициент  $b_{12} = -0,0375$  оказался статистически незначим, так как по модулю он меньше доверительного интервала  $\varepsilon_{b_i} = 0,1788$  и, в связи с этим, был исключен из уравнения регрессии. Поскольку расчетное значение критерия Фишера меньше, чем критическое ( $F = 5,06 < F_{кр} = 19,43$ ), то с 95 % надежностью можно утверждать, что полученное уравнение адекватно описывает экспериментальные данные.

Во втором уравнении коэффициент  $b_{23} = 0,0083$  оказался статистически незначим, так как по модулю он меньше доверительного интервала  $\varepsilon_{b_i} = 0,1708$  и, в связи с этим, был исключен из уравнения регрессии. Поскольку расчетное значение критерия Фишера меньше, чем критическое ( $F = 3,62 < F_{кр} = 3,63$ ), то с 95 % надежностью можно утверждать, что полученное уравнение адекватно описывает экспериментальные данные.

Более наглядно влияние факторов на процесс дезинтеграции прослеживается на графически представленных изолиниях (рис. 1), построенных на основании уравнений (1) и (2).

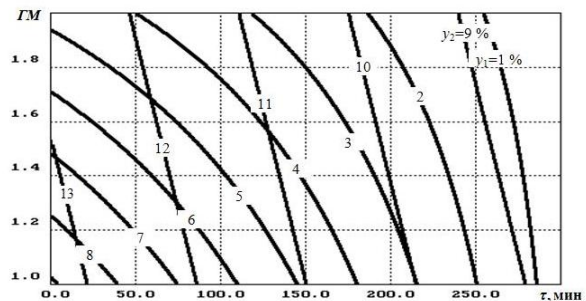


Рис. 1. Ізолінії залежності виходу білка ( $y_1$ ) і полісахариду ( $y_2$ ) від гідромодуля ( $ГМ$ ) і тривалості обробки ( $\tau$ ) при масовій частці  $H_2O_2$  в розчині  $C_{H_2O_2} = 24\%$

Следующей задачей исследований было определение условий, при которых содержание белковых веществ в конечном препарате составляло бы около 3,8 % [7], так как данная чистота полисахарида считается эталонной.

В результате анализа изолиний (рис. 1) и проведенных расчетов, были определены оптимальные значения, соответствующие содержанию белка 3,8 %, которые составляют  $C_{H_2O_2} = 24\%$ ,  $ГМ = 1,55$  и  $\tau = 135$  мин. При этих условиях выход полисахарида составляет 10,96 % с. в. дріжджів.

Следует отметить, что в зависимости от поставленной цели при получении глюкогена клеточных стенок дріжджів, варьируя концентрацию пероксида водорода,  $ГМ$  и продолжительность процесса можно получать серию полисахаридов, отличающихся выходом и содержанием сопутствующего белка.

Учитывая полученные оптимальные условия, которые позволяют получить продукт с заданной чистотой, технология получения структурного глюкогена дріжджів представлена на рисунке 2.

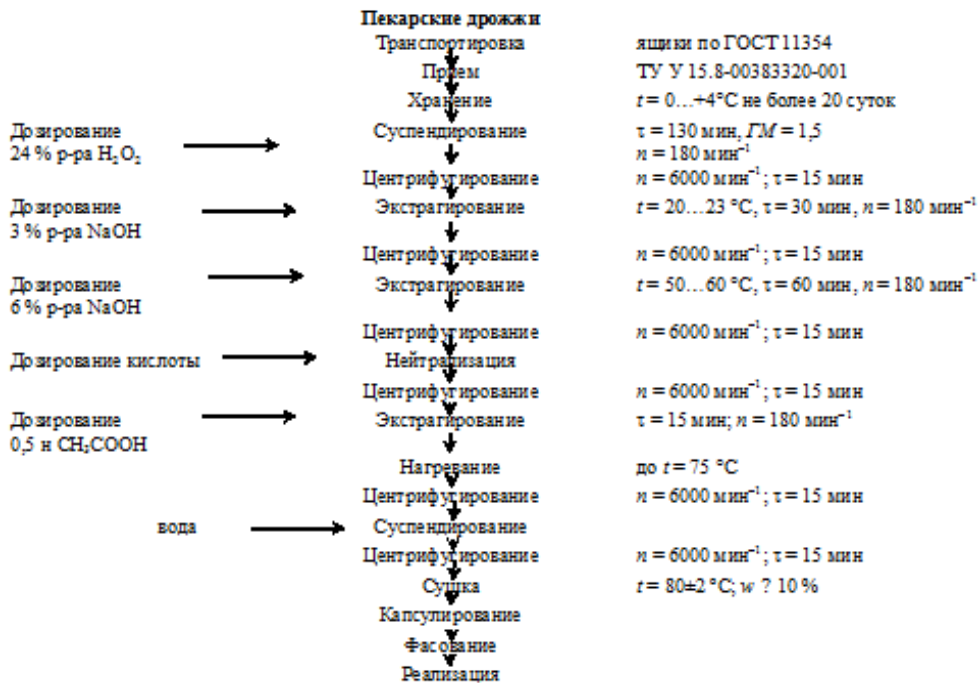


Рис. 2. Технологическая схема производства β-глюкана клеточных стенок дрожжей

Свежие прессованные пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) загружают в сборник, используя элеватор «Гусиная шея», куда насосом подают раствор пероксида водорода концентрации не менее 24 % ( $ГМ = 1,5$ ) для разрушения клеточных оболочек дрожжей. Смесь перемешивают в течение 130 минут после чего перекачивают в центрифугу для отделения твердой фазы, которую затем погружают в резервуар, куда дозатором заливают 3 % раствор NaOH для экстрагирования веществ, сопутствующих глюкану. Их экстракцию проводят без нагревания (20...23 °C,  $ГМ = 5$ ) в течение 30 минут с периодическим перемешиванием, затем смесь перекачивают в центрифугу.

Твердый остаток подают в резервуар, в который дозатором добавляют 6 %-ный раствор NaOH ( $ГМ = 5$ ). Экстракцию ведут при температуре 50-60 °C в течение 60 минут с периодическим перемешиванием, центрифугированием отделяют твердую фазу от жидкой.

Полученный остаток загружают в резервуар для суспендирования в воде и нейтрализации щелочной среды дозированием раствора кислоты до  $pH 7$ , после чего центрифугированием отделяют твердый осадок, который далее загружают в резервуар, куда насосом подают 0,5 н раствор уксусной кислоты, и нагревают до температуры не более 75 °C с периодическим перемешиванием. Жидкую фазу декантируют, остаток суспендируют в воде с периодическим перемешиванием. Жидкую фазу декантируют, а осадок направляют на сушку, которую проводят в распылительной сушилке при температуре 80±2 °C до остаточной влажности не более 10 %. Полученный продукт подают на линию оформления готовой продукции.

Таким образом, с помощью методов математического моделирования оптимизированы параметры дезинтеграции клеточных оболочек дрожжей пероксидом водорода, с учетом которых разработана технология производства структурного β-глюкана дрожжей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vetvicka, V. Effects of marine β-1,3-glucan on immune reactions [Текст] / V. Vetvicka, J. C. Yvin, International Immunopharmacology – 2004, – 4, – 721–730 p.
- Chen, J. Medicinal importance of fungal β-(1→3), (1→6)-glucans // J. Chen, R. Seviour, Mycological research III – 2007, – 3, – 635–652 p.
- Vetvicka, V. Beta glucans: mechanisms of action [Текст] / V. Vetvicka, M. Novak, Science Publication – 2011 – 82 p.
- Zlatkovic, D. A glucan from active dry baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A chemical and enzymatic investigation of the structure [Текст] / D. Zlatkovic, D. Jacovljevic, D. Zekovic, M.M. Vrvic J. Serb. Chem. Soc. 2003. – 68, (11) – 805-809 p.
- Черно, Н.К. Способ отримання бета-глюкану клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [Текст] / Н.К.Черно, О.В. Коваленко, К.І. Шапкіна // Прогресивні техніки та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: зб. наук. пр. ХДУХТ. – Х.: 2012. – Вип. 2(16). – С.321-326
- Математическое моделирование процессов пищевых производств: Сб. задач: Учеб. пособие [Текст] / Н. В. Остапчук, В. Д. Каминский, Г. Н. Станкевич, В. П. Чучуй; Под ред. Н. В. Остапчука. — К.: Вища шк., – 1992. – 175 с.
- Методы химии углеводов [Текст] / Под ред. Н. К. Кочеткова. – М.: Мир, 1967. – 125 с.

Отримано редакцію 11.2013 р.