

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Розробка способу екстракції водорозчинних компонентів із
клітин дріжджів на основі CO₂ екстракції**

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
Коломієць Аліни Андріївни

Допущена до захисту «__»_____20 р.

Завідувач кафедри _____

Науковий керівник:
д.б.н. Божков Анатолій Іванович

Оцінка «_____»

«__»_____20 р.

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

У дипломній роботі досліджено ефективність триетапної технології вилучення водорозчинних біологічно активних компонентів із клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* шляхом суперкритичної CO₂-екстракції з подальшим ферментативним автолізом та автоклавуванням. Обґрунтовано переваги застосування надкритичного діоксиду вуглецю як екологічно безпечного розчинника, що дозволяє здійснювати екстракцію без пошкодження термолабільних сполук.

Робота містить порівняльний аналіз традиційних (водна, органічна, ультразвукова, ферментативна) та сучасних методів екстракції, охоплює фізико-хімічні засади процесу, включно з характеристиками надкритичного CO₂, механізмами масопереносу та впливом технологічних параметрів (тиск, температура, час, швидкість потоку, ко-розчинники) на ефективність процесу.

У теоретичній частині досліджено біохімічні властивості, локалізацію та функціональну значущість водорозчинних компонентів клітин дріжджів (амінокислоти, нуклеотиди, β-глюкани, пептиди, вітаміни групи В тощо). Проведено спектрофотометричний аналіз зразків після кожного етапу, що дозволило встановити приріст вмісту біоактивних речовин та зниження співвідношення 220/260 нм, характерне для вивільнення нуклеїнових кислот. Окрему увагу приділено актуальним науковим прогалинам щодо вилучення гідрофільних сполук із дріжджової біомаси методом CO₂-екстракції. Запропоновано рекомендації щодо подальших досліджень, включно з оптимізацією фазової поведінки, впровадженням in-line моніторингу та математичного моделювання процесу.

Обсяг роботи — 56 сторінок. Містить: 11 таблиць, 7 рисунків. Список використаних джерел — 22.

Ключові слова: CO₂-екстракція, дріжджі, водорозчинні компоненти, надкритичний флюїд, β-глюкани, ко-розчинники, спектрофотометрія, ферментативний автоліз

ABSTRACT

This thesis investigates the efficiency of a three-stage process for the extraction of water-soluble bioactive components from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells using supercritical CO₂ extraction followed by enzymatic autolysis and autoclaving. The advantages of using supercritical carbon dioxide as an environmentally friendly solvent are justified, as it enables the extraction of thermolabile compounds while preserving their biological activity.

The paper provides a comparative analysis of conventional (aqueous, organic, ultrasonic, enzymatic) and modern extraction methods, outlining the physicochemical principles of the process, properties of supercritical CO₂, mass transfer mechanisms, and the impact of technological parameters (pressure, temperature, time, flow rate, and co-solvents) on extraction efficiency.

The theoretical section explores the biochemical properties, intracellular localization, and functional significance of water-soluble yeast cell components (amino acids, nucleotides, β -glucans, peptides, and B-group vitamins). Spectrophotometric analysis of samples from each extraction stage revealed increased concentrations of bioactive compounds and a progressive decrease in the 220/260 nm absorption ratio, indicating nucleic acid release.

Particular attention is given to current research gaps in the use of supercritical CO₂ for hydrophilic compound extraction from yeast biomass. The study proposes directions for further research, including optimization of phase behavior, implementation of in-line analytical monitoring, and process modeling.

The thesis comprises 56 pages, includes 11 tables, 7 figures, and references 22 scientific sources.

Keywords: CO₂ extraction, yeast, water-soluble components, supercritical fluid, β -glucans, co-solvents, spectrophotometry, enzymatic autolysis.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Актуальність CO ₂ екстракції у сучасній науці	9
1.2. Фізико-хімічні основи CO ₂ екстракції	11
1.3. Біологічні особливості водорозчинних компонентів клітин дріжджів ...	15
1.4. Переваги CO ₂ екстракції для вилучення водорозчинних компонентів ...	18
1.5. Методи екстракції водорозчинних компонентів із дріжджів.....	21
1.6. Вплив параметрів CO ₂ екстракції на ефективність процесу.....	24
1.7. Застосування водорозчинних компонентів, отриманих із дріжджів.....	28
1.8. Прогалини у сучасних дослідженнях.....	31
Висновки до літературного огляду.....	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	37
2.1 Теоретичне обґрунтування методу вилучення водорозчинних компонентів з дріжджів.....	37
2.1.1 Характеристика клітин дріжджів як джерела водорозчинних компонентів.....	37
2.1.2 Обґрунтування вибору технології: СФЕ, автоліз та автоклавування.....	38
2.2. Власне експериментальне дослідження.....	40

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	43
3.1 Теоретична частина 3.....	43
3.1.1 Біохімічна природа водорозчинних компонентів клітин дріжджів.....	43
3.1.2 Технологічне та ферментативне обґрунтування серії обробок біомаси дріжджів.....	44
3.2 Оцінка результатів власних досліджень	46
3.2.1 Вихід водорозчинних компонентів залежно від тиску CO ₂ -екстракції..	47
3.2.2 Вплив автолізу та автоклавування на загальний вихід ВРК.....	48
3.2.3 Спектрофотометричний аналіз екстрактів.....	49
ВИСНОВКИ.....	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	54

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Позначення	Розшифровка / Пояснення
CO ₂	Діоксид вуглецю (вуглекислий газ)
НК-CO ₂	Надкритичний діоксид вуглецю
СФЕ	Суперкритична флюїдна екстракція
T _c	Критична температура речовини
P _c	Критичний тиск речовини
ρ _c	Критична густина
АТР	Аденозинтрифосфат
NAD ⁺ / NADP ⁺	Нікотинамідаденіндинуклеотид (фосфат) — коферменти
TLR	Toll-подібні рецептори
NF-κB	Ядерний фактор каппа-Б — сигнальний шлях
MAPK	Мітоген-активовані протеїнкінази
ROS	Активні форми кисню (Reactive Oxygen Species)
B1–B9	Вітаміни групи В
GMP / AMP / CMP	Гуанозин-, аденозин-, цитидинмонофосфат — нуклеотиди
EOS	Equation of State — рівняння стану
Dectin-1	Рецептор на поверхні імунних клітин
FTIR, UV-Vis	Спектроскопічні методи аналізу
БАД	Біологічно активні добавки
β-глюкани	Полісахариди клітинної стінки дріжджів

ВСТУП

У сучасній науково-технічній сфері одним із пріоритетних напрямів є виділення цінних водорозчинних компонентів із клітин живих організмів, таких як дріжджі. Ці компоненти — білки, полісахариди, нуклеотиди, амінокислоти, вітаміни — мають важливе значення для харчової промисловості, фармацевтики, а також для розробки функціональних харчових добавок і біологічно активних речовин. Традиційні методи екстракції, які використовують воду або органічні розчинники, часто є обмеженими через низьку селективність, тривалість процесу, застосування токсичних реагентів та складність очищення кінцевих продуктів.

У цьому контексті технологія CO₂-екстракції стає перспективним інструментом, оскільки вона базується на застосуванні надкритичного вуглекислого газу, який поєднує високу розчинність із екологічною безпечністю і можливістю точного контролю параметрів процесу. CO₂-екстракція дозволяє зберегти біологічну активність компонентів та отримувати високоякісні екстракти без залишків токсичних розчинників. Проте ефективність цього методу значною мірою залежить від складності субстрату, а саме клітинної структури дріжджів, а також від фізико-хімічних параметрів процесу, які потребують детального дослідження[6].

Незважаючи на численні публікації, в сучасній науковій літературі відсутні систематичні комплексні дослідження, які б повністю охоплювали всі складові, CO₂-екстракції водорозчинних компонентів із клітин дріжджів — від фізико-хімічних властивостей екстрактів до їх потенційного застосування в харчовій, фармацевтичній та суміжних галузях. Вивчення цього питання відкриває широкі можливості для оптимізації технологічних процесів, підвищення якості продукції та зниження екологічного навантаження.

Метою даної дипломної роботи є розробка ефективного методу екстракції водорозчинних компонентів із клітин дріжджів із використанням CO₂-екстракції, визначення фізико-хімічних властивостей отриманих речовин

та оцінка їх потенціалу для застосування у харчовій промисловості, фармацевтиці та суміжних галузях.

Для досягнення поставленої мети передбачається виконати такі завдання:

1. Провести огляд сучасних методів екстракції водорозчинних компонентів із біологічних матеріалів, зокрема дріжджів.
2. Вивчити принципи CO₂-екстракції, її переваги порівняно з традиційними методами вилучення біологічно активних речовин.
3. Дослідити склад і фізико-хімічні властивості водорозчинних компонентів клітин дріжджів, які можуть бути екстраговані за допомогою CO₂-екстракції.
4. Оцінити біологічну активність і функціональні властивості отриманих екстрактів.
5. Розробити рекомендації щодо масштабування процесу CO₂-екстракції для промислового застосування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Актуальність CO₂ екстракції у сучасній науці

У XXI столітті питання екологічності, енергоефективності та біосумісності технологічних процесів набули ключового значення для розвитку харчової, фармацевтичної та біотехнологічної промисловості. Це зумовлено не лише посиленням законодавчих норм щодо захисту довкілля, а й зростаючим суспільним запитом на безпечні та екологічно чисті продукти. Відповідно, інноваційні методи екстракції біологічно активних речовин, які дозволяють зберігати природну структуру сполук та мінімізувати використання шкідливих реагентів, стали пріоритетним напрямом у технологічних розробках. Серед таких рішень особливе місце займає суперкритична екстракція з використанням діоксиду вуглецю (CO₂).

Надкритичний CO₂, завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям, проявляє високу ефективність як універсальний розчинник для вилучення як ліпофільних, так і певних груп гідрофільних речовин. Використання цього методу дозволяє уникнути низки проблем, властивих класичним екстракційним процесам: термічна деградація біомолекул, наявність токсичних залишків органічних розчинників у продуктах та значні енерговитрати. Надкритичний CO₂ дозволяє проводити екстракцію за м'яких температурних умов, що зберігає біоактивність чутливих до тепла сполук, і, водночас, забезпечує високий ступінь вилучення цільових компонентів за рахунок регулювання тиску та температури[19].

Особливої актуальності суперкритична екстракція набуває при роботі з мікроорганізмами, зокрема дріжджами, які є цінним джерелом нутрієнтів: амінокислот, вітамінів, нуклеотидів, полісахаридів та інших водорозчинних метаболітів. Використання дріжджових клітин як біосировини вимагає делікатного підходу до руйнування їх клітинної стінки та вилучення внутрішньоклітинного вмісту. Класичні методи (гідротермічна обробка, механічна деструкція, хімічний лізис) супроводжуються високими

енерговитратами, утворенням небажаних побічних продуктів, а також ризиком втрати біоактивності екстрагованих речовин. Натомість застосування надкритичного CO_2 дозволяє здійснювати вибірккову екстракцію без руйнування термолабільних сполук, мінімізуючи вплив агресивних фізико-хімічних чинників. У порівнянні з іншими екстракційними підходами суперкритична CO_2 -екстракція демонструє переваги за такими критеріями, як енергоспоживання, токсичність, вибіркковість та збереження біоактивності компонентів. Порівняльні характеристики трьох основних методів — водної, органічної та надкритичної екстракції наведено у (табл 1.1.)

Важливим фактором є також екологічна складова. Суперкритична CO_2 екстракція повністю відповідає принципам «зеленої хімії», сформульованих Американським хімічним товариством: мінімізація токсичності розчинників, зниження утворення побічних продуктів, енергозбереження та повторне використання CO_2 як відновлюваного ресурсу. Діоксид вуглецю, що використовується у процесі, є побічним продуктом промислових циклів, і його залучення в замкнений екстракційний процес сприяє зниженню вуглецевого сліду та вписується у концепцію циркулярної економіки[18].

Разом з тим, CO_2 після завершення екстракції легко видаляється з кінцевого продукту без залишкових слідів, що є принципово важливим для фармацевтичного та харчового застосування, де чистота екстрактів є критичною вимогою. Це значно спрощує етапи постекстракційного очищення, знижуючи витрати на додаткові технологічні операції.

Важливим є також економічна складова. Попри високі капітальні витрати на встановлення обладнання для суперкритичної екстракції, експлуатаційні витрати залишаються низькими завдяки багаторазовому використанню CO_2 , мінімальним енерговитратам та відсутності необхідності у дорогих органічних розчинниках. Зниження енерговитрат пов'язане з м'яким температурним режимом, що значно вигідніше у довгостроковій перспективі порівняно з традиційними методами екстракції.

Порівняльні характеристики екстракційних методів

Критерій	CO₂-екстракція	Водна екстракція	Екстракція органічними розчинниками
Температура процесу	31–45 °C	70–100 °C	60–120 °C
Вибірковість	Висока	Низька	Середня
Вплив на біоактивність	Мінімальний	Середній	Високий
Токсичність розчинника	Відсутня	Відсутня	Висока
Екологічна безпека	Висока	Висока	Низька
Витрати енергії	Низькі	Високі	Високі
Необхідність очищення	Мінімальна	Висока	Висока

З наведеної таблиці очевидно, що надкритична CO₂ екстракція суттєво переважає традиційні методи за низкою критичних показників: температурний режим, збереження біоактивності, екологічна безпечність та мінімальні витрати на подальше очищення продукту. Це робить метод одним із найефективніших інструментів сучасної біотехнології, особливо для вилучення цінних водорозчинних компонентів із клітин дріжджів.

Отже, актуальність досліджень у напрямі розробки та вдосконалення технологій надкритичної CO₂ екстракції для біологічно активних речовин обумовлена одночасно науковими, технологічними, екологічними та економічними факторами. Цей метод дозволяє не лише підвищити ефективність вилучення цільових компонентів, але й забезпечити відповідність сучасним вимогам сталого розвитку, відкриваючи нові можливості для виробництва високоякісних біопрепаратів.

1.2. Фізико-хімічні основи CO₂ екстракції

CO₂ екстракція є сучасною фізико-хімічною технологією, яка базується на використанні діоксиду вуглецю у надкритичному стані. Цей метод відрізняється високою ефективністю, селективністю та екологічною

безпечністю, що зумовлює його широке впровадження в біотехнології, фармації, харчовій і хімічній промисловості. Фундамент CO_2 екстракції полягає в унікальних властивостях CO_2 , який при певному тиску та температурі переходить у надкритичну фазу, поєднуючи ознаки як рідини, так і газу.

У надкритичному стані CO_2 проявляє високу розчинну здатність щодо органічних речовин, подібну до рідини, та водночас має низьку в'язкість і високу дифузійну здатність, характерні для газів. Це дозволяє йому проникати в мікроструктури біологічної сировини й вилучати цільові речовини навіть із щільних матриць. Особливо актуальним це є під час екстракції з клітин дріжджів, де необхідно дістати водорозчинні метаболіти та інші нутрієнти, не руйнуючи їх хімічну структуру[21].

Фізико-хімічні параметри, за яких CO_2 переходить у надкритичний стан, є визначальними для проектування та контролю екстракційного процесу. Основні критичні характеристики діоксиду вуглецю наведено у (табл 1.2.)

Табл.1.2

Критичні параметри діоксиду вуглецю (CO_2)

Параметр	Позначення	Значення	Одиниці виміру
Визначальна температура	T_c	31,1	$^{\circ}\text{C}$
Визначальний тиск	P_c	7,38	МПа
Визначальна густина	P_c	468	кг/м^3
Температура кипіння	—	-78,5	$^{\circ}\text{C}$

Розчинність речовин у надкритичному CO_2 залежить від температури, тиску, полярності цільової сполуки та наявності ко-солвентів. При підвищенні тиску густина CO_2 зростає, що збільшує його розчинну здатність. Навпаки, підвищення температури знижує густину, але може покращити масоперенос і селективність, особливо для менш полярних речовин. Для водорозчинних компонентів клітин дріжджів (амінокислоти, нуклеотиди, вітаміни групи В) зазвичай використовують модифіковані CO_2 системи з додаванням невеликих кількостей етанолу або води, які підвищують полярність середовища.

При екстракції гідрофільних компонентів важливим є явище сольватації, яке виникає при додаванні ко-солвентів. Молекули етанолу або води утворюють навколо цільових речовин гідратні або сольватні оболонки, полегшуючи їх перехід у надкритичну фазу. Це особливо актуально для вилучення полісахаридів, вітамінів групи В та нуклеотидів з клітин дріжджів, структура яких чутлива до температурних навантажень[7].

На практиці процес суперкритичної CO_2 екстракції включає кілька етапів. Спочатку відбувається підготовка сировини (сушіння, подрібнення), після чого її завантажують у екстрактор. Далі діоксид вуглецю у зрідженому стані подається в екстрактор під тиском понад 7,38 МПа та нагрівається до температури вище 31,1 °С. У цих умовах CO_2 набуває надкритичного стану та починає розчиняти цільові речовини. Після проходження через матрицю екстракт надходить до сепаратора, де за зниженого тиску CO_2 повертається в газоподібний стан, залишаючи екстраговані речовини в окремому резервуарі. Газ повторно конденсується та рециркулює у систему.

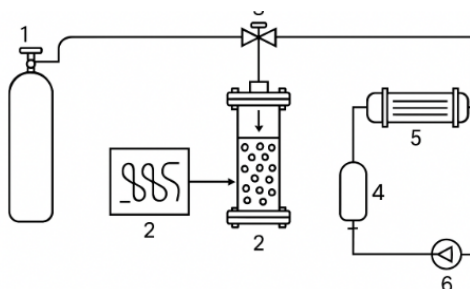


Рис1.2. – Принципова структура установки CO_2 екстракції:

Де: 1- Балон CO_2 або компресор. 2-Теплообмінник (нагрівач). 3- Екстрактор (камери з сировиною). 4- Сепаратор. 5- Конденсатор і ресивер. 6- Циркуляційна система.

У цьому процесі важливими є термодинамічні параметри, зокрема рівновага між фазами та коефіцієнти розподілу речовин між фазою CO_2 та біологічною матрицею. Зміна температури і тиску дозволяє впливати на селективність вилучення. Наприклад, при тиску 20–30 МПа та температурі 45–50 °С відбувається ефективна екстракція жиророзчинних сполук, тоді як для гідрофільних компонентів застосовується тиск до 35 МПа з ко-солвентом. Це

забезпечує оптимальні умови для вилучення речовин із різною полярністю, мінімізуючи їх деградацію.

Особливістю суперкритичної CO_2 екстракції є високий коефіцієнт дифузії CO_2 у твердих біоматрицях, що значно перевищує аналогічні показники для рідин. Це прискорює процес масопереносу та дозволяє скорочувати тривалість екстракції без зниження ефективності. Водночас, завдяки низькій в'язкості надкритичного CO_2 , тиск всередині матриці вирівнюється рівномірно, що сприяє розпушенню клітинної стінки дріжджів та полегшує вихід внутрішньоклітинного вмісту.

Порівняно з альтернативними методами, такими як ультразвукова або ферментативна екстракція, CO_2 екстракція забезпечує більш м'який режим вилучення цільових речовин. Ультразвукова екстракція базується на ефекті кавітації, який супроводжується локальними зонами високих температур і тиску, що може пошкоджувати термолабільні сполуки. Ферментативна екстракція передбачає використання специфічних ферментів для руйнування клітинної стінки, однак потребує ретельної оптимізації умов та має обмеження щодо швидкості процесу. Натомість суперкритичний CO_2 дозволяє здійснювати екстракцію без хімічного або термічного стресу для цільових молекул, зберігаючи їх функціональні властивості[3].

З метою підвищення ефективності процесу, у сучасних дослідженнях застосовують математичне моделювання фазових рівноваг та масопереносу у системі CO_2 –біоматеріал. Використання рівнянь стану (EOS), таких як Peng–Robinson або Soave–Redlich–Kwong, дозволяє прогнозувати розчинну здатність CO_2 за різних температурно-тискових режимів. Такі підходи дають змогу оптимізувати параметри процесу без необхідності проведення численних експериментів.

Разом з тим технологічних переваг, суперкритична CO_2 екстракція є енергоефективною технологією. Завдяки м'яким температурним режимам (31–50 °C) знижуються витрати енергії на нагрівання системи, а замкнутий цикл використання CO_2 мінімізує витрати на сировину. Відсутність токсичних

органічних розчинників спрощує етапи очищення продукту та знижує екологічне навантаження виробництва.

Таким чином, CO₂ екстракція базується на фізико-хімічному принципі зміни розчинної здатності CO₂ залежно від зовнішніх умов. Її успішне застосування можливе завдяки точному контролю параметрів процесу, що дозволяє вибірково виділяти біологічно активні речовини з клітин дріжджів та інших складних біологічних структур.

1.3. Біологічні особливості водорозчинних компонентів клітин дріжджів

Клітини дріжджів, зокрема виду *Saccharomyces cerevisiae*, є унікальними біохімічними фабриками, що містять широкий спектр водорозчинних біоактивних сполук. Ці компоненти не лише підтримують життєдіяльність самих дріжджових клітин, але й становлять значну цінність для біотехнології, фармакології, косметології та харчової промисловості. До їх складу належать вільні амінокислоти, коротколанцюгові пептиди, нуклеотиди, нуклеозиди, вітаміни групи В, коферменти й інші низькомолекулярні метаболіти, що здебільшого є розчинними у воді та легко піддаються біохімічному аналізу.

Біологічна активність водорозчинних речовин пов'язана з їх роллю в основних метаболічних шляхах. Наприклад, амінокислоти беруть участь у біосинтезі білків та є попередниками багатьох вторинних метаболітів. Особливо важливими є такі амінокислоти, як глютамінова кислота, аргінін, лізин та метіонін, які виступають у ролі регуляторів азотного обміну. Після автолізу клітин також утворюються короткі пептиди, які мають протизапальну, імуномодулюючу та антиоксидантну дію.

Водорозчинні нуклеотиди й нуклеозиди, зокрема АТФ, ГТФ, аденозин і гуанозин, виконують енергетичну та регуляторну функцію. Вони забезпечують енергетичні потреби клітини, слугують сигналами в процесах передачі інформації та беруть участь у синтезі нуклеїнових кислот. Особливо цінними є вільні форми нуклеотидів, які зберігають активність після екстракції та мають стимулювальний вплив на метаболізм людини або тварини[9].

Окрему групу становлять водорозчинні вітаміни групи В, що синтезуються дріжджами або накопичуються в клітинах. Найбільш характерними для *S. cerevisiae* є тіамін (В₁), рибофлавін (В₂), ніацин (В₃), піридоксин (В₆), фолієва кислота (В₉) та біотин (В₇). Вони виконують коферментні функції у складі ферментів, регулюють вуглеводний, ліпідний та амінокислотний обміни. Їхня природна біодоступність і високий ступінь розчинності у воді дозволяють використовувати дріжджові екстракти як натуральні добавки до продуктів харчування або біологічно активні речовини у фармакології.

Серед інших водорозчинних сполук важливе місце займають коферменти — NAD⁺, NADP⁺, кофермент А. Вони є ключовими у реакціях біоокислення, дегідрування, а також у синтезі жирних кислот та стеролів. Завдяки своїй гідрофільній природі, ці молекули добре вивільняються з клітинної матриці при обґрунтованому виборі екстракційного середовища, зокрема в умовах суперкритичної СО₂ екстракції з використанням модифікаторів (ко-солвентів), таких як етанол або вода[14].

Водорозчинні компоненти клітин дріжджів переважно локалізуються в цитоплазмі, а також у вакуолях, де можуть зберігатися у вільному або зв'язаному з білками стані. Деякі вітаміни та нуклеотиди тимчасово зв'язуються з ферментними комплексами, що обумовлює необхідність делікатного підходу до їх вилучення. Просте механічне руйнування або термічне лізування клітин може призвести до втрати активності або руйнування структури цих сполук. Суперкритична СО₂ екстракція дозволяє здійснювати проникнення в клітину без нагріву, тим самим зберігаючи функціональну цілісність компонентів.

Для систематизації складу, локалізації та функціонального значення водорозчинних компонентів клітин дріжджів у контексті екстракційної біотехнології було складено (табл 3.1.) Вона узагальнює ключові класи сполук, їх типових представників, внутрішньоклітинне розташування та біологічну роль.

Табл.3.1.

Класифікація та функціональна характеристика водорозчинних компонентів
клітин дріжджів

Клас сполук	Типові представники	Основна локалізація	Біологічна функція
Амінокислоти	Глутамінова кислота, аргінін, лізин, метіонін	Цитозоль, вакуолі	Субстрати білкового синтезу, донори азоту, антиоксиданти
Пептиди	Біоактивні коротколанцюгові фрагменти білків	Цитозоль, частково вакуолі	Імуномодульовальна дія, регуляція ферментативної активності, хелатування металів
Нуклеотиди	АТФ, АДФ, ГТФ, ЦТФ	Цитозоль	Енергетичне забезпечення клітини, участь у сигнальних шляхах
Нуклеозиди	Аденозин, гуанозин	Цитозоль	Попередники нуклеотидів, модуляція фізіологічних реакцій
Вітаміни групи В	Тіамін (В ₁), рибофлавін (В ₂), ніацин (В ₃), піридоксин (В ₆), фолієва кислота (В ₉), біотин (В ₇)	Цитозоль, вакуолі	Коферменти метаболічних реакцій, підтримка нейрометаболізму, антистресова дія
Коферменти	NAD ⁺ , NADP ⁺ , кофермент А	Цитозоль, мітохондрії	Окисно-відновні процеси, каталітичні реакції циклу Кребса, транспортування ацильних груп
Поліаміни та інші метаболіти	Спермідин, спермін, глутатіон, орнітин	Цитозоль, частково ядро	Захист від оксидативного стресу, регуляція росту, стабілізація РНК та білків

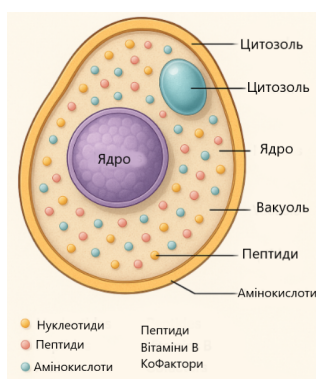


Рис1.3 Просторове розташування водорозчинних компонентів у клітині дріжджів

Як видно зі схеми, більшість водорозчинних сполук зосереджені у цитоплазмі, тоді як деякі нуклеотиди, пептиди та вітаміни можуть накопичуватись у вакуолях або бути пов'язаними з внутрішньоклітинними структурами. Це впливає на вибір методу екстракції: для водорозчинних метаболітів найкраще підходять технології, що забезпечують як проникнення вглиб клітини, так і збереження хімічної стабільності речовин.

Вивчення біологічних особливостей водорозчинних компонентів клітин дріжджів є важливим етапом у розробці ефективної технології їх вилучення за допомогою екологічно безпечних методів, зокрема надкритичної CO_2 екстракції. Знання структури, локалізації й ролі цих речовин дозволяє точніше підібрати умови екстрагування, забезпечити високу якість кінцевого продукту та зберегти біологічну активність функціональних молекул.

1.4. Переваги CO_2 екстракції для вилучення водорозчинних компонентів

Суперкритична екстракція за допомогою діоксиду вуглецю (CO_2) є перспективним і прогресивним методом вилучення водорозчинних компонентів із клітин дріжджів, який набув широкого застосування у сучасній науці та промисловості завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям. Основною перевагою цього методу є використання CO_2 у суперкритичному стані, який досягається при температурі вище $31,1\text{ }^\circ\text{C}$ і тиску понад 73,8 бар. У цьому стані CO_2 набуває властивостей як газу, так і рідини — низької в'язкості та високої дифузійної здатності, що забезпечує глибоке

проникнення у клітинну структуру та високу розчинність цільових речовин. Завдяки цим параметрам CO₂ ефективно витягує водорозчинні компоненти, зберігаючи їхню біологічну активність, що є суттєвою перевагою над традиційними методами екстракції, що часто передбачають високі температури або використання токсичних органічних розчинників, здатних пошкоджувати структуру біомолекул[8].

У процесі CO₂-екстракції температура контролюється на рівні, достатньому для підтримання суперкритичного стану, але низькому, аби запобігти термічній деструкції чутливих до тепла компонентів — вітамінів, амінокислот, нуклеотидів та полісахаридів. Тиск у камері екстракції регулюється для оптимізації розчинності та селективності вилучення, що дозволяє виділяти конкретні групи речовин без змішування з небажаними домішками. Дифузійна проникність CO₂ у суперкритичному стані також сприяє ефективнішому руйнуванню клітинних стінок дріжджів, розкриваючи внутрішньоклітинний вміст для подальшого вилучення.

Важлива складова, є можливість модифікації розчинних властивостей CO₂ шляхом додавання невеликих кількостей полярних ко-розчинників, наприклад, етанолу або води. Це розширює спектр екстрагованих водорозчинних компонентів, зокрема полісахаридів, нуклеотидів, амінокислот, і дозволяє адаптувати процес під конкретні цілі дослідження чи виробництва. З екологічної точки зору CO₂ є абсолютно безпечним, нетоксичним і не накопичується в середовищі, а після завершення екстракції легко відділяється від продукту за рахунок зниження тиску, не залишаючи шкідливих залишків. Це робить метод екологічно чистим і сумісним із принципами зеленої хімії[17].

Економічна доцільність застосування CO₂ екстракції полягає в тому, що, хоча обладнання для суперкритичної екстракції вимагає значних капіталовкладень, експлуатаційні витрати мінімізуються завдяки багаторазовому використанню CO₂, відсутності необхідності в дорогих і токсичних розчинниках, а також меншій енергомісткості процесу у порівнянні

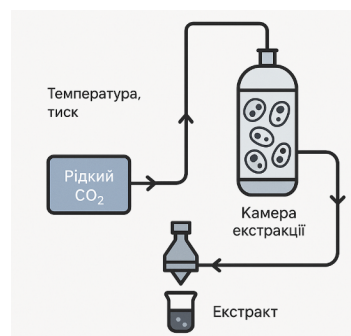
з традиційними методами, які потребують високих температур і тривалого часу обробки. Збереження біологічної активності компонентів також зменшує потребу в додаткових етапах очищення або стабілізації продукту.

Порівняння основних характеристик суперкритичної CO₂ екстракції з традиційними методами, такими як водна екстракція та використання органічних розчинників, наведено у (табл 1.4.) Ці дані ілюструють переваги CO₂-технології за ключовими критеріями — температурний режим, вплив на біоактивність, екологічна безпека та енерговитрати.

Табл1.4.

Порівняння ключових характеристик суперкритичної CO₂ екстракції з традиційними методами вилучення водорозчинних компонентів.

Критерій	CO ₂ -екстракція	Водна екстракція	Екстракція органічними розчинниками
Температура процесу	31–45 °C	70–100 °C	60–120 °C
Вибірковість	Висока	Низька	Середня
Вплив на біоактивність	Мінімальний	Середній	Високий
Токсичність розчинника	Відсутня	Відсутня	Висока
Екологічна безпека	Висока	Висока	Низька
Витрати енергії	Низькі	Високі	Високі
Необхідність очищення	Мінімальна	Висока	Висока

Рис1.4. Процес CO₂ екстракції виглядає наступним чином

У наведеній схемі показані основні етапи: подача рідкого CO₂ у камеру екстракції, де при контрольованих температурі та тиску він переходить у суперкритичний стан і проникає у клітини дріжджів, розчиняючи водорозчинні компоненти. Після насичення розчином суміш надходить у сепаратор, де зміна тиску призводить до осадження екстракту, а CO₂ повертається у початковий резервуар для повторного використання.

Отже, застосування суперкритичної CO₂ екстракції для вилучення водорозчинних компонентів із дріжджових клітин є сучасним, екологічно безпечним і ефективним методом, який забезпечує високу селективність, збереження біоактивності, а також оптимізацію витрат і мінімізацію екологічного навантаження, що робить його незамінним у сучасній біотехнології та фармацевтичній промисловості.

1.5. Методи екстракції водорозчинних компонентів із дріжджів

Методи екстракції водорозчинних компонентів із клітин дріжджів є ключовим етапом у біотехнологічних процесах, які спрямовані на отримання біологічно активних речовин, таких як амінокислоти, нуклеотиди, полісахариди, вітаміни та інші метаболіти. Існує кілька основних методів екстракції, кожен із яких має свої особливості, переваги та обмеження, що визначають їх застосування в залежності від кінцевої мети та характеристик цільових компонентів. До традиційних методів належать гаряча водна екстракція, механічне руйнування клітин із подальшим вилученням, а також використання органічних розчинників. Останнім часом набувають популярності більш сучасні технології, зокрема ультразвукова, ферментативна та суперкритична екстракція, які значно підвищують ефективність і селективність процесу.

Гаряча водна екстракція є одним із найпростіших і найпоширеніших способів вилучення водорозчинних компонентів із дріжджів. Вона базується на нагріванні біомаси у воді до температур, що сприяють розчиненню внутрішньоклітинних речовин. Однак високі температури (зазвичай 70–100

°C) можуть спричиняти часткову денатурацію білків та руйнування термолабільних сполук, що знижує якість кінцевого продукту. Водночас того, цей метод часто потребує тривалого часу обробки та додаткових етапів очищення для видалення домішок. Механічні методи, такі як гомогенізація, ультразвукове руйнування або мікробарботажи, спрямовані на руйнування клітинної стінки, що покращує доступ екстрагенту до внутрішньоклітинного вмісту. Вони часто комбінуються з водною екстракцією для підвищення виходу цільових компонентів[11].

Використання органічних розчинників, таких як метанол, етанол або ацетон, дозволяє вилучати широкий спектр водорозчинних і слаболужних сполук із високою селективністю. Проте цей підхід пов'язаний із ризиком токсичності залишків розчинника у кінцевому продукті, а також з екологічними проблемами, що обмежує їх застосування в харчовій і фармацевтичній промисловості. Ультразвукова екстракція ґрунтується на використанні акустичних хвиль високої частоти, які викликають кавітацію – утворення мікропухирців у рідині, що сприяє інтенсивному руйнуванню клітинної стінки та полегшує вивільнення водорозчинних речовин. Цей метод відзначається коротким часом обробки та підвищеним виходом біоактивних сполук, зберігаючи їх біологічну активність.

Ферментативна екстракція є одним із найбільш селективних методів, що використовує специфічні ферменти (наприклад, лізоцим, целюлазу, пектиназу) для м'якого розчинення або розщеплення клітинної стінки дріжджів. Вона забезпечує високий вихід і збереження структури та функціональності екстрагованих компонентів, однак потребує оптимізації параметрів реакції, включно з температурою, рН та часом обробки, що впливає на вартість і масштабованість процесу[20].

Особливої уваги заслуговує суперкритична екстракція із використанням діоксиду вуглецю, яка поєднує переваги фізико-хімічної селективності, екологічності та м'якого режиму вилучення. Цей метод дозволяє витягувати цінні водорозчинні компоненти без застосування високих температур і

шкідливих розчинників, що забезпечує збереження їх біологічної активності та мінімізує забруднення продукту. разом з тим , суперкритичний CO₂ можна модифікувати за допомогою ко-розчинників для розширення спектру вилучуваних речовин[15].

Для наочного порівняння ключових параметрів різних методів екстракції водорозчинних компонентів із клітин дріжджів — зокрема температурного режиму, тривалості, екологічності, впливу на біоактивність і якості кінцевого продукту — узагальнені дані наведено в (табл 1.5.)

Табл.1.5.

Порівняльний аналіз основних методів екстракції водорозчинних компонентів із дріжджів за ключовими параметрами

Метод екстракції	Температура, °C	Час, хвилин	Вплив на активність	Екологічність	Вартість	Якість продукту
Гаряча водна екстракція	70–100	30–120	Середній	Висока	Низька	Середня
Органічні розчинники	60–120	30–90	Низький	Низька	Середня	Висока
Ультразвук ова екстракція	30–50	10–30	Високий	Висока	Середня	Висока
Ферментативна екстракція	30–40	60–180	Високий	Висока	Висока	Висока
Суперкритична CO ₂ екстракція	31–45	30–60	Дуже високий	Дуже висока	Середня	Дуже висока

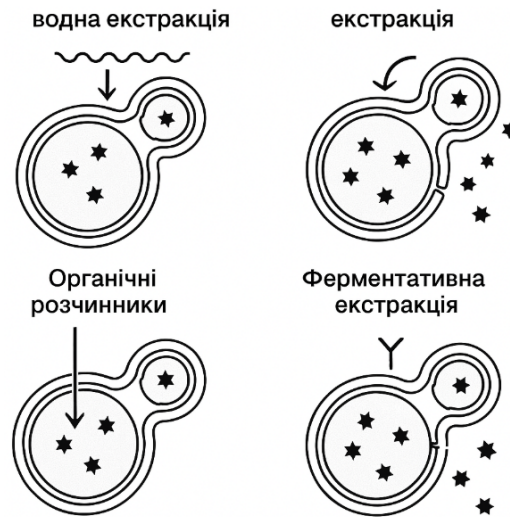


Рис1.5. Процеси руйнування клітин та вилучення водорозчинних компонентів

Таким чином, вибір методу екстракції водорозчинних компонентів із дріжджів залежить від необхідного ступеня селективності, збереження біологічної активності, екологічних елементів і економічної доцільності. Сучасні тенденції спрямовані на комбінацію методів із використанням інноваційних технологій, зокрема ультразвукової та суперкритичної екстракції, що дозволяє максимізувати вихід і якість продукту при мінімальному впливі на навколишнє середовище.

1.6. Вплив параметрів CO_2 екстракції на ефективність процесу

Параметри CO_2 екстракції відіграють вирішальну функцію у процесі вилучення водорозчинних компонентів із клітин дріжджів, визначаючи не лише ефективність вилучення, але й якість, стабільність та біологічну активність кінцевого продукту. Розуміння фізико-хімічних та біофізичних елементів впливу таких параметрів, як тиск, температура, час екстракції, швидкість потоку CO_2 та застосування ко-розчинників, дозволяє оптимізувати процес для досягнення максимальної продуктивності та селективності.

Тиск є одним із ключових параметрів, що визначає розчинність речовин у суперкритичному CO_2 . При тисках нижче критичного (7,38 МПа або 73,8 бар) CO_2 перебуває у газоподібному стані з низькою розчинною здатністю.

Перехід у суперкритичний стан при перевищенні критичних значень тиску і температури (31,1 °C) сприяє значному підвищенню густини CO₂ (приблизно до 0,3–0,8 г/см³), що збільшує його здатність розчиняти як неполярні, так і частково полярні сполуки. При підвищенні тиску густина CO₂ зростає, що призводить до збільшення розчинної здатності і, відповідно, вищої ефективності вилучення водорозчинних компонентів. Однак із зростанням тиску може спостерігатися зниження селективності, оскільки підвищена густина CO₂ сприяє екстракції більш широкого спектру сполук, включаючи небажані домішки. Додатково, високі тиски викликають підвищені енергетичні витрати на підтримку та створення необхідних умов у технологічному обладнанні, що обмежує практичне застосування надвисоких тисків у промислових масштабах[2].

Температура в процесі CO₂ екстракції має подвійний вплив. З одного боку, підвищення температури знижує густину CO₂, що може призвести до зниження розчинності сполук. З іншого боку, температура впливає на кінетику масообміну, прискорюючи дифузію і полегшуючи руйнування клітинних структур. Оптимальні температурні умови для екстракції водорозчинних компонентів зазвичай знаходяться в межах від 31 °C (критична температура CO₂) до приблизно 45 °C, що дозволяє зберігати термолабільні речовини від руйнування і водночас підтримувати високу ефективність розчинення. При температурах понад 45–50 °C збільшується ризик деградації біологічно активних молекул, таких як білки, нуклеїнові кислоти, вітаміни та полісахариди, що негативно позначається на якісних характеристиках екстракту.

Час екстракції визначає ступінь контакту біомаси з екстрагентом і є важливим фактором, що впливає на повноту вилучення цільових сполук. Короткий час екстракції призводить до неповного вилучення, оскільки дифузія компонентів із внутрішніх структур клітини до поверхні біомаси і їх перенесення в суперкритичний CO₂ є процесом, що потребує часу. Надмірне подовження часу, з іншого боку, веде до зростання витрат, а також може

спровокувати окислювальні або гідролітичні реакції, які погіршують якість екстракту. Тому час екстракції вибирають експериментально, балансуючи між максимальним виходом речовин і збереженням їх стабільності[4].

Швидкість потоку CO_2 безпосередньо впливає на інтенсивність масообміну. Висока швидкість потоку забезпечує ефективну заміну насиченого CO_2 на свіжий, що підтримує концентраційний градієнт для дифузії компонентів. Проте надто великий потік може зменшувати час контакту між CO_2 і біомасою, що обмежує повноту вилучення. Занизька швидкість, навпаки, уповільнює процес і знижує продуктивність, що збільшує собівартість. Оптимальний баланс забезпечує максимальне вилучення за мінімальних ресурсних затрат.

Використання ко-розчинників, таких як спирти (етанол, метанол), часто застосовується для підвищення розчинності полярних водорозчинних компонентів, які слабо розчинні у чистому CO_2 через його неполярний характер. Невеликі кількості ко-розчинників змінюють полярність системи, розширюючи спектр вилучених речовин та підвищуючи селективність екстракції. Однак застосування ко-розчинників ускладнює технологічний процес, оскільки після екстракції потрібні додаткові стадії очищення для їх видалення з кінцевого продукту, що збільшує експлуатаційні витрати і час[10].

Для узагальнення впливу ключових параметрів на процес CO_2 екстракції наведена таблиця 6.1, яка систематизує діапазони змін параметрів, їх вплив на вихід і якість екстракту, а також технологічні обмеження. Як видно з таблиці, оптимальний тиск у межах 8–35 МПа забезпечує високу розчинність і продуктивність, але потребує врахування компромісу між селективністю і енергозатратами. Температурний діапазон 31–50 °C відповідає збереженню термолабільних компонентів при ефективному масообміні. Час екстракції варіюється від 20 до 90 хвилин, що дозволяє досягти рівноваги без втрати біологічної активності. Регулювання швидкості потоку CO_2 у межах 10–40 г/хв оптимізує масообмін, а застосування ко-розчинників до 10% значно підвищує селективність екстракції полярних речовин.

Для систематизації впливу основних параметрів — тиску, температури, часу, швидкості потоку та використання ко-розчинників — на ефективність суперкритичної CO₂ екстракції, у (табл 1.6) наведено їх оптимальні діапазони, вплив на процес та технологічні обмеження. Це дозволяє узагальнити практичні аспекти модифікації умов з метою досягнення максимального виходу і збереження біоактивності компонентів.

Табл.1.6.

Вплив параметрів CO₂ екстракції на процес вилучення водорозчинних компонентів

Параметр	Діапазон значень	Вплив на процес	Технологічні зауваження
Тиск	8–35 МПа	Підвищує розчинність і вихід екстракту	Високі тиски – збільшення енергозатрат
Температура	31–50 °C	Оптимальна для збереження термолабільних речовин	Вища температура – ризик деградації
Час екстракції	20–90 хв	Баланс між повнотою вилучення і стабільністю	Надмірний час – втрати якості
Швидкість потоку CO ₂	10–40 г/хв	Забезпечує оптимальний масообмін	Занизька/занадто висока – зниження ефективності
Ко-розчинники	0–10 % (етанол, метанол)	Підвищує розчинність полярних компонентів	Вимагає додаткової очистки

Схематично залежність фазових властивостей CO₂ від тиску і температури, а також їхній вплив на проникнення в клітинні структури дріжджів і розчинення водорозчинних компонентів показано на рисунку 1. На схемі відображено перехід CO₂ із газоподібного у суперкритичний стан, що характеризується різким збільшенням густини і здатності до дифузії, що забезпечує глибоке проникнення в клітинні мембрани дріжджів. Відзначено, що при оптимальних значеннях тиску і температури CO₂ може розчиняти

широкий спектр водорозчинних речовин, зберігаючи їх біологічну активність. На схемі також позначено регульовані параметри процесу, які забезпечують баланс між ефективністю вилучення та збереженням якості екстракту.

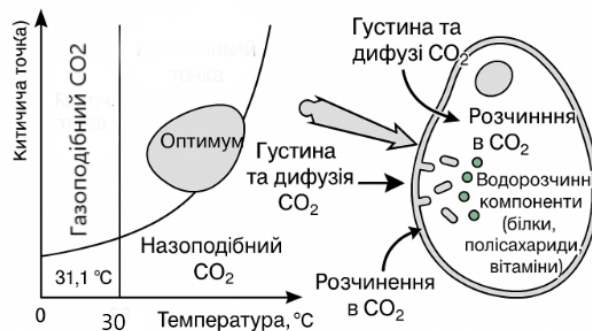


Рис1.6. Вплив фазових властивостей CO₂ на процес екстракції водорозчинних компонентів із клітин дріжджів

Таким чином, детальний науковий аналіз параметрів CO₂ екстракції демонструє, що вибір оптимальних умов забезпечує максимальну ефективність вилучення, високу селективність і збереження біологічних властивостей цільових водорозчинних компонентів. Це підтверджує перспективність застосування надкритичного CO₂ як екологічно чистого, безпечного і технологічно гнучкого розчинника в біотехнологічних процесах отримання цінних біологічних речовин із клітин дріжджів.

1.7. Застосування водорозчинних компонентів, отриманих із дріжджів

Водорозчинні компоненти клітин дріжджів, зокрема *Saccharomyces cerevisiae*, являють собою поліфункціональні біомолекули, що мають значний потенціал у біотехнологічних розробках, медичних технологіях, функціональній нутрицевтиці та агропромислових застосуваннях. Ці компоненти включають низькомолекулярні органічні речовини (вільні амінокислоти, нуклеотиди, вітаміни), олігопептиди, водорозчинні білки, а також гідрофільні полісахариди (манани, β-глюкани), які можуть бути екстраговані з цитозолу, периплазматичного простору та вакуолей клітини. Сучасні технології, зокрема CO₂-екстракція в надкритичних умовах,

забезпечують селективне вилучення цих молекул без денатурації або втрати біологічної активності, що критично доцільно для подальшого використання.

Одним з ключових об'єктів застосування є β -1,3/1,6-глюкани, які демонструють виражену імунотропну активність, зокрема здатність до активації Toll-подібних рецепторів (TLR-2, TLR-4) та Dectin-1 рецепторів макрофагів. Це запускає каскад сигнальних шляхів NF- κ B та MAPK, стимулюючи синтез прозапальних цитокінів (IL-1 β , TNF- α , IL-6) та факторів активації лімфоцитів. β -глюкани використовуються як імуномодулювальні агенти у складі біологічно активних добавок, вакцинних ад'ювантів та засобів профілактики інфекційних захворювань. Водночас, вони сприяють нормалізації ліпідного профілю крові, інгібуючи поглинання холестерину у шлунково-кишковому тракті, що пояснює їх використання у превентивній кардіології[13].

Водорозчинні білки та пептиди дріжджового походження демонструють широкий спектр біологічної активності — від антимікробної до антиоксидантної та протизапальної. Завдяки вмісту сірковмісних амінокислот, таких як метіонін і цистеїн, вони мають здатність до нейтралізації активних форм кисню (ROS) та відновлення глутатіонового пулу клітин. Це обґрунтовує їх застосування у створенні біопротекторних препаратів, особливо в геріатричній практиці та косметичній дерматології. Доцільно, що при фракціонуванні цих білків за допомогою мембранної фільтрації та ультрафільтрації отримують низькомолекулярні фракції, які демонструють високий ступінь біодоступності.

Нуклеотиди, особливо цитидин-монофосфат (CMP), аденозин-монофосфат (AMP) і гуанозин-монофосфат (GMP), мають надзвичайно важливе значення в регуляції клітинного метаболізму. Вони виступають як попередники синтезу ДНК/РНК, регулятори енергетичного обміну (через синтез АТФ) та інгібітори апоптозу. Їх застосування в ентеральному харчуванні дітей та дорослих із порушеннями імунної функції або

післяопераційними станами базується на здатності цих молекул стимулювати проліферацію клітин кишкового епітелію та нормалізувати мікробіоту.

Трегалоза, представник дисахаридів, виконує функцію стабілізатора біомембран та білків у стресових умовах, що робить її перспективною у фармацевтичній технології як криопротектор та стабілізатор ліофілізованих препаратів. Її здатність до захисту протеїнів від агрегації активно вивчається у нейродегенеративних моделях (хвороба Альцгеймера, Паркінсона), що відкриває нові перспективи клінічного застосування[5].

Вітаміни групи В, що містяться у водорозчинному фракціонованому екстракті дріжджів, зберігають коензимну активність і широко застосовуються у створенні вітамінних преміксів, ентеральних сумішей та косметичних засобів. Їх наявність у нативній формі забезпечує кращу біодоступність, порівняно із синтетичними аналогами.

У сільському господарстві та ветеринарії водорозчинні компоненти використовуються як метаболічні біостимулятори. Поліамінокислотні комплекси стимулюють синтез протеїнів у клітинах тварин, а також підвищують азотне засвоєння у рослин. У мікробіології — як поживні середовища для культивування промислових штамів бактерій, грибів та клітинних ліній.

Для систематизації функціональних властивостей і галузей застосування водорозчинних компонентів клітин дріжджів у сучасних біотехнологіях, у (табл 7.1) наведено короткий огляд основних молекулярних механізмів дії кожного типу речовини, їх біохімічну характеристику та практичне призначення. Це дозволяє оцінити прикладне значення екстрагованих сполук залежно від їхнього біологічного профілю.

Табл. 7.1.

Біологічна дія та застосування водорозчинних компонентів дріжджів

Компонент	Біохімічна характеристика	Механізм дії (молекулярний рівень)	Галузі застосування
-----------	---------------------------	------------------------------------	---------------------

β -1,3/1,6-глюкани	Гетерополісахариди клітинної стінки	Активація Dectin-1, TLR2/4, індукція NF- κ B	Імунологія, нутрицевтика, кардіопротекція
Пептиди з сірковмісними амінокислотами	Глутатіон-активуюча активність	Зменшення ROS, стабілізація антиоксидантної системи	Геронтологія, косметика, антистресові БАДи
Нуклеотиди (AMP, CMP, GMP)	Моносубстрати біосинтезу нуклеїнових кислот	Стимуляція клітинного росту, регенерація, імуномодуляція	Медична дієтологія, фармацевтика
Трегалоза	α -1,1-зв'язаний дисахарид	Захист білків від агрегації, стабілізація мембран	Біофармація, криозахист, нейропротекція
Вітаміни B1–B9	Коензими декарбоксилаз, дегідрогеназ	Активація ферментних шляхів, покращення метаболізму	Косметологія, премікси, дієтичні комплекси
Водорозчинні білки та амінокислоти	Джерело есенціальних амінокислот	Пластичний матеріал, буферні функції	Харчова промисловість, тваринництво, біоінженерія

Таким чином, використання водорозчинних компонентів дріжджових клітин не є одноманітним або обмеженим. Завдяки високій біосумісності, структурній різноманітності та фізіологічній активності ці речовини можуть бути інтегровані у міждисциплінарні технології з максимальною біоефективністю. Перспективи подальших досліджень полягають у створенні мультифракціонованих біопрепаратів з цільовим спектром дії, що відкриває нові горизонти у біомедицині, адаптивному харчуванні та екологічно орієнтованому сільському господарстві.

1.8. Прогалини у сучасних дослідженнях

Попри те, що надкритична екстракція за допомогою CO₂ вже набула широкого поширення у харчовій, косметичній, фармацевтичній та біотехнологічній галузях, вона залишається переважно орієнтованою на вилучення ліпофільних компонентів. Використання цієї технології для екстракції гідрофільних сполук, зокрема водорозчинних речовин із дріжджів, залишається недостатньо вивченим напрямом, що має низку фундаментальних наукових і прикладних прогалин. Особливу складність ускладнює структура клітинної оболонки дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, яка є багатокомпонентною біополімерною матрицею з хітином, β-глюканами та мананами, що ускладнює вивільнення внутрішньоклітинних метаболітів навіть за умов надкритичної флюїдної екстракції.

До уваги береться, що сам CO₂ у надкритичному стані є апріорно неполярним розчинником із високою спорідненістю до неполярних і слабкополярних молекул. Водночас більшість цільових біомолекул (амінокислоти, пептиди, деякі вітаміни групи В, глутатіон, полісахариди, нуклеотиди) є полярними, зарядженими або амфіфільними. Це призводить до значного зниження розчинності цих речовин у CO₂, що ставить під сумнів можливість ефективного вилучення без модифікації системи — зокрема, введення ко-солвентів або попередньої деструкції клітинної стінки[22].

На сьогодні більшість досліджень зосереджуються на оптимізації параметрів CO₂-екстракції для жиророзчинних речовин (наприклад, ефірних олій, стеролів, жирних кислот), тоді як системне дослідження екстракції водорозчинних фракцій є фрагментарним, емпіричним та методологічно неоднорідним. У таблиці 3 наведено класифікацію основних сучасних прогалин у галузі надкритичної CO₂-екстракції водорозчинних компонентів із дріжджів.

Для системного представлення наукових та технологічних прогалин у цій галузі, у (табл 8.1) наведено класифікацію основних обмежень і невирішених аспектів, які стримують розвиток ефективної надкритичної CO₂-екстракції водорозчинних метаболітів із клітин дріжджів.

Табл.8.1.

Систематизовані науково-технічні обмеження при вивченні CO₂-екстракції водорозчинних метаболітів із дріжджових клітин

Критична складова	Характеристика дослідженості	Коментарі щодо прогалин
Розчинність гідрофільних сполук у чистому НК-CO₂	Недостатньо охоплена, переважно зосереджена на ліпофільних субстанціях	Гідрофільні метаболіти демонструють низьку спорідненість до CO ₂ , що обмежує їх ефективне вилучення
Дослідження дії ко-солвентів (етанол, вода, метанол)	Фрагментарні, без уніфікованих моделей впливу концентрації	Відсутні узагальнені термодинамічні закономірності впливу ко-солвентів на ефективність вилучення
Фазова поведінка у системах CO₂-вода-біомолекула	Обмежена кількість експериментальних даних	Немає достовірних фазових діаграм для систем із клітинною біомасою
Кінетика масопереносу з клітинної матриці	Моделі спрощені, не враховують гетерогенність клітин	Не враховується ступінь руйнування клітин, пористість матриці, внутрішньоклітинна адсорбція
Вплив параметрів середовища (pH, іонний склад, осмотичний тиск)	Практично не вивчався в контексті CO ₂ -екстракції	Дані про ефект буферів, електролітів або водної фази відсутні
Термолабільність біомолекул у CO₂-середовищі	Вивчено лише для кількох стабільних сполук	Потреба в дослідженні стабільності при 40–80°C для пептидів, вітамінів, амінокислот
Методи in-line аналізу водорозчинних екстрактів	Переважно offline, тривалі	Потреба в адаптації швидких методів (NIR, FTIR, UV-Vis) для моніторингу в реальному часі
Селективність вилучення при змінних параметрах процесу	Емпіричні підходи, без повної математизації	Відсутні комплексні моделі селективного вилучення з багатокомпонентних сумішей

Таблиця демонструє міждисциплінарний характер проблем, з якими стикаються дослідники у сфері CO₂-екстракції водорозчинних метаболітів із дріжджових клітин. Недостатня розчинність гідрофільних молекул у CO₂, обмеженість даних про фазову поведінку та відсутність масштабованих моделей масопереносу значною мірою стримують розвиток цієї технології у практичному руслі. Особливе занепокоєння викликає відсутність інтегрованих моделей, які враховували б взаємодію між фізичними параметрами процесу (тиск, температура, вміст ко-солвенту) та властивостями біоматриці (пористість, гідратація, вміст сухих речовин, іонний склад клітинного середовища) [12].

Неможливість здійснювати in-line аналіз процесу екстракції також ускладнює налаштування параметрів у реальному часі. Це обумовлює затримки у валідації процесу та підвищує ризик деградації чутливих метаболітів, особливо в умовах високих температур. Водночас, у багатьох випадках невідомо, чи не відбувається небажане окиснення або денатурація речовин у присутності надкритичного флюїду, особливо в системах із залишками кисню або домішками води[1].

Ще однією суттєвою прогалиною є відсутність консолідованої бази даних з фазової поведінки в системах «CO₂ – вода – дріжджова біомолекула». Зважаючи на складність структури клітинної стінки дріжджів та можливість виникнення водно-солевих мікродоменів усередині матриці, актуальним є створення мультифазної моделі екстрагування з урахуванням структурної гетерогенності.

Іншим перспективним напрямом є застосування інтегрованих методів деструкції клітинної стінки перед екстракцією. Серед них – імпульсна електропорація, гідродинамічна кавітація, ультразвукова обробка та ферментативний лізис β-глюканів. Такі попередні етапи можуть не лише покращити масоперенос, а й сприяти збереженню термолабільних фракцій шляхом зниження потреби у високотемпературному режимі[16].

У зв'язку з цим постає потреба у формуванні мультимодальних моделей масопереносу, які поєднували б термодинаміку, гідродинаміку та структурну біологію дріжджів. Це дозволить забезпечити не лише точне прогнозування виходу компонентів, але й оптимізацію технологічного процесу в промисловому масштабі.

Висновки до літературного огляду

Проведений аналіз літературних джерел дозволив сформулювати низку фундаментальних положень, що є ключовими для розуміння наукового та прикладного значення процесів CO₂-екстракції водорозчинних компонентів із клітин дріжджів.

По-перше, встановлено, що водорозчинні речовини дріжджового походження, до яких належать амінокислоти, вітаміни, коензими, пептиди та низькомолекулярні вуглеводи, демонструють значну біофункціональну активність, зокрема імуномодулювальні, антиоксидантні, нейропротекторні та ензиматичні властивості. Їхній біологічний потенціал визначає зростаючий інтерес до розробки селективних методів їхнього вилучення з внутрішньоклітинного середовища мікроорганізмів.

По-друге, обґрунтовано, що традиційні технології вилучення таких речовин (водна мацерація, екстракція органічними розчинниками, автоліз) мають обмеження, пов'язані із високою енергозатратністю, ризиком деградації термолабільних сполук, недостатньою селективністю та потребою у подальшому очищенні екстрактів. Це знижує загальну ефективність застосування таких методів у масштабному виробництві.

По-третє, особливу увагу привертає застосування технології надкритичної флюїдної екстракції, а саме CO₂-екстракції, що забезпечує більш контрольований, селективний і екологічно безпечний процес. У надкритичному стані CO₂ демонструє властивості, характерні як для рідин, так і для газів: високу дифузійну здатність, низьку в'язкість, змінну розчинну силу,

що дозволяє ефективно проникати крізь клітинні стінки й вилучати цільові сполуки.

Четвертим важливим положенням є те, що, попри переважне використання надкритичного CO₂ для вилучення гідрофобних сполук (наприклад, ліпідів), в умовах модифікації середовища — через додавання полярних ко-розчинників (етанолу, води) — можливо суттєво підвищити розчинність гідрофільних метаболітів. Це відкриває нові перспективи для застосування CO₂-екстракції саме у вилученні водорозчинних фракцій дріжджового походження.

П'ятим елементом, який заслуговує уваги, є те, що проаналізовані джерела демонструють значну фрагментарність даних щодо оптимальних параметрів процесу CO₂-екстракції водорозчинних сполук, а також брак математичних моделей, що враховують міжфазну масопереносну взаємодію у складних біологічних матрицях. Це обумовлює необхідність подальших досліджень у галузі термодинамічного моделювання, реології дисперсних середовищ та оцінки рівноважних фазових параметрів у присутності співрозчинників.

Ще одним суттєвим висновком є те, що не повністю досліджено потенціал інтеграції CO₂-екстракції в існуючі харчові та фармацевтичні технологічні платформи з метою підвищення економічної ефективності та екологічної безпеки виробництва біоактивних субстанцій. Залишається відкритим питання масштабування процесу, стабільності отриманих екстрактів, а також регуляторної відповідності (GRAS-статус, фармакопейні вимоги).

Таким чином, літературний огляд підтвердив як наукову новизну, так і прикладну цінність обраної тематики дослідження. Систематизація наявних знань окреслила наявні прогалини у розумінні механізмів CO₂-екстракції гідрофільних компонентів і підтвердила доцільність подальших досліджень у напрямі удосконалення даного методу для вилучення цінних метаболітів із дріжджових клітин.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Теоретичне обґрунтування методу вилучення водорозчинних компонентів з дріжджів

Раціональне проектування біотехнологічного процесу вимагає ґрунтового теоретичного підґрунтя. Воно має включати знання про будову клітинної структури дріжджів, локалізацію цільових сполук, фізико-хімічні властивості компонентів та обмеження, пов'язані з їх вилученням. Теоретичний аналіз дозволяє обґрунтувати вибір методів, що застосовуються у подальшому експерименті, та уникнути втрат біологічної активності важливих нутрієнтів.

Цей підрозділ базується на узагальненні сучасної наукової літератури щодо особливостей структури клітин дріжджів, хімічної природи внутрішньоклітинних сполук та перспективності дріжджової біомаси як сировини для одержання біоактивних речовин. Відтак особлива увага приділяється не лише загальним характеристикам клітини, а й специфіці екстракції водорозчинних фракцій із збереженням їх функціональності.

2.1.1 Характеристика клітин дріжджів як джерела водорозчинних компонентів

Дріжджі виду *Saccharomyces cerevisiae* є універсальними модельними мікроорганізмами, які широко застосовуються у харчовій, медичній, сільськогосподарській та біотехнологічній промисловості. Упродовж останніх років зростає інтерес до використання відпрацьованої або спеціально вирощеної дріжджової біомаси як джерела цінних нутрієнтів. Їхня клітинна структура поєднує механічну міцність і біохімічну складність, що ускладнює прямий доступ до внутрішньоклітинних сполук, зокрема водорозчинних компонентів.

Типова дріжджова клітина складається з клітинної стінки, плазматичної мембрани, цитозолу та внутрішніх органел — ядра, мітохондрій, рибосом, вакуолей. Клітинна стінка виконує не лише захисну, але й бар'єрну функцію,

будучи перешкодою для прямого вивільнення цільових сполук. Її структура містить β -глюкани, манани, хітин — високомолекулярні полімери, що утворюють жорстку матрицю. Саме цей бар'єр потрібно подолати для ефективного вилучення ВРК.

Водорозчинні компоненти локалізуються переважно в цитозолі та вакуолях клітини. До них належать амінокислоти, короткі пептиди, білки, фрагменти РНК і ДНК, вітаміни (особливо групи В), мінеральні солі, коферменти та інші метаболіти. Їх вміст може досягати 65–70% від сухої маси клітини, проте ефективність вилучення залежить від ступеня деструкції клітинної оболонки та збереження функціонального стану компонентів.

Механічні, хімічні або термічні методи мають низку обмежень: вони можуть знижувати біоактивність, викликати денатурацію білків, змінювати склад вітамінів або забруднювати продукт залишками хімічних реагентів. Тому сучасна тенденція — використання м'яких, біотехнологічно орієнтованих методів, які поєднують високу ефективність руйнування клітини зі збереженням нативних властивостей речовин.

2.1.2 Обґрунтування вибору технології: СФЕ, автоліз та автоклавування

Вибір технології вилучення водорозчинних компонентів (ВРК) із клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* базувався на необхідності зберегти біологічну активність цільових сполук, мінімізувати втрати функціональності, а також уникнути використання токсичних або хімічно агресивних реагентів. З цією метою була розроблена триетапна схема обробки біомаси, яка поєднує фізико-хімічний і ферментативний підходи: надкритичну флюїдну екстракцію (СФЕ) з CO_2 , автоліз та автоклавування.

СФЕ — це інноваційна технологія, що базується на використанні вуглекислого газу в його надкритичному стані. За умов температури вище 31°C і тиску понад 73 атм CO_2 набуває властивостей і газу, і рідини водночас. Він проникає в мікропористі структури та розчиняє вибрані речовини,

зберігаючи при цьому термолабільні компоненти. Однією з головних переваг CO_2 є його нетоксичність, хімічна інертність, відсутність залишків у продукті та можливість легкого видалення після процесу.

У цьому дослідженні СФЕ проводилася за температури 42 °C і тиску 50–90 атм протягом 2 годин. Такий режим дозволяє забезпечити селективну екстракцію низькомолекулярних ВРК (пептиди, амінокислоти, коферменти) за рахунок порушення проникності клітинної стінки. Водночас відносно низька температура зберігає нативну структуру ферментів та вітамінів групи В. Попри це, навіть при максимальному тиску (90 атм) вихід ВРК не перевищував 33,5% від загальної сухої маси біомаси. Це зумовлено тим, що СФЕ здебільшого впливає на доступні для розчинника зовнішні та частково мембранні структури, тоді як велика частина внутрішньоклітинних компонентів залишається зв'язаною з матрицею або локалізованою у вакуолях.

Для подальшого вивільнення ВРК застосовано автоліз — процес саморозщеплення клітин за участю ендогенних гідролітичних ферментів (протеази, нуклеази, фосфатази, глікозидази), які активуються при температурі 50–55 °C. Такий підхід є біологічно безпечним і дозволяє уникнути використання сторонніх ферментів або хімікатів. Автоліз імітує природну деструкцію клітин, дозволяючи внутрішньоклітинним ферментам поступово розщеплювати білки, РНК, глікани та інші полімери на більш розчинні низькомолекулярні фрагменти.

У роботі застосовано температурний режим 55 °C, тривалість автолізу — 2 та 4 доби. За цей час відбувається поступове підвищення концентрації водорозчинних сполук у надосадковій рідині. Біомаса розпадається, вакуолі вивільняють вміст, а фрагменти клітинної стінки стають менш щільними. Застосування автолізу після СФЕ обґрунтоване тим, що попереднє послаблення клітинної оболонки робить її більш чутливою до дії ендогенних ферментів. За результатами експерименту, після 4 діб автолізу вдалося підвищити вихід ВРК до 69,7% від сухої маси.

Останнім етапом у запропонованій технології є автоклавування — обробка при підвищеній температурі та тиску (121 °С, 2 атм, 40 хв). Цей процес має двоцільову функцію: (1) остаточне руйнування залишків клітинних структур, які не були розщеплені під час автолізу, і (2) стерилізація продукту. Термічне руйнування забезпечує вивільнення залишкових макромолекул, а також зниження мікробіологічного забруднення, що критично важливо для харчового чи фармацевтичного використання екстракту.

Застосування автоклавування дозволяє підвищити кінцевий вихід ВРК до 74,2% — практично до межі теоретичного потенціалу дріжджової біомаси. При цьому жодного токсичного реагенту не вводиться, а продукт залишається безпечним, зберігаючи біоактивність завдяки поетапному режиму обробки.

Таким чином, триетапна стратегія СФЕ → автоліз → автоклавування демонструє високу ефективність у вилученні водорозчинних компонентів із клітин дріжджів. Кожен етап виконує чітку функцію: СФЕ — попереднє послаблення клітини і вилучення легкодоступних метаболітів; автоліз — ферментативне вивільнення внутрішньоклітинних речовин; автоклавування — завершення гідролізу та стерилізація. Така технологія є екологічно безпечною, адаптованою до масштабування та забезпечує високий вихід якісних біоактивних речовин для подальшого застосування в харчовій, фармацевтичній або ветеринарній промисловості.

2.2. Власне експериментальне дослідження

Метою експериментального дослідження було розробити та апробувати триетапну технологію вилучення водорозчинних компонентів (ВРК) з клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* із застосуванням надкритичної флюїдної екстракції (СФЕ), ферментативного автолізу та автоклавування. Основна увага була зосереджена на аналізі впливу кожного окремого етапу на ефективність руйнування клітинної структури та вивільнення внутрішньоклітинного вмісту.

У роботі використовувались пресовані пекарські дріжджі (виробник — ТОВ «Хлібний стандарт»). Початкова маса зразків — 250 г, із середнім

вмістом сухих речовин 33% (82,5 г). Перед екстракцією дріжджі розчиняли в дистильованій воді до об'єму 1 л, після чого суспензію гомогенізували шляхом перемішування.

Етап 1. Надкритична флюїдна екстракція CO₂: суспензію поміщали в металевий балон об'ємом 2 л, до якого подавали рідкий CO₂. Установлювались різні тиски (50, 76, 90 атм) з постійною температурою 42 °С. Тривалість процесу складала 2 години. Після завершення екстракції тиск знижували до атмосферного за 7–10 хвилин. Проби відбирали для подальшої обробки.

Підготовка до аналітичного контролю: суспензії після СФЕ піддавали центрифугуванню (3000 об/хв, 10 хв). Надосадкову рідину розводили дистильованою водою (1:10) для спектрофотометричного аналізу. Осад висушували у термошафі при 55 °С протягом 48 годин.

Спектрофотометричний аналіз: зразки аналізували на спектрофотометрі в діапазоні довжин хвиль 200–300 нм з фіксацією максимумів поглинання при 220 нм (амінокислоти, пептиди) та 260 нм (нуклеїнові кислоти). Також проводилось визначення масової частки сухих речовин у надосадковій рідині.

Етап 2 осад зразків після СФЕ піддавався автолізу. Для цього дріжджову масу ресуспендували у дистильованій воді та витримували у термостаті при температурі 55 °С протягом 2 та 4 діб. Ручне перемішування виконувалось 2–3 рази на добу. Відібрані зразки центрифугували, надосадкову рідину аналізували як і після СФЕ.

Етап 3. Автоклавування: після завершення автолізу проби піддавали термічній обробці в лабораторному автоклаві при температурі 121 °С та тиску 2 атм протягом 40 хвилин. Після охолодження зразки центрифугували, осад зберігали для зважування, а надосадкову рідину досліджували спектрофотометрично.

Контрольні умови: було проведено контрольний варіант без застосування СФЕ, автолізу або автоклавування, що дозволило порівняти динаміку змін між необробленими та обробленими зразками.

Таким чином, усі етапи обробки — СФЕ, автоліз і автоклавування — були послідовно реалізовані з дотриманням лабораторних умов, забезпечуючи точність і відтворюваність підготовки та аналізу проб для подальшої оцінки вмісту водорозчинних компонентів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Теоретична частина

3.1.1 Біохімічна природа водорозчинних компонентів клітин дріжджів

Дріжджі, особливо *Saccharomyces cerevisiae*, є одноклітинними еукаріотичними мікроорганізмами, які відіграють важливу роль у багатьох сферах промисловості. Завдяки унікальному біохімічному складу клітин, дріжджі широко застосовуються у харчовій, фармацевтичній, косметичній та сільськогосподарській галузях. Особливий інтерес становлять водорозчинні компоненти (ВРК), які формують до 60–70% сухої речовини клітини та мають широкий спектр біологічної активності.

Водорозчинні компоненти включають низько- та середньомолекулярні органічні сполуки: вільні амінокислоти, пептиди, білки, нуклеотиди (АТФ, ГТФ, ЦТФ), вітаміни групи В (тіамін, рибофлавін, ніацин, піридоксин, фолієва кислота), коферменти (NAD⁺, NADP⁺, кофермент А), а також полі- та олігосахариди, мінеральні солі та метаболіти (наприклад, органічні кислоти). Більшість із них є гідрофільними, здатними розчинятись у воді, мають невелику молекулярну масу та високу біологічну цінність.

Ці речовини зосереджені у цитоплазмі клітин, зокрема у цитозолі та вакуолярному просторі. Цитозоль — це водне середовище, в якому відбуваються більшість біохімічних реакцій клітини, і саме тут накопичуються амінокислоти, пептиди та нуклеотиди. Вакуолі відіграють роль депо для іонів, метаболітів і гідролітичних ферментів. Таким чином, потенційна концентрація ВРК у клітині дріжджів є значною.

Однак вивільнення цих компонентів ускладнюється наявністю щільної клітинної стінки. Стінка дріжджів складається з глюканів, мананів та хітину, що формують жорстку багат шарову структуру, яка забезпечує механічну стабільність і захист клітини від зовнішніх факторів. Цей бар'єр перешкоджає природному виходу внутрішньоклітинного вмісту навіть у разі фізичного чи термічного впливу. Тому для екстракції ВРК необхідне ефективне порушення

цілісності клітинної стінки або її часткова деструкція за допомогою фізичних, хімічних або ферментативних методів.

Біологічна цінність ВРК дріжджів зумовлена їх здатністю виконувати важливі метаболічні та регуляторні функції в організмі людини й тварин. Наприклад, амінокислоти та пептиди — джерело легкодоступного азоту та будівельного матеріалу для синтезу білків, нуклеотиди — регулятори енергетичних процесів, вітаміни групи В — необхідні коферменти у багатьох ферментативних реакціях.

Окрему групу становлять імуномодуючі та антиоксидантні речовини, які сприяють відновленню клітин, нейтралізації вільних радикалів та підвищенню резистентності організму. Завдяки цьому ВРК дріжджів активно використовуються як компоненти харчових добавок, нутрицевтиків, ветеринарних препаратів і косметичних засобів.

Слід також зазначити, що якісний і кількісний склад ВРК значною мірою залежить від умов вирощування дріжджів (склад поживного середовища, температура, рН, аерація), а також від способу їх зберігання і обробки після збору. Це накладає додаткові вимоги до стандартизації процесу екстракції.

У зв'язку з вищезазначеним, актуальним є пошук технологій, які дозволяють забезпечити максимальний вихід водорозчинних компонентів без руйнування їх структури. Це потребує застосування щадних методів руйнування клітинної стінки та одночасного збереження біоактивності цільових речовин, що і стало предметом дослідження в даній роботі.

3.1.2 Технологічне та ферментативне обґрунтування серії обробок біомаси дріжджів

У розробці ефективної технології вилучення водорозчинних компонентів із клітин дріжджів ключову роль відіграє поєднання фізичних, хімічних і біохімічних методів обробки біомаси. Особливість дріжджових клітин полягає в наявності щільної клітинної стінки, яка захищає цитоплазму від зовнішнього впливу та водночас утруднює вивільнення

внутрішньоклітинного вмісту. Тому для забезпечення максимального виходу біоактивних сполук необхідне цілеспрямоване руйнування цієї структури або її функціональне ослаблення.

Першим етапом у розробленій схемі екстракції є надкритична флюїдна екстракція (СФЕ) з використанням вуглекислого газу. Надкритичний CO_2 має унікальні фізико-хімічні властивості — він поєднує розчинювальні здатності рідини з проникністю газу. Завдяки цьому CO_2 може глибоко проникати в мікропори клітинної стінки, розчиняючи низькомолекулярні водорозчинні та частково ліпофільні компоненти без використання агресивних органічних розчинників. Процес СФЕ проводиться при температурах, що не перевищують $45\text{--}55\text{ }^\circ\text{C}$, що дозволяє уникнути руйнування термолабільних сполук — амінокислот, вітамінів, коферментів. У вашому дослідженні цей етап виконувався при температурі $42\text{ }^\circ\text{C}$, тисках $50\text{--}90\text{ атм}$ і тривалості 2 години, що є технологічно безпечним режимом з точки зору збереження біологічної активності ВРК.

Однак СФЕ не забезпечує повного вилучення всіх цільових сполук, оскільки клітинна структура залишається частково неушкодженою. Для посилення руйнування клітин і вивільнення більшої кількості ВРК у роботі передбачено наступний етап — автоліз. Це природний процес ферментативного розщеплення клітин за участі ендогенних гідролітичних ферментів, таких як протеази, нуклеази, фосфатази та глікозидази. Автоліз активується при підвищенні температури до $50\text{--}55\text{ }^\circ\text{C}$, за якої ферменти зберігають стабільність і водночас клітинні структури стають більш вразливими. Встановлено, що при температурі $55\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 2–4 діб відбувається поступове руйнування клітинної стінки з переходом водорозчинних речовин у надосадкову фазу. Особливо ефективним виявилось збільшення тривалості автолізу до 4 діб, оскільки це дозволило досягти виходу ВРК до 69,7% від сухої маси біомаси.

Завершальним етапом у запропонованій схемі обробки є автоклавування — високотемпературна обробка під тиском, яка виконує подвійну функцію:

стерилізацію екстракту і остаточне руйнування клітинних залишків. У дослідженні цей процес проводився при температурі 121 °C та тиску 2 атм протягом 40 хвилин. Автоклавування забезпечило остаточне вивільнення залишкових макромолекул, таких як білки, нуклеїнові кислоти та полісахариди, що ще могли залишатися зв'язаними у фрагментах клітинної стінки або органелах.

У сукупності, послідовне застосування СФЕ → автоліз → автоклавування дозволило досягти не лише високого ступеня екстракції (до 74,2% ВРК від сухої маси), але й забезпечити мікробіологічну стабільність і екологічну безпечність отриманих розчинів. Такий підхід є ефективним як з технологічної, так і з економічної точки зору, оскільки дозволяє використовувати мінімум реагентів, зберігати природну структуру цінних компонентів і адаптувати процес до промислових умов із мінімальними втратами.

3.2 Оцінка результатів власних досліджень

Оцінка ефективності поетапного вилучення водорозчинних компонентів (ВРК) з біомаси дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* здійснювалася шляхом кількісного та якісного аналізу результатів, отриманих після кожної технологічної стадії: надкритичної CO₂-екстракції, автолізу та автоклавування. Проведене дослідження дозволило встановити закономірності зміни рівня вивільнення ВРК залежно від параметрів обробки, зокрема тиску при СФЕ, тривалості автолізу та впливу температурно-тискового режиму при завершальному термічному етапі. Результати оцінювались з урахуванням масової частки сухих речовин у надосадковій рідині, а також за спектрофотометричними показниками, які відображають присутність низькомолекулярних азотистих сполук та нуклеотидів. Проведений порівняльний аналіз дозволяє зробити обґрунтовані висновки щодо ефективності кожного етапу та доцільності їхнього комбінованого застосування в рамках запропонованої технології.

3.2.1 Вихід водорозчинних компонентів залежно від тиску CO₂-екстракції

У процесі дослідження проводилась СФЕ зразків дріжджової суспензії при тисках 50, 76 і 90 атм. Температура підтримувалась на рівні 42 °С, а тривалість кожного експерименту становила 2 години. За таких умов CO₂ перебуває в надкритичному стані, що забезпечує його високу проникність і селективність.

Зі збільшенням тиску було зафіксовано зростання ефективності вилучення водорозчинних речовин. При 50 атм вихід становив 3,1% від маси біомаси, при 76 атм — 17,4%, а при 90 атм досягав 33,5%. Така залежність пояснюється підвищенням густини CO₂ у надкритичному стані, що посилює його розчинювальні властивості та дозволяє більш глибоко проникати у клітинну структуру.

Табл 3.2.1

Вихід водорозчинних компонентів дріжджів залежно від тиску СФЕ

Варіант	Тиск, атм	Вміст ВРК, г/л	ВРК від біомаси, %
Контроль	—	0,6	0,5
СФЕ	50	3,8	3,1
СФЕ	76	18,0	17,4
СФЕ	90	34,7	33,5

На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що тиск під час СФЕ має прямий вплив на здатність CO₂ проникати у клітинну структуру дріжджів. У результаті зростає кількість вилучених низькомолекулярних сполук, які знаходяться в цитоплазмі та частково зв'язані з білковими комплексами. Особливо ефективним виявився режим при 90 атм — він забезпечив найбільшу розчинність гідрофільних речовин і найменшу залишкову масу в осаді. Також важливо відзначити, що навіть мінімальне підвищення тиску з 50 до 76 атм сприяє зростанню ефективності вивільнення компонентів у понад п'ять разів.

Таким чином, СФЕ є ефективним стартовим етапом, який забезпечує не лише вилучення до 33,5% ВРК, але й підготовку клітин до подальшої деструкції, що покращує результат наступних етапів автолізу та термообробки.

3.2.2 Вплив автолізу та автоклавування на загальний вихід ВРК

Подальше підвищення виходу водорозчинних речовин забезпечував етап автолізу. Автоліз проводився упродовж 2 та 4 діб при 55 °С. Результати свідчать, що вже на другий день автолізу вихід ВРК становив 57,2%, а після 4 діб — 69,7%. Це пов'язано з активізацією ендогенних ферментів дріжджів, які сприяють гідролізу білків, полісахаридів та нуклеїнових кислот.

Фінальна обробка — автоклавування при 121 °С і тиску 2 атм — дозволила збільшити вихід ВРК до 74,2%, що свідчить про завершення руйнування клітинних структур та переходу залишкових компонентів у водну фазу.

Табл 3.2.2

Зміна виходу ВРК після автолізу та автоклавування

Етап	ВРК від сухої маси, %
Після СФЕ (90 атм)	33,5
+ 2 доби автолізу	57,2
+ 4 доби автолізу	69,7
+ автоклавування	74,2

У ході автолізу клітини дріжджів піддавались впливу власних ендогенних ферментів, активованих при температурі 55°С. Ферментативне розщеплення макромолекул приводило до поступового вивільнення речовин, що залишились у клітині після СФЕ. Зокрема, гідроліз білків до пептидів та амінокислот значно покращував розчинність компонентів, що спостерігалось при збільшенні тривалості автолізу до 4 діб. У цей період до водної фази перейшло ще близько 36% ВРК у порівнянні з результатом після СФЕ.

Додаткове автоклавування забезпечувало термічне розплавлення залишкових клітинних структур, а також стерилізацію екстракту. Стерилізація

є необхідною умовою, якщо екстракт планується використовувати у фармацевтичній або харчовій промисловості. Завдяки цьому було досягнуто максимального виходу — 74,2% від загальної сухої маси.

Отже, комбінована дія ферментів та температури дозволила реалізувати повне вилучення водорозчинних речовин з дріжджової біомаси. Метод є ефективним, біологічно безпечним, не потребує використання органічних розчинників, і може бути адаптований до промислових умов.

3.2.3 Спектрофотометричний аналіз екстрактів

Для оцінки якісного складу водорозчинних компонентів, отриманих у процесі CO_2 -екстракції з клітин дріжджів, було проведено спектрофотометричний аналіз у діапазоні довжин хвиль 200–270 нм. Такий метод дозволяє виявити наявність білків, пептидів, нуклеїнових кислот і супутніх низькомолекулярних метаболітів.

Найбільш інформативними для якісного аналізу виявилися значення поглинання на довжинах хвиль 220 нм (характерна для пептидів і білків) та 260 нм (характерна для нуклеїнових кислот). Співвідношення між цими показниками дозволяє визначити переважаючий тип біомолекул у водній фракції — чи домінують у складі екстракту білково-пептидні сполуки, чи нуклеїнові кислоти.

У таблиці 3.2.3 наведено числові значення оптичної густини, що були отримані для екстрактів після CO_2 -обробки під різним тиском (50, 76 та 90 атм), а також для контрольного зразка. На рисунку 3.2.3 подано відповідні спектри поглинання. Це дозволяє прослідкувати зміну якісного складу екстрактів залежно від умов екстракції.

Табл. 3.2.3

Інтенсивність спектрів при 220 і 260 нм

Зразок	220 нм	260 нм	Співвідношення 220/260
Контроль	1,006	0,589	1,71
50 атм	2,550	1,726	1,48
76 атм	3,859	4,493	0,86

90 атм	4,430	4,735	0,94
--------	-------	-------	------

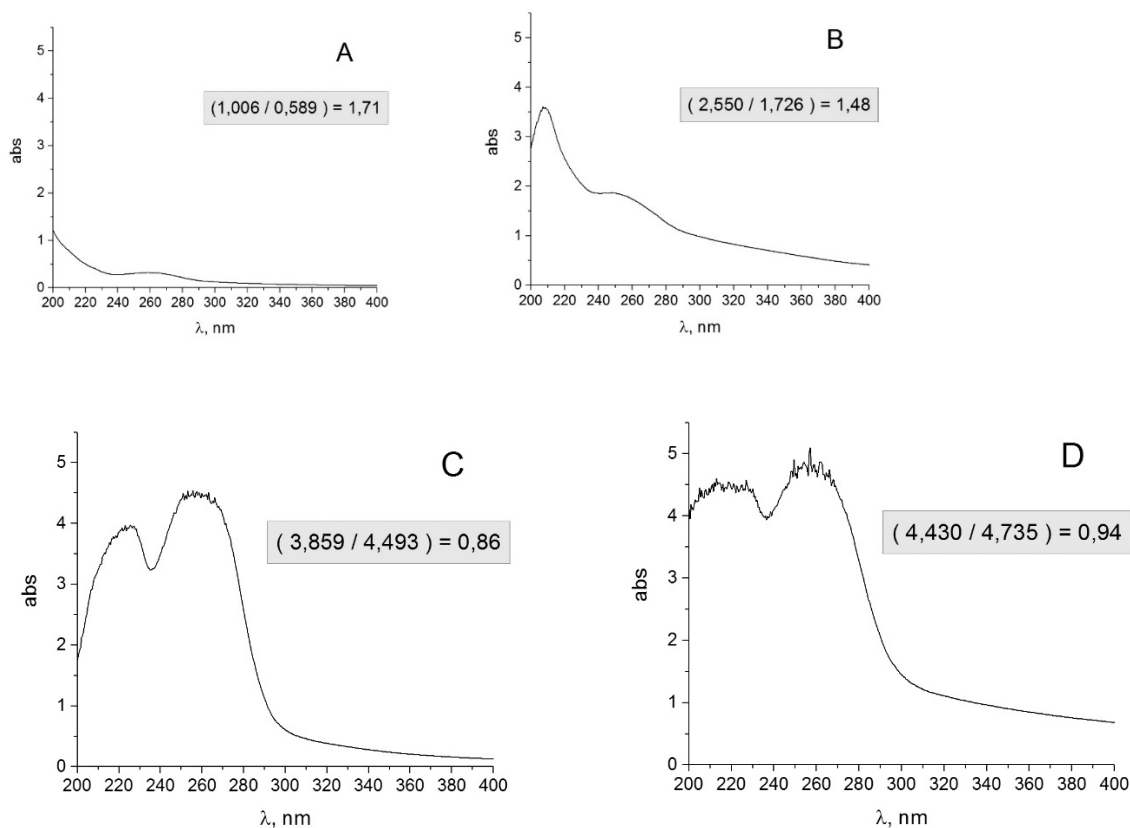


Рис. 3.2.3. Спектри поглинання ВРК у розведенні 1:10: контроль (А), 50 атм (В), 76 атм (С), 90 атм (D).

Як видно з наведених даних, підвищення тиску під час CO_2 -екстракції супроводжується не лише загальним зростанням інтенсивності спектрального поглинання, але й суттєвим зсувом співвідношення 220/260 нм. Це свідчить про зростання вмісту нуклеїнових кислот і білків у водній фазі при високих тисках. Зокрема, максимальна ефективність вилучення цих компонентів досягається при тиску 76–90 атм, де співвідношення 220/260 знижується до значень нижче 1, що є типовим для домінування нуклеїнових сполук.

Для подальшої оцінки стабільності ферментативної активності клітин та можливості підвищення виходу біоактивних сполук, екстраговану біомасу було піддано автолізу протягом 2 і 4 діб, а також додатковому автоклавуванню.

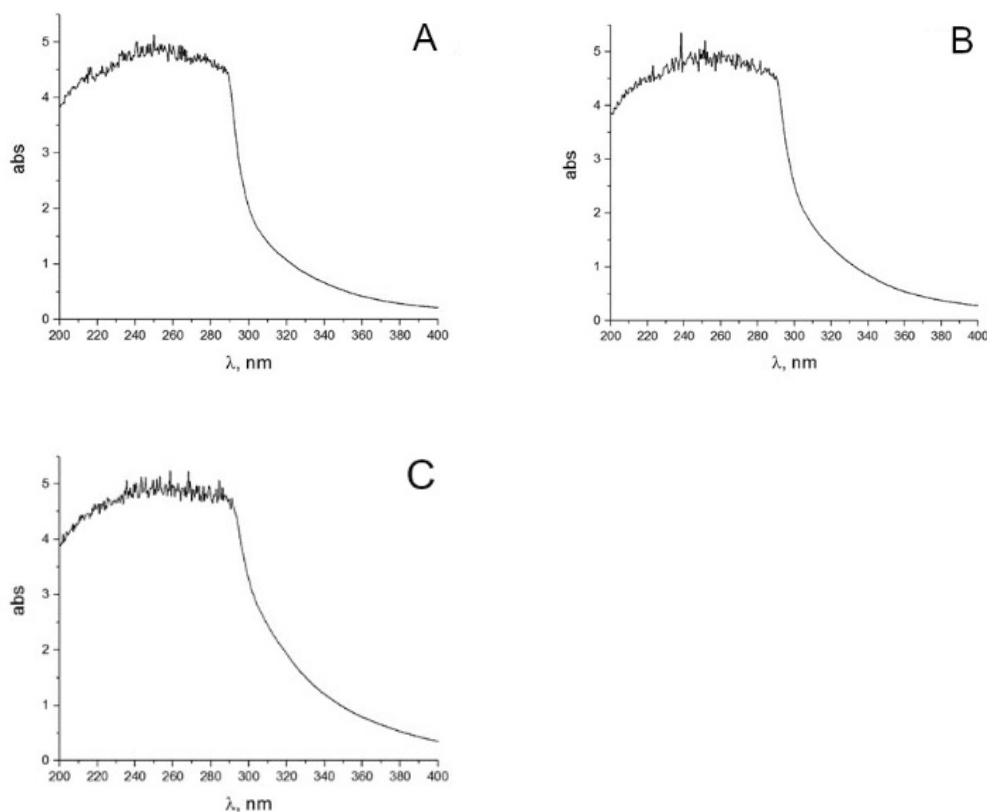


Рис. 3.2.3 Спектри поглинання ВРК у розведенні 1:10 після 2 діб автолізу (А), 4 діб (В), автоклавування (С).

Як видно зі спектрів, усі етапи додаткової обробки супроводжуються суттєвим зростанням інтенсивності поглинання в області 220–260 нм. Це свідчить про накопичення у розчині як низькомолекулярних продуктів метаболізму, так і продуктів гідролізу білків і нуклеїнових кислот — зокрема коротких пептидів, олігонуклеотидів, мононуклеотидів.

Зменшення співвідношення 220/260 нм після кожного наступного етапу є характерною ознакою підвищення концентрації нуклеїнових речовин. Така динаміка підтверджує, що автоліз після СФЕ не лише не пригнічує, а навпаки — активізує ферментативне розщеплення внутрішньоклітинних макромолекул. Це свідчить про глибоке руйнування клітинної структури та перехід основних біополімерів у розчин.

Аналіз отриманих спектрів дозволяє стверджувати, що отримані екстракти мають багатокомпонентний склад, що відкриває перспективи їх подальшого фракціонування — зокрема для виділення окремих груп

біологічно активних сполук із чітко вираженою фармакологічною або нутрицевтичною дією.

ВИСНОВКИ

1. У межах виконаної дипломної роботи було розроблено, теоретично обґрунтовано та експериментально апробовано ефективну технологію вилучення водорозчинних компонентів із клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що включає послідовне застосування трьох взаємодоповнюючих методів: надкритичної CO₂-екстракції (СФЕ), ферментативного автолізу та термічного автоклавування. Кожен з етапів має своє функціональне навантаження і забезпечує послідовне посилення деструкції клітинної структури та вивільнення цільових сполук при мінімальному впливі на їхню біоактивність.
2. Застосування СФЕ за умов температури 42 °C і тиску 90 атм упродовж 2 годин забезпечує селективне первинне вилучення до 33,5% водорозчинних компонентів відносно сухої маси біомаси. Цей метод не руйнує клітинну структуру повністю, але ефективно витягує ліпофільні та частково водорозчинні речовини, не інактивуючи ендогенні ферменти, що є критично важливим для наступного етапу ферментативної обробки.
3. Після СФЕ, проведення автолізу за температури 55 °C упродовж 2–4 діб активізує ендогенні гідролітичні ферменти клітини (протеази, нуклеази, глікозидази), що без додавання зовнішніх реагентів забезпечують глибоке біохімічне руйнування клітинної стінки. Це дозволяє збільшити загальний вихід водорозчинних компонентів до 69,7% на 4 добу, що свідчить про високу ефективність біологічного методу деструкції.
4. Заключний етап обробки — автоклавування при температурі 121 °C та тиску 2 атм протягом 40 хвилин — забезпечує остаточне руйнування залишкових клітинних структур і повну стерилізацію продукту. Внаслідок цього досягається максимальний вихід водорозчинних компонентів — 74,2% від загальної сухої маси дріжджів, що є близьким до теоретичної межі. Спектрофотометричні дослідження підтверджують накопичення амінокислот, пептидів і нуклеїнових кислот у кінцевому продукті.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cardoso L.A.C.H. et al. Supercritical fluid extraction of polyphenols from lees: overall extraction curve, kinetic data and composition of the extracts // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2015. – Vol. 2, № 1. – P. 1–10. – DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0073-5>
2. Cocero M.J., Calvo L. Influence of pretreatments for extraction of lipids from yeast by using supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2011. – Vol. 58, № 1. – P. 49–57. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.04.012>
3. Cocero M.J. et al. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Spirulina platensis* // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2009. – Vol. 49, № 3. – P. 345–350. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.03.003>
4. Crampon C. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of molecules of interest from microalgae and seaweeds // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2011. – Vol. 50, № 15. – P. 8941–8953. – DOI: <https://doi.org/10.1021/ie102297d>
5. Crampon C. et al. Pretreatment effect on supercritical CO₂ extraction from microalgae: case study on *Nannochloropsis oculata* // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2013. – Vol. 79. – P. 337–344. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.12.022>
6. Esquivel-Hernández D.A. et al. Microwave-assisted vs. supercritical CO₂ extraction of functional compounds from *Arthrospira platensis* // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17, № 5. – P. 658. – DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17050658>
7. Harit M. et al. Evaluation of carbon dioxide supercritical fluid extraction (CO₂-SFE) on carotenoids recovery from red yeast cells // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2023. – DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04434-z>

8. Allay A. et al. Optimizing ethanol-modified supercritical CO₂ extraction for enhanced bioactive compound recovery in hemp seed oil // *Scientific Reports*. – 2025. – T. 15. – №. 1. – C. 8551. – DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-91441-x>
9. Luksta I., Zake M., Blumberga D. Supercritical CO₂ extraction of wine and beer yeast residues for sustainable bioproduct recovery // *Environmental and Climate Technologies*. – 2024. – Vol. 28, № 1. – P. 356–366. – DOI: <https://doi.org/10.2478/rtuct-2024-0028>
10. Mendes R.L. et al. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris* // *Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 99, № 3. – P. 703–708. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.041>
11. Mendes R.L. et al. Supercritical CO₂ extraction of *Nannochloropsis* sp.: a lipidomic study on the influence of pretreatment on yield and composition // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, № 8. – P. 1854. – DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23081854>
12. Pozo-Bayón M.Á. et al. Application of supercritical CO₂ extraction for the elimination of odorant volatile compounds from winemaking inactive dry yeast preparation // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 58, № 6. – P. 3772–3778. – DOI: <https://doi.org/10.1021/jf904251g>
13. Prado J.M. et al. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Phyllanthus niruri* L.: process optimization and scale-up // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2014. – Vol. 92. – P. 138–146. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.05.009>
14. Machmudah S., Sasaki M., Goto M. Supercritical CO₂ extraction of valuable components from natural resources and biowastes // *Journal of Material Cycles and Waste Management*. – 2012. – Vol. 14, № 3. – P. 211–218. – DOI: <https://doi.org/10.1007/s10163-012-0071-3>
15. Reverchon E., De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2006. – Vol. 38, № 2. – P. 146–166. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>

16. Herrero M. et al. Green processes for the extraction of bioactives from microalgae // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2015. – Vol. 90, № 3. – P. 451–458. – DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.4603>
17. Sovová H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—I. Modelling of extraction curves // *Chemical Engineering Science*. – 1994. – Vol. 49, № 3. – P. 409–414. – DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(94\)87041-6](https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)87041-6)
18. Brunner G. Supercritical fluids: technology and application to food processing // *Journal of Food Engineering*. – 2005. – Vol. 67, № 1–2. – P. 21–33. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.023>
19. Sahena F. et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review // *Journal of Food Engineering*. – 2009. – Vol. 95, № 2. – P. 240–253. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.026>
20. Zlotnikov D.M. et al. Supercritical CO₂ extraction of lipids and phospholipids from baker's yeast // *Journal of Supercritical Fluids*. – 2021. – Vol. 174. – P. 105294. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105294>
21. Ivanova S., Chalova V., Angelov G., Kondeva-Burdina M. Supercritical CO₂ extraction of biologically active compounds from Brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) // *Bulgarian Chemical Communications*. – 2019. – Vol. 51, Special Issue F. – P. 146–151.
22. **Khaw K.Y., Parat M.O., Shaw P.N., Falconer J.R.** Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: a review // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 7. – P. 1186. – DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22071186>