

В.В. Ковалева¹, Д.С. Сергеевич², Л.Л. Богданова, к.т.н.¹

¹Институт мясо-молочной промышленности», Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

РАЗРАБОТКА СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ СПОСОБНОСТИ К СТЕРИНООБРАЗОВАНИЮ

V. Kovaleva¹, D. Sergievich², L. Bahdanava¹

¹Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

DEVELOPMENT OF NUTRITION MEDIUM COMPOSITION FOR DEEP CULTIVATION OF YEAST WITH THE PURPOSE OF INCREASING THE ABILITY TO STEROL FORMATION

e-mail: viktoriakovaleva000@gmail.com, S.Den@tut.by, bogdanova_ll@tut.by

*В статье представлена разработка состава жидкой питательной среды для повышения способности к стеринообразованию исследуемого штамма дрожжей *Saccharomyces sp.* КДП с использованием математических методов полного факторного эксперимента.*

*The article presents the development of the composition of a liquid nutrient medium to increase the ability for sterol formation of the studied yeast strain *Saccharomyces sp.* KDP using mathematical methods of a full factorial experiment.*

Ключевые слова: экстрагирование; многофакторный эксперимент; дрожжи; оптическая плотность; стерины.

Key words: extraction; multifactorial experiment; yeast; optical density; sterols.

Введение. В различных отраслях пищевой промышленности и медицине широкое применение находят стероидные соединения микробной природы. Они используются как добавки в продукты питания (функциональное питание) и корма, для повышения биологической ценности. Также эти соединения используют в химико-фармацевтической промышленности для получения из них витамина D и стероидных гормонов, которые в дальнейшем применяются для производства препаратов, предназначенных для регуляции уровня холестерина в крови.

Дрожжи используют в промышленном получении стерина, в частности эргостерина [1]. Благодаря способности микроорганизмов к сверхсинтезу, высокой скорости и селективности образования стероидных соединений, отсутствию токсичных отходов, микробиологический способ может полностью заменить химический синтез [2]. Кроме того, значительный практический интерес представляет возможность использования побочных продуктов пищевых производств в качестве основы для питательных сред в технологии дрожжевого биосинтеза.

Целью исследования является разработка питательной среды для глубинного культивирования дрожжей *Saccharomyces sp.* КДП и оптимизация ее состава методами математического планирования с целью повышения способности к стеринообразованию указанного штамма.

Материалы и методы исследований. В работе использован изолят дрожжей *Saccharomyces sp.* КДП, выделенный авторами ранее с поверхности ягод клубники

методом смыва. Изучены основные культуральные и физиолого-биохимические свойства данного изолята, что позволило определить его родовую принадлежность [3]. Штамм дрожжей *Saccharomyces sp.* КДП способен ассимилировать мальтозу, глюкозу, галактозу и лимонную кислоту. Дает интенсивный рост на средах с 50% глюкозой, с повышенной концентрацией NaCl (10%) [6].

Получение посевного материала осуществляли с помощью метода глубинного культивирования в условиях аэрации с использованием термостатируемого шейкера (BioSan ES-20, Латвия). Нарращивание биомассы дрожжей проводили в аналогичных условиях в колбах Эрленмейера ($V=250 \text{ см}^3$) на питательной среде следующего состава (г/дм^3): меласса – 22,5; KCl – 0,33; KH_2PO_4 – 5, MgSO_4 – 0,17; pH ~ 7.

Для установления способности к стеринобразованию использовали метод экстрагирования стеринов из дрожжевой биомассы [7]. Из навески – 1,0 г, исследуемого воздушно-сухого сырья (высушенного при 105°C до постоянной массы), экстрагировали 70% этиловым спиртом стероидные вещества. Использование этанола способствовало совокупной экстракции липофильных соединений. Наличие в экстракте стеринов определяли, используя качественную реакцию Шиффа [8]. Реакция основана на взаимодействии стеринов с концентрированной серной кислотой, в результате образуется красное кольцо на границе раздела фаз. Под действием серной кислоты происходят дегидратация и окисление холестерина. В результате этого две молекулы дегидрохолестерола соединяются между собой по третьему атому углерода, образуя вещества, с суммарными формулами $\text{C}_{54}\text{H}_{86}$ и $\text{C}_{54}\text{H}_{88}$ (в зависимости от положения двойных связей), которые при взаимодействии с серной кислотой образуют различные производные. Данные реакции характерны не только для холестерина, но и для других стеролов, а также для холевой кислоты.

Количественное определение стеринов в экстракте проводили спектрометрически. Для этого фиксировали первоначальную массу закрытой колбы с экстрактом с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и выдерживали на кипящей водяной бане (при умеренном кипении) в течение 60 мин. Затем колбу закрывали той же пробкой, охлаждая до комнатной температуры. После чего колбу снова взвешивали и доводили экстрагентом до первоначальной массы. Содержимое перемешивали и отфильтровывали через бумажный фильтр. 1 см^3 полученного извлечения помещали в градуированную пробирку на 10 см^3 , добавляли осторожно по каплям 4 см^3 концентрированной серной кислоты и термостатировали при температуре 70°C в течение 60 мин. Содержимое пробирки количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и объем доводили концентрированной серной кислотой до метки. Параллельно готовили пробу сравнения, смешивали 5 см^3 70% этилового спирта и 5 см^3 серной кислоты (концентрированной). Сразу после приготовления для полученных пробы и раствора сравнения измеряли оптическую плотность при аналитической длине волны 328 нм. По формуле 1 определяли сумму стеринов, используя экспериментально установленное значение удельного показателя поглощения:

$$X, \% = \frac{A \cdot V \cdot 25 \cdot 100}{1250 \cdot m \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

V – объем 70% этилового спирта, взятого для экстрагирования;

m – точная навеска анализируемого образца, г;

W – влажность сырья, %;

1250 – удельный показатель поглощения эргостерина.

Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 1,54\%$ [7].

Разработку состава жидкой питательной среды проводили с использованием математических методов полного факторного эксперимента [9]. Исследуемыми факторами, влияющими на суммарное содержание стерина в биомассе *Saccharomyces sp.* КДП, являлись компоненты питательной среды (таблица 1).

Таблица 1 – Значения факторов в натуральных переменных, единицы варьирования и концентрация основных компонентов питательных сред

Компонент среды	Фактор	Основной уровень (0), %	Нижний уровень (-1), %	Верхний уровень (+1), %	Единица варьирования, %
Меласса	X ₁	2,25	1,5	3,0	25
MgSO ₄	X ₂	0,017	0,012	0,023	30

Источник данных: собственная разработка.

Для наработки биомассы исследуемых дрожжей *Saccharomyces sp.* КДП составлены 9 образцов питательных сред (таблица 2). Эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Таблица 2 – Полный факторный эксперимент для двух факторов

№ опыта	Фактор в безразмерной величине	
	X ₁	X ₂
1	+1	+1
2	+1	0
3	+1	-1
4	0	+1
5	0	0
6	0	-1
7	-1	+1

Продолжение таблицы 2

№ опыта	Фактор в безразмерной величине	
	X ₁	X ₂
8	-1	0
9	-1	-1

Источник данных: собственная разработка.

Определение влажности биомассы производили с помощью гравиметрического метода [10].

Микробиологический контроль (контроль промышленной стерильности) осуществляли с помощью контрольной колбы, содержащей все компоненты питательной среды с соблюдением всех условий культивирования опытных образцов.

Расчеты и статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью табличного процессора MS Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. При глубинном культивировании дрожжей для разработки состава питательных сред перспективно использовать методы математического планирования [9]. Данные методы позволяют произвести одновременную оценку степени влияния нескольких факторов на такие параметры, как рост и продуцирующая способность дрожжей.

Определение оптимального состава питательной среды для стеринаобразования дрожжей *Saccharomyces sp.* КДП проводили с использованием математического метода полного факторного эксперимента [9].

Известно, что состав среды культивирования существенно влияет на биосинтез стерина. Снижают выход стерина большое количество азота и ионов калия, стимулируют образование эргостерина кальций и магний, не влияют на него

фосфорные соединения, ионы натрия. Наиболее эффективными источниками углерода, влияющими на эффективность стеринаогенеза, являются: глюкоза и рафиноза (100–200%), мальтоза и фруктоза (30–35%). Исследователи R. Start и L. W. Parks отмечают значимость для синтеза не самих углеводов, а продуктов их распада [12]. Указанные авторы считают, что содержание продуктов деградации углеводов пропорционально уровню кофермента А в клетке. Они составили определенный ряд углеводов с уменьшающейся эффективностью в отношении стеринаобразования: ацетат, этиловый спирт, глюкоза, мальтоза, глицерин, ксилоза и сукцинат. Накоплению стерина в дрожжевых клетках способствуют и органические кислоты с небольшим числом углеродных атомов: пировиноградная кислота (около 295%), янтарная кислота (около 195%), молочная (160–175%), уксусная (100–105%), яблочная (90–100%) [12].

В качестве аналога, разрабатываемой питательной среды для стеринаобразования может служить среда YPD (г/л): дрожжевой экстракт – 10; пептон – 20; pH ~ 7, с дополнительно внесенной глюкозой в количестве 2%. Однако, в промышленных масштабах ее использование не целесообразно, так как в состав входят дорогостоящие компоненты.

Микробиологический синтез позволяет использовать вторичный субстрат (мелассу), в качестве основы для питательной среды, тем самым решить вопрос утилизации промышленных отходов и повысить рентабельность технологии за счет замены глюкозы на вторичное сырье, обеспечив снижение затрат на культивирование продуцентов стерина [13].

Меласса – ценный побочный продукт сахарного производства. В состав мелассы входят углеводы (главным образом сахароза, глюкоза, мальтоза), факторы роста, микро- и макроэлементы, необходимые для роста дрожжей.

При разработке состава питательной среды варьируемыми факторами, влияющими на стеринаобразование и прирост биомассы, являлись следующие компоненты: меласса (X_1), магний сернокислый ($MgSO_4$) (X_2) (таблица 3).

На основании матрицы составлены 9 образцов питательных сред, которые далее использовали для культивирования дрожжей *Saccharomyces sp.* КДП с последующим экстрагированием стерина из биомассы. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Матрица полного факторного эксперимента

№ опыта	Фактор в % от объема среды		Суммарное содержание стерина в биомассе <i>Saccharomyces sp.</i> КДП, %	Количество биомассы <i>Saccharomyces sp.</i> КДП, г/100 см ³ питательной среды	Выход стерина с учетом прироста биомассы, г/100 см ³ питательной среды
	X_1	X_2			
1	3	0,023	10,32	0,3936±0,1	0,04062
2	3	0,017	9,99	0,3814±0,1	0,03810
3	3	0,012	9,48	0,3304±0,09	0,03132
4	2,25	0,023	4,68	0,2883±0,1	0,01349
5	2,25	0,017	5,51	0,3032±0,1	0,01546
6	2,25	0,012	7,16	0,3159±0,1	0,02262
7	1,5	0,023	3,96	0,2382±0,1	0,00943
8	1,5	0,017	3,46	0,1547±0,1	0,00535
9	1,5	0,012	4,14	0,2710±0,09	0,01122

Источник данных: собственная разработка.

Полином при планировании полного факторного эксперимента имел вид $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_1X_2+b_4X_1^2+b_5X_2^2$. Таким образом, полученные линейные коэффициенты и коэффициенты парного взаимодействия соответственно равны: $b_0=0,02$; $b_1=2,03$; $b_2= -0,2$; $b_3=0,11$; $b_4=4,59$; $b_5=4,42$. Таким образом, экспериментально

полученное уравнение регрессии имеет вид: $Y=0,02+2,03 \cdot X_1-0,2 \cdot X_2+0,11 X_1 X_2+4,59 \cdot X_1^2+4,42 \cdot X_2^2$.

Проверку адекватности полученной модели проводили с использованием F – критерия Фишера. Вычисленное значение F было меньше табличного, что доказывает адекватность найденной модели.

Анализ уравнения регрессии и построение кривых поверхности отклика показало, что полученная математическая модель адекватна и не является резко асимметричной относительно коэффициентов. Каждый из выбранных нами факторов в той или иной степени влияет на биосинтез стерина и, следовательно, является значимым.

В ходе эксперимента нами установлено, что наибольшему выходу суммарного содержания стерина с учетом прироста биомассы, соответствует следующий состав среды (г/дм³): меласса – 30,0; KCl – 0,33; K₂PO₄ – 0,5; MgSO₄ – 0,023; pH ~ 7. Таким образом, питательная среда содержит ионы магния, которые стимулируют образование эргостерина. А содержание мелассы в среде способствует повышению выхода стерина, за счет содержания большого количества рафинозы, сахарозы и продуктов ее распада.

При использовании среды YPD, хлебопекарные дрожжи способны синтезировать эргостерол в количествах, достигающих 5,4–5,8% от количества биомассы [13]. При использовании разработанной нами среды, исследуемый изолят дрожжей *Saccharomyces sp.* КДП способен синтезировать суммарное содержание стерина в биомассе в количествах, достигающих 9,48–10,32%, что в 1,77 раз больше аналога.

Экономия при замене субстрата для питательной среды определяется по формуле 2 [14]:

$$\varepsilon = \frac{Ц_1}{Ц_2}, \quad (2)$$

где Ц₁, Ц₂ – стоимость питательной среды соответственно до и после замены субстрата, руб.

В таблице 4 приведено сравнение стоимости разрабатываемой питательной среды и YPD среды. Значения актуальной стоимости приведены на сентябрь 2023 года.

Таблица 4 – Стоимость питательной среды в пересчете на 1 м³

Наименование компонента	Количество на 1 м ³ , кг	Цена за 1 кг, руб.	Стоимость разработанной среды, руб.	Цена среды YPD, руб.
Хлорид калия	0,33	2,50	0,83	–
Фосфат калия однозамещенный	0,50	35,36	17,68	
Сульфат магния	0,23	73,20	16,84	
Меласса	30,0	1,00	30,00	
Вода	до 1000	0,04	40	40
Среды YPD:				
Пептон	20	51,35	–	1027,00
Дрожжевой экстракт	10	64,00		640,00
Глюкоза	20	8,20		164
Итого			105,35	1871,00

Источник данных: собственная разработка.

Таким образом, экономия составит:

$$\Theta = \frac{1871,00}{105,35} = 17,76 \text{ раз.}$$

Заключение. Проведена разработка состава жидкой питательной среды с использованием математического метода полного факторного эксперимента [9]. Факторами, влияющими на суммарное содержание стеринов в биомассе *Saccharomyces sp.* КДП, являлись компоненты питательной среды, а именно меласса и магний серноокислый.

Выявлено, что максимальное содержания мелассы и соли, 30,0 г/дм³ и 0,023 г/дм³ соответственно, в совокупности наиболее благоприятно влияет на стеринобразование исследуемого штамма дрожжей, повышая суммарное содержание стеринов с учетом прироста биомассы.

Таким образом использование мелассы в качестве основы позволяет удешевить стоимость питательной среды в 17,76 раз.

Список использованных источников

1. Соколов, С. С. Транспорт эргостерина в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* : физиологические последствия нарушения биосинтеза и распределения эргостерина / С. С. Соколов [и др.] // БИОХИМИЯ, 2019. – Т. 84. – С. 481–493.
1. Sokolov, S. S. Transport jergosterina v kletkah drozhzhej *Saccharomyces cerevisiae* : fiziologicheskie posledstviya narusheniya biosinteza i raspredelenija jergosterina [Ergosterol transport in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: physiological consequences of impaired ergosterol biosynthesis and distribution] / S. S. Sokolov [i dr.] // BИOИИИИЯ, 2019. – Т. 84. – С. 481–493.
2. Шкуматов, В. М. Трансгенные штаммы микроорганизмов в биосинтезе стероидов / В. М. Шкуматов [и др.] // Химические проблемы создания новых материалов и технологий, 1998. – С. 559–566.
2. Shkumatov, V. M. Transgennyye shtammy mikroorganizmov v biosinteze steroidov [Transgenic strains of microorganisms in steroid biosynthesis] / V. M. Shkumatov [i dr.] // Himicheskie problemy sozdaniya novykh materialov i tehnologij, 1998. – S. 559–566.
3. Ковалёва, В. В. Выделение и идентификация дрожжей, перспективных для применения в биотехнологических производствах / В. В. Ковалёва // Наука – шаг в будущее : тезисы докладов XVI студенческой научно-практической конференции факультета технологии органических веществ, Минск, 30 ноября – 1 декабря 2022 г. – Минск : БГТУ, 2022. – С. 66.
3. Kovaljova, V. V. Vydelenie i identifikacija drozhzhej, perspektivnyh dlja primeneniya v biotehnologicheskikh proizvodstvah [Isolation and identification of yeasts promising for use in biotechnological production] / V. V. Kovaljova // Nauka – shag v budushhee : tezisy dokladov XVI studencheskoj nauchno-prakticheskoy konferencii fakul'teta tehnologii organicheskikh veshhestv, Minsk, 30 nojabrja – 1 dekabrja 2022 g. – Minsk : BGTU, 2022. – S. 66.
4. Квасников, Е. И. Дрожжи : Биология. Пути использования / Е. И. Квасников, И. Ф. Щелокова // АН УССР, Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного. – Киев : Наук. думка, 1991. – 325 с.
4. Kvasnikov, E. I. Drozhzhi : Biologija. Puti ispol'zovanija [Yeast: Biology. Ways to use] / E. I. Kvasnikov, I. F. Shhelokova // AN USSR, In-t mikrobiologii i virusologii im. D. K. Zabolotnogo. – Kiev : Nauk. dumka, 1991. – 325 s.
5. Deak, T. Identification of Foodborne Yeasts / T. Deak and L. R. Beuchat // Journal of Food Protection, 1987. – Vol. 50, № 3. – P. 243–264.
6. Ковалёва, В. В. Выделение стеринов и их производных из биомассы дрожжей, выделенных из окружающей среды / В. В. Ковалёва // 74-я научно-техническая конференция учащихся, студентов и магистрантов: факультета технологии
6. Kovaljova, V. V. Vydelenie sterinov i ih proizvodnyh iz biomassy drozhzhej, vydelennyh iz okruzhajushhej sredy [Isolation of sterols and their derivatives from yeast biomass isolated from the environment] / V. V. Kovaljova // 74-ja nauchno-tehnicheskaja konferencija uchashhihsja, studentov i magistrantov:

- органических веществ, Минск, 18 апреля 2023 г.: тезисы докладов – Минск : БГТУ, 2023. – 223 с.
7. Балагозьян, Э. А. Содержание стерина в сырье крапивы двудомной / Э. А. Балагозьян [и др.] // Химия растительного сырья. – 2016. – №2. – С. 67–71.
8. Общая и экологическая биохимия: структура и функции липидов. Обмен липидов. Нуклеиновые кислоты. Компоненты нуклеиновых кислот : учебно-методическое пособие / Е. А. Докучаева, В. Е. Сяхович, О. Г. Пархимович [и др.] – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 69 с.
9. Гайдадин А. Н. Применение полного факторного эксперимента при проведении исследований. Методические указания / А. Н. Гайдадин, С. А. Ефремова // ВолгГТУ. – Волгоград, 2008. – 16 с.
10. Сальникова, Е. В. Гравиметрический метод количественного анализа : методические указания / Е. В. Сальников. – Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург : ОГУ, 2019.
11. Пермякова, Л. В. Влияние способа обеспечения пивных дрожжей кислородом на синтез стерина / Л. В. Пермякова // Техника и технология пищевых производств. – 2018. – Т. 48, №2. – С. 89–99.
12. Starr, P. R. Some factors affecting sterol formation in *Saccharomyces cerevisiae* / P. R. Starr, L. W. Parks // Journal of Bacteriology. – 1962. – Vol. 83, № 5. – P. 1042–1045.
13. Калинина, И. В. Возможность использования вторичного сырья в качестве питательной среды для синтеза эргостерола дрожжами вида *Saccharomyces cerevisiae* / И. В. Калинина [и др.] // Биохимический и пищевой инжиниринг, Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology. – 2020. – Vol. 8, №4. – P. 59–68.
14. Макарова З. В. Методические указания по курсовому проектированию / З. В. Макарова, Л. Ю. Пшебельская. – Минск : БГТУ, 2007 – 33 с.
- fakul'teta tehnologii organicheskikh veshhestv, Minsk, 18 aprelja 2023 g.: tezisy dokladov – Minsk : BGTU, 2023. – 223 s.
7. Balagozjan, Je. A. Soderzhanie sterinov v syr'e krapivy dvudomnoj [Sterol content in stinging nettle raw material] / Je. A. Balagozjan [i dr.] // Himija rastitel'nogo syr'ja. – 2016. – №2. – S. 67–71.
8. Obshhaja i jekologicheskaja biohimija: struktura i funkcii lipidov. Obmen lipidov. Nukleinovye kisloty. Komponenty nukleinovyx kislot [General and environmental biochemistry: structure and functions of lipids. Lipid metabolism. Nucleic acids. Nucleic acid components] : uchebno-metodicheskoe posobie / E. A. Dokuchaeva, V. E. Sjahovich, O. G. Parhimovich [i dr.] – Minsk : IVC Minfina, 2018. – 69 s.
9. Gajdadin A. N. Primenenie polnogo faktornogo jeksperimenta pri provedenii issledovanij. Metodicheskie ukazanija [Application of full factorial experiment in research. Guidelines] / A. N. Gajdadin, S. A. Efremova // VolgGTU. – Volgograd, 2008. – 16 s.
10. Sal'nikova, E. V. Gravimetricheskij metod kolichestvennogo analiza [Gravimetric method of quantitative analysis] : metodicheskie ukazanija / E. V. Sal'nikov. – Orenburgskij gos. un-t. – Orenburg : OGU, 2019.
11. Permjakova, L. V. Vlijanie sposoba obespechenija pivnyh drozhzhej kislородом na sintez sterinov [The influence of the method of providing brewer's yeast with oxygen on the synthesis of sterols] / L. V. Permjakova // Tehnika i tehnologija pishhevyh proizvodstv. – 2018. – T. 48, №2. – S. 89–99.
13. Kalinina, I. V. Vozmozhnost' ispol'zovanija vtorichnogo syr'ja v kachestve pitatel'noj sredy dlja sinteza jergosterola drozhzhami vida *Saccharomyces cerevisiae* [The possibility of using secondary raw materials as a nutrient medium for the synthesis of ergosterol by yeast of the species *Saccharomyces cerevisiae*] / I. V. Kalinina [i dr.] // Biohimicheskij i pishhevoj inzhiniring, Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology. – 2020. – Vol. 8, №4. – P. 59–68.
14. Makarova Z. V. Metodicheskie ukazanija po kursovomu proektirovaniju [Guidelines for course design] / Z. V. Makarova, L. Ju. Pshebel'skaja. – Minsk : BGTU, 2007 – 33 s.