

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

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології
Розробка ефективного способу отримання харчового білка із
Saccharomyces cerevisiae

Допущено до захисту

«__»_____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота
студентки кафедри
Білоус Аліни Дмитрівни

Завідувач кафедри

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__»_____ 2024 р.

Науковий керівник:
д.б.н, проф. Божков А.І.

Консультант
асп. Ганін В.Ю.

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Тема дипломної роботи: « Розробка ефективного способу отримання харчового білка із *Saccharomyces cerevisiae*»: 64 с., 15 рис., 0 схем, 7 табл., 64 літературних джерела.

Об'єкт дослідження: дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*

Мета роботи: розробка технології отримання дріжджових екстрактів та харчового білку *Saccharomyces cerevisiae*

Методи дослідження: фізико-хімічні, аналітичні, статистичні, математичні, порівняльний аналіз, обробка літературних джерел.

У ході дослідження будуть використовуватися сучасні біотехнологічні підходи, що дозволить розробити ефективну, економічно вигідну та екологічно безпечну технологію виробництва харчового білка. Це дослідження сприятиме розвитку інноваційних підходів у харчовій промисловості та допоможе вирішити проблему дефіциту білка, забезпечуючи споживачів якісними і поживними продуктами.

Для досягнення мети було проведено літературний аналіз щодо структури та складу дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Проаналізовано різноманітні способи руйнування клітинної стінки, визначено склад та вихід твердих речовин отриманого дріжджового екстракту. Проведено спектрофотометричний аналіз отриманого дріжджового екстракту. Отримані результати порівнювали з отриманими раніше експериментальними даними.

Результати дипломної роботи: Розроблено комбінований метод передадаптації, автолізу та автоклавування суспензії дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що дозволяє проводити ефективну екстракцію водорозчинних компонентів і забезпечує майже повне руйнування клітинних стінок і вивільнення водорозчинних компонентів.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, дріжджовий екстракт, автоліз, білок, клітинна стінка

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	6
ВСТУП.....	7
1.1 Проблеми харчових технологій	8
1.2 Дріжджі як об'єкт біотехнології	10
1.2.1 Цитоплазма та органели	12
1.2.2 Структура клітинної стінки та мембрани	16
1.2.3 Старіння та розмноження	18
1.3. Компонентний склад дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.4 Дріжджовий екстракт та його склад	23
1.5 Методи отримання дріжджового екстракту.....	26
1.5.1 Механічні методи	26
Бісерний млин.....	27
Гомогенізація під високим тиском(НРН)	27
1.5.2 Фізичні методи	28
Ультразвукова обробка.....	28
Електричні методи екстракції.....	28
1.5.3 Гідроліз.....	29
Хімічний гідроліз	29
Ферментативний гідроліз	29
Плазмоліз	30
1.5.4 Автоліз.....	30
1.5.5 Комбіновані методи екстракції.....	32
1.6 Приклади використання методів екстракції за для отримання дріжджового екстракту <i>Saccharomyces sp</i>	32
1.7 Використання дріжджових екстрактів	35
1.7.1 Використання екстрактів як частини поживного середовища	35

1.7.2 Джерело білку для тварин	35
1.7.3 Виноробство та пивоваріння	36
1.7.4 Імуномодуляторна добавка	37
1.7.5 Елісітор для рослин та культур клітин рослин.....	38
1.7.6 Вплив на мікробіоту трав'янистих жуйних тварин	39
1.7.7 Підсилювач смаку	39
1.7.8 Функціональне харчування	40
Розділ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ.....	41
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	45
Суперкритична CO ₂ -екстракція	45
3.2 Надкритична CO ₂ -екстракція	48
3.3 Оцінка ефективності автолізу та подальшої дії температури та тиску на вихід водорозчинних компонентів з біомаси дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
3.4 Оцінка інтегрального складу водорозчинних компонентів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> отриманих різними способами.....	53
ВИСНОВКИ.....	58
СПИСКИ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	59

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

EFSA (European Food Safety Authority) - Європейське агентство з безпеки харчових продуктів

ERC (Extrachromosomal rDNA circle) - позахромосомне коло рДНК

FADH₂ - флавінаденіндинуклеотид

5'-GMP - 5'-Гуанозинмонофосфат

GRAS (Generally Recognized as Safe) - загально визнаний безпечним

HPH (High-pressure homogenization) - гомогенізація під високим тиском

5'-IMP - 5'-інозинмонофосфат

MSG - Глутамат натрію

NADH - нікотинамідаденіндинуклеотид

PEF (pulsed electric field) - імпульсне електричне поле

SDDP (Spray-dried porcine plasma) - свиняча плазма, висушена розпилювальною сушкою

SCP (Single cell protein) - білок одноклітинних організмів

АФК - активні форми кисню

АТФ - аденозинтрифосфат

ВК - водорозчинні компоненти

ВООЗ - Всесвітня організація охорони здоров'я

Да – Дальтон

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕР - ендоплазматичний ретикулум

РНК - рибонуклеїнова кислота

УФ – ультрафіолет

ВСТУП

В останні десятиліття питання забезпечення населення Землі якісними харчовими продуктами стає все більш актуальним. Зростання чисельності населення, зміна клімату, обмеженість сільськогосподарських ресурсів та необхідність зниження негативного впливу на навколишнє середовище вимагають пошуку альтернативних джерел харчового білку. Одним із перспективних напрямків є використання мікроорганізмів, зокрема дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що добре вивчені і здавна використовуються у харчовій промисловості, для виробництва білкових продуктів. Дріжджовий екстракт — водорозчинні компоненти клітини дріжджів. Показано, що дріжджові екстракти виду *Saccharomyces cerevisiae* мають багатий склад водорозчинних компонентів, білків, амінокислот, пептидів, нуклеїнових кислот, полісахаридів, фенольних сполук, вітамінів та мінералів. Розробка технології отримання дріжджових екстрактів та харчового білка із *Saccharomyces cerevisiae* має потенціал для широкого впровадження у виробництво, що позитивно вплине на стійкий розвиток агропромислового комплексу та покращить продовольчу безпеку.

Метою даної роботи є розробка ефективної технології отримання дріжджових екстрактів та харчового білка із *Saccharomyces cerevisiae*. Для досягнення цієї мети передбачається виконати наступні завдання:

1. Провести літературний аналіз щодо структури та складу клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Проаналізувати літературу щодо складу та властивостей дріжджових екстрактів.
3. Проаналізувати на прикладі експериментальних робіт різні способи отримання екстрактів дріжджів
4. Розглянути галузі використання дріжджових екстрактів.

Розділ 1.ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Проблеми харчових технологій

Продовольча безпека — доступність до достатньої та безпечної їжі для задоволення потреб людей [1]. Населення Землі потроїлося з середини ХХ століття, і зараз становить 8 млрд, додавши 1 млрд з 2010 року. До 2050 року населення збільшиться до 9,7 млрд осіб [2]. Зменшиться придатна до життя територія, в тому і для розведення скота та вирощування рослин. Близько 1 млрд осіб людей страждає через недостачу білку. До 30% дітей центральної Африки та Південної Азії мають бідні на протеїн дієти[3]. Проблеми, що зараз стосуються незабезпечених країн Азії та Африки, торкнуться нас вже в найближчому майбутньому. Для того, щоб позбутися голоду та вирішити проблеми відсутності продовольчої безпеки, необхідно застосувати комплексний підхід, який буде зосереджений на таких аспектах, як стійке підвищення продуктивності сільського господарства, зменшення втрат та відходів продовольства, розвиток ланцюжків поставок та зміцнення інфраструктури продовольчої системи [1]. Продовольча система — це сукупність суб'єктів та їхньої діяльності, залучених до виробництва, агрегації, обробки, розподілу, споживання та утилізації харчових продуктів. Зараз у Європі працює система, що полягає на таких твердженнях [1]:

- Втрата їжі та попередження втрат;
- стійке споживання їжі;
- Виробництво їжі;
- стале перероблення та розподіл їжі;

Проте зміни клімату та діяльність людини, що призвели до перевикористання земель, посухи, зливи, забруднення земель нафтою, солями, важкими металами, а також демографічна криза, що розпалює боротьбу за земельні та водні ресурси, війни, економічні кризи — все це ставить під удар продовольчу безпеку та доступ до харчових ресурсів.

За останні 20 років було випущено більш ніж 5 тисяч наукових статей на тему довкілля та безпеки харчових продуктів, і інтерес до цієї проблеми лінійно росте з кожним роком [4].

Стратегії щодо захисту навколишнього середовища та забезпечення продовольчої безпеки включають [4]:

- Зменшення використання хімікатів, пестицидів, добрив
- Розробка технологій переробки харчових відходів
- Використання відходів та їх переробка
- Розроблення стійких технологій
- Контроль за безпекою продуктів на всіх етапах
- Розробка ефективних технологій пошуку патогенів та контамінацій продукції

Впровадження технологій, що дозволяють отримувати білок, подібний за характеристиками до тваринного, не експлуатуючи ґрунти, може зменшити збитки навколишнього середовища. Тому використання бактерій, дріжджів, мікроводоростей та грибів у біотехнологічному отриманні білку — можливе рішення цього питання. Дріжджі не тільки містять до 65% білку, але й вітаміни групи В, мінерали та інші поживні речовини, а їх амінокислотний склад задовольняє всі потреби людини, що робить їх функціональним харчуванням. Відповідно до Європейського агентства з безпеки харчових продуктів (EFSA), «функціональне харчування» є «харчуванням, яке корисно впливає на одну або кілька цільових функцій організму, окрім звичайних ефектів харчування, таким чином, що покращує стан здоров'я або знижує ризик захворювання» [5]. Можливість використання побічних продуктів інших виробництв у якості поживного середовища для вирощування дріжджів — ще один аргумент до використання цієї технології для встановлення сталого розвитку.

1.2 Дріжджі як об'єкт біотехнології

Випікання хлібу, пивоваріння та виноробство використовувалися з давніх-давен, і вважаються найбільш ранніми прикладами традиційних біотехнологічних процесів. Людство століттями користувалося дріжджами-сахароміцетами, не підозрюючи цього, поки в 1860-х роках Луї Пастер не розкрив роль дріжджів у спиртовому бродінні. Дріжджі були одними з перших ідентифікованих мікроорганізмів, ймовірно, через їх більший розмір порівняно з бактеріями та їх широке використання в пивоварній і виноробній промисловості. Популярність цього виду визначена можливістю маніпуляцій як у лабораторних умовах, так і в промислових масштабах, а дослідження біохімічних, молекулярних, генетичних властивостей зробили його одним із найбільш використовуваних модельних організмів. З'ясування основної структури дріжджів та біохімії виявило подібні молекулярні процеси між дріжджами та іншими еукаріотами [6,7]. Оскільки дріжджі ростуть в помірних умовах, вимагають простого харчування, швидко розмножується (подвоюються кожні 2 години), їх дешевше купити і виростити [6].

Поділ дріжджових клітин закінчується утворенням специфічного рубця (після утворення дочірньої клітини) на поверхні клітини, який дозволяє нам точно визначити кількість минулих поділів. Наступною особливістю дріжджових клітин є те, що вони здатні до необмеженого росту, зокрема, вони не піддаються руйнуванню і легко культивуються, а їх реакція на екстремальні екзогенні фактори дуже схожа на реакцію багатоклітинних.

Як наслідок, світовий ринок дріжджів зазнав значного зростання, що призвело до утворення тисяч тонн дріжджових відходів пивоваріння. Потенційне застосування дріжджової біомаси — виробництво підсилювачів смаку, кормів для тварин, виділення ферментів, одноклітинного білку (SCP), дріжджового екстракту [8].

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* — один із найбільш використовуваних видів для отримання біоактивних компонентів. Можливість рости на відходах різноманітних промисловостей, генетичної модифікації шляхом методики рекомбінантних ДНК — все це робить цей організм універсальним для досліджень та використання. Використання дріжджів у виробництві ферментованих продуктів, таких як вино, пиво, хліб, шоколад, саке та інші алкогольні напої [9]. Стійкий розвиток передбачає циркуляцію економіки та поновне використання проміжних продуктів виробництва. Використовуючи біотехнологію, відходи цих виробництв можна використовувати для отримання біоетанолу, біодизелю, бета-глюканів, білку, екстрактів, ферментів та інших речовин [9]. Наприклад, є методи отримання жирних кислот у формі метилових естерів та їх подальшого використання для продукції біопалив та біодизелю із біомаси пивних дріжджів [10].

Дріжджі — привабливе та дешеве джерело цінних біологічно активних речовин та харчового білку [11]. Проте екстракція цих компонентів можлива лише за умови руйнування міцної клітинної стінки. Існує безліч різноманітних способів екстракції екстракту з дріжджів, проте кожний метод відрізняється за рядом параметрів: виходом продукту, його чистотою, та має свої переваги та недоліки. Технологія має давати високий вихід чистого продукту, при цьому будучи рентабельною. Пошук, порівняння та вдосконалення найбільш ефективного методу екстракції є важливими для отримання якісного кінцевого продукту.

1.2. Характеристика дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* — одноклітинні еукаріотичні організми царства гриби, один із найбільш досліджуваних та використовуваних видів організмів у біотехнології. Це перший організм, чий геном був повністю розшифрований у 1996 році.

Дріжджі мають овальну, еліпсоїдну або циліндричну форму та діаметр від 1 до 7 мкм [12].

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* можуть рости в широкому діапазоні рН (2,5-8,5) і температур (від 2 до 45 °С), що робить їх ідеальним варіантом для використання в різноманітних умовах промислових виробництв. Оптимальним є рН (4-6) і температура від 28 до 37°С [13] .

Дріжджова клітина складається із зовнішньої оболонки, яка називається клітинною стінкою та, разом із мембраною, утримує вміст клітини.

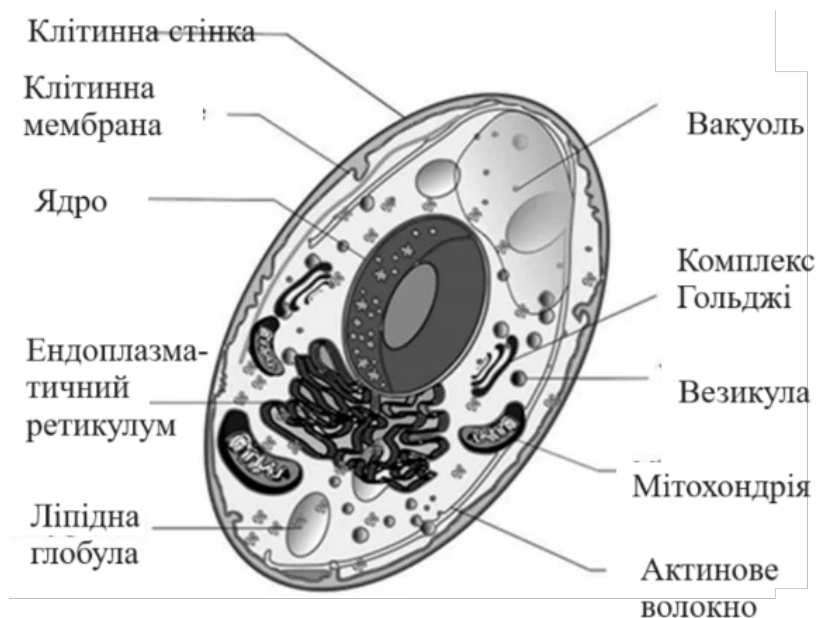


Рис.1.1. Структура клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Адаптовано з [14]

1.2.1 Цитоплазма та органели

Цитоплазма дріжджів, є місцем для багатьох клітинних процесів і простір для внутрішньоклітинного транспорту речовин. Внутрішній рН слабкокислий, є розчинні сполуки низької та середньої молекулярної маси, такі як білки, глікоген та інші розчинні макромолекули. Більші макромолекулярні утворення, такі як рибосоми, протеасоми або ліпідні частинки, суспендовані в цитоплазмі. Цитозольні (неорганелярні) ферменти включають гліколітичні ферменти, комплекс синтази жирних кислот, а

також компоненти та ферменти для біосинтезу білка. Багато функцій, необхідних для цілісності клітини, локалізовані в цитоплазмі (наприклад, компоненти, які утворюють і контролюють каркас цитоскелета) [14]. Цитоскелет складається з мікротрубочок та мікрофіламентів, та відповідає за рухливість органел та поділ клітини. Цитоскелет є асиметричною структурою, що можна побачити під час ділення дріжджів [15].

Ендоплазматичний ретикулум і апарат Гольджі є внутрішніми структурами з найбільшою щільністю білка в цитоплазмі. Ендоплазматичний ретикулум є ключовою органеллою, де здійснюються процеси, що контролюють стабільність, модифікацію та транспортування білків. Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) являє собою складну мережу мембранних структур, частина яких безперервна з ядерною оболонкою, вкритих фосфоліпідним подвійним шаром. Під час брунькування дріжджових клітин ЕР ретельно розподіляється між материнською та дочірньою клітиною [16]. Ендоплазматичний ретикулум становить 10% об'єму клітини. Усі транспортні білки плазматичної мембрани та різні органели виробляються в ендоплазматичному ретикулумі. Перед транспортуванням система допоміжного згортання контролює правильну конформацію білків перед міграцією до апарату Гольджі [14, 15].

В апараті Гольджі відбувається обробка білків і полісахаридів з такими реакціями, як утворення полісахаридних комплексів N-ацетилглікозильованих білків, фосфорилювання олігосахаридів, синтез протогліканів і модифікація ліпідів[14]. Існує також система зворотного транспорту від апарату Гольджі до ендоплазматичного ретикулуму. Система контролю якості повертає білки, які не були правильно згорнуті перед випуском для використання [16].

Вакуоля є лізосомоподібним компартментом і є головною органелою, яка бере участь у внутрішньоклітинному обміні білками та неспецифічному внутрішньоклітинному протеолізі. Вакуоль дріжджів складається з

просвіту, оточеного однією мембраною [16]. Вони не синтезуються *de novo*, але ростуть, розмножуються від попередників. Розмір і кількість вакуолей на клітину різняться. У дріжджів вона займає до 30% об'єму клітини. Також вона підтримує осмотичний тиск, зберігає амінокислоти, фосфатази, катіони Калію, Кальцію та Магнію. Містить 40 гідролаз: ендопептидази, амінопептидази, карбоксипептидази, також нуклеази, глікозидази, ліпази, фосфоліпази та фосфатази, і в цій органелі підтримується слабкокислий рН задля кращої роботи цих гідролаз, у той час як цитозоль має нейтральний рН [15]. Вакуоля є основним місцем для переробки пошкодженого або надлишкового клітинного вмісту за допомогою процесу, який називається аутофагією [16].

Пероксисоми, також звані мікротільцями, є органелами з одношаровою ліпідною мембраною, що мають якнайменш одну оксидазу, що виробляє перекис водню, і детоксикаційну каталазу, ферменту, який здатний метаболізувати перекис водню. У дріжджах є жирні кислоти окислюється виключно пероксисомами [15].

Мітохондрії — це органели, оточені подвійною ліпідною мембраною і складаються з чотирьох окремих субкомпартментів: зовнішньої мембрани, внутрішньої мембрани, міжмембранного простору та матриксу [16]. Зовнішня мембрана є своєрідним укриттям, яке також містить ферменти, що беруть участь у ліпідному обміні. Внутрішня мембрана містить: (1) цитохроми для дихального ланцюга, (2) АТФ-синтазу, пов'язану з дихальним ланцюгом, і (3) ряд транспортних білків для обміну низькомолекулярних компонентів. Матрикс є місцем для циклу трикарбонових кислот і містить мітохондріальну ДНК разом із білок-синтезувальною машинерією [15]. Останні етапи цього окислення відбуваються в мітохондріальному матриксі, каталізуються ферментами циклу лимонної кислоти. Утворені відновлювальні еквіваленти (NADH і

FADH₂) відповідають за генерацію мембранного потенціалу через внутрішню мембрану, який використовується для генерації АТФ шляхом окисного фосфорилювання [16]. Мітохондрії приймають різну морфологію залежно від умов, у яких знаходяться клітини *S. cerevisiae*. В аеробних умовах з достатньою кількістю кисню та доступним джерелом вуглецю, мітохондрія в основному займається диханням і синтезом АТФ [15].

В анаеробних умови відсутній кінцевий рецептор електрону – кисень. Тим не менш, мітохондрії виконують інші функції, які повинні підтримуватися в анаеробних умовах — синтез та десатурація жирних кислот, синтез ергостеролу за участю мітохондріального цитохрому та інші реакції [15].

Ядерна структура дріжджів — це майже кругла органела, яка зберігаючи генетичний матеріал та оточена двошаровою подвійною мембраною (внутрішньою та зовнішньою ядерною мембраною), таким чином відокремлюючи нуклеоплазму від цитоплазми [15]. Ядерна оболонка містить численні ядерні порові комплекси — природні канали для обміну між ядром і цитозолем, які дозволяють проходити невеликим розчиненим речовинам, білкам та молекулам РНК [16].

На відміну від більшості еукаріотичних клітин, ядерна мембрана дріжджів не розчиняється під час мітозу, але розпадається у вищих еукаріотичних клітинах. Ядерце — це щільна ділянка всередині ядра, яка зникає під час мітозу і знову з'являється в інтерфазі. Ядерце містить гени рРНК, і є місцем для синтезу та процесингу рРНК. Воно також бере участь у складанні рибосомальних субодиниць і при процесингу пре-мРНК. Зовні ядро містить унікальний якір для мікротрубочок, корпус для формування веретена поділу [15]. Дріжджовий центр формування веретена поділу, який є функціональним еквівалентом centrosomi, утворює два полюси

мітотичного веретена. Під час мітозу цей центр ділиться, але залишається вбудованим у ядерну оболонку[16].

1.2.2 Структура клітинної стінки та мембрани

Плазматична мембрана, периплазматичний простір та клітинна стінка займають до 15% об'єму клітини та складають міцну захисну оболонку[11]. Функція клітинної стінки полягає в захисті клітини від зовнішніх факторів стресу, як і в утриманні форми та міцності клітини [14]. Клітинна стінка дріжджів складає 15-30% від сухої маси клітини та складається з пов'язаних полісахаридів (до 85%)(маннани, глюкани, хітин) та глікопротеїнів (15-25%)(манопroteїни) [9].

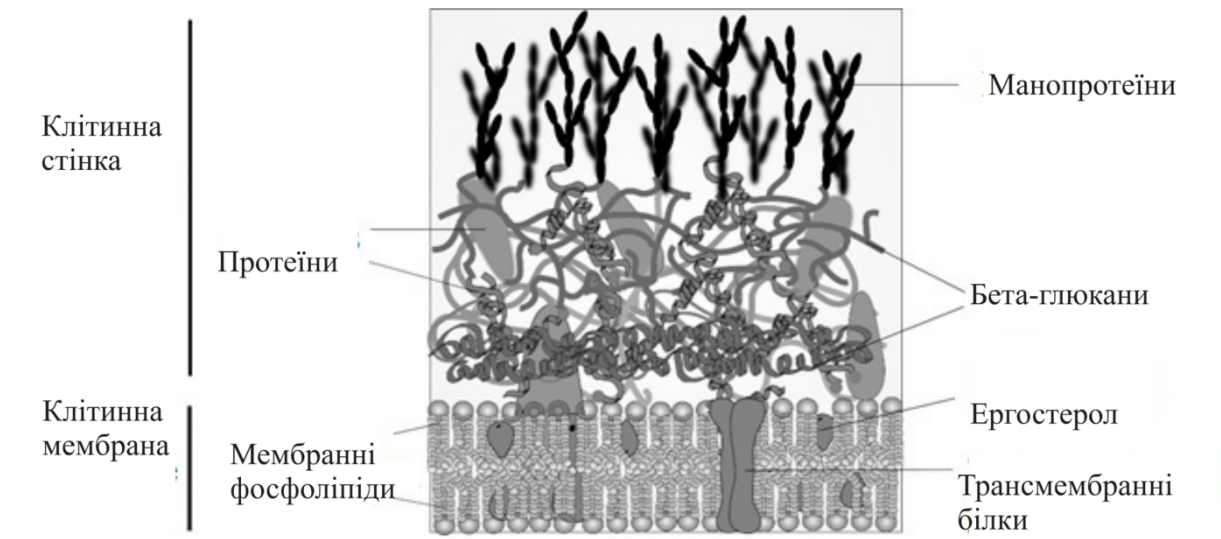


Рис.1.2. Структура клітинної стінки та мембрани *Saccharomyces cerevisiae*.

Адаптовано з [14]

Більшість цих полісахаридів нерозчинні у воді, і вони складають до 80% загального вмісту вуглеводів клітин дріжджів. Глюкани формують мікрофібрилярну мережу за допомогою бета-1,3-зв'язків, у той час як маннани формують альфа-1,6-зв'язки [11]. Бета-1,3-глюкани є лінійними структурами, мають бета-1,3-зв'язки, які є більш слабкими та розчинні у лугах та кислотах. Вони знаходяться близько до мембрани, на внутрішній частині клітинної стінки, та, подібно пружині, зводять до мінімуму

розширення та скорочення, спричинені збільшенням чи зменшенням води в клітині [14]. За нормальних осмотичних умов ця мережа значно розширюється; це пояснює, чому клітини значно зменшуються, коли вони помирають [16].

У той час розгалужені бета-1,6-глюкани мають бета-1,6-зв'язки та є переважно малорозчинними. Вони, у свою чергу, пов'язані з білками та знаходяться всередині клітинної стінки. Бета-глюкани проявляють багатий спектр біологічної активності, до яких належать імуномодуюча, протизапальна, протипухлинна та інші властивості [14].

Манопротейни є гліколізованими білками з манозними полімерами, де полісахариди займають до 90%, а білок — 10%. Ці комплекси розташовані ззовні клітинної стінки [14].

Хітин складає всього 2-4% від сухої маси клітинної стінки [11]. Бета-глюкани будують скелет, який відповідає за стабільність клітинної стінки та морфологію клітини. Окрім цього, манопротейни утворюють аморфний матрикс і волокнистий матеріал поверхні клітини [14].

Периплазматичний простір, що знаходиться між мембраною та клітинної стінкою, містить ферменти інвертазу та фосфатазу, що допомагають розрізати складні комплекси на менші складові, щоб вони могли пройти через мембрану до клітини [15].

Мембрана є фосфоліпідним подвійним шаром, що змінюється в залежності від умов середовища. Також вона відповідає за осмотичний тиск, синтез ферментів для ремонту клітинної стінки, транспорт речовин, захист клітини та передачу сигналів [15].

Показано, що дріжджі, перебуваючи під дією стресу, змінюють структуру та склад клітинної стінки. Наприклад, під дією підвищених температур (35-37°C), у клітині запускається каскад, що призводить до фізіологічних змін та перебудови клітинної стінки. Обсяг хітину та бета-1,6-глюканів збільшується, а бета-1,3-глюканів — зменшується. Кількість

зв'язків між бета-1,6-глюканами та хітином збільшується, надаючи клітинній стінці жорсткість для протистояння стресу[9].

1.2.3 Старіння та розмноження

Загалом, старіння — це складний процес вікових змін, які впливають на індивідуальну адаптивність, підвищену смертність, розмноження, фізіологічну працездатність, здатність сприймати та реагувати на навколишнє середовище та інші характеристики клітин [17]. На сьогоднішній день механізм старіння пояснюється дією вільних радикалів, окислювальним пошкодженням із мінами в експресії певних генів [18]. Дослідження біологічного старіння у різних видів проводяться на популяційному рівні. Дріжджі діляться брунькуванням, тобто вони діляться асиметрично, тобто материнська клітина під час поділу створює меншу за розміром, молодшу, добре помітну дочірню клітину, яка має цілий реплікативний цикл життя. Крім того, тривалість життя дочок залежить від життя їхніх матерів: нові клітини, створені на першій третині життя матері, мають таку ж тривалість життя, як і матері, і чим старша мати, тим буде менша тривалість життя дочірньої клітини [17].

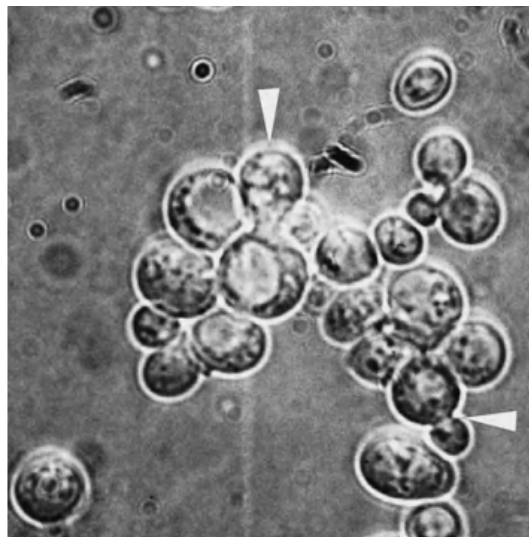


Рис.1.3. Культура клітин *Saccharomyces cerevisiae*. Стрілками позначені клітини, що діляться. Адаптовано з [15]

Це доказує те, що старіння та омолодження викликані накопиченням і асиметричним розподілом факторів старіння. Згідно з Denoth Lippuner A. та співавторами (2014), фактори старіння повинні відповідати чотирьом основним критеріям. По-перше, вони повинні накопичуватися з віком. По-друге, ці фактори повинні бути розділені асиметрично на користь старої клітини. По-третє, запобігання, зменшення або усунення таких факторів має збільшити тривалість життя. По-четверте, обставини, які посилюють вироблення факторів старіння, повинні зменшувати тривалість життя [17].

Пізніше було встановлено, що дріжджі мають від 9 до 40 поділів, з віком вони збільшуються, а швидкість росту та розмір клітини впливають на старіння [18]. Існує два основних підходи до вивчення тривалості життя дріжджів: реплікативна і хронологічна тривалість життя [17, 19, 20]. Реплікативна тривалість життя визначається як кількість бруньок, утворених перед загибеллю, шляхом підрахунку кількості поділів, які зазнала клітина з видаленими бруньками одну за одною. Для порівняння, хронологічна тривалість життя вимірюються як час життя клітини в стані, що не ділиться [19, 20]. Вважається, що реплікативна тривалість життя дріжджів подібна до асиметричного поділу клітин вищих еукаріотів, схожих до стовбурових клітини [17]. Якщо вік дріжджів визначається як реплікативний вік, то час поділу трохи збільшується після 10 поділів і різко в кінці тривалості життя (після 25 поділів), тоді як останні 5 поділів є найдовшими [17].

Розрізняють 3 стадії віку дріжджів: перша — ранній вік, протягом якого зміни не шкодять росту клітин; другий, проміжний вік, протягом якого починають накопичуватися фактори старіння; і по-третє, пізній вік, коли відбуваються останні поділи перед смертю. На першому етапі клітина здатна контролювати і позбавлятися від факторів старіння і не накопичує їх багато, тому залишається кілька факторів старіння та їх побічні продукти.

На другому етапі кілька факторів старіння посилюються одночасно, з можливим синергічним ефектом і зниженням клітинної активності. Крім того, втрата гнучкості регуляторних мереж може спричинити неадекватну реакцію на зміни навколишнього середовища, що призведе до накопичення нових збитків. Зрештою, коли клітина пошкоджена занадто сильно, вона гине, або як прямий вплив, або через індуковані вторинні ефекти [17]. Припускають, що деякі старі дріжджові клітини завершують апоптоз або запрограмовану клітинну смерть на користь інших клітин [18].

Вікові зміни впливають на різні органели і структури клітини, крім того, ці порушення асиметрично передаються між материнською та дочірньою клітинами [20]. Загалом дріжджові клітини стають значно більшими, час їхнього поділу збільшується так само, як кількість рубців від бруньок з кожним поділом [17]. Коли клітини старіють, позахромосомні кільцеві молекули ДНК (ERC) у дріжджовому ядрі утворюються шляхом гомологічної рекомбінації повторів рДНК. Вони експоненціально накопичуються в материнських клітинах. Вони відповідають усім чотирьом критеріям фактора старіння, оскільки вони накопичуються та відокремлюються в старих клітинах, тривалість життя дріжджів може бути збільшена за рахунок зменшення утворення ERC, а їх впровадження в молоді клітини зменшується. реплікативну тривалість життя. Існують також епігенетичні зміни, пов'язані зі старінням, зокрема зменшення кількості гістонів, які можуть використовуватися в утворенні нуклеосом [17, 21]. Кислотність вакуолей відіграє вирішальну роль у підтримці функції мітохондрій і необхідна для нормальної реплікативної тривалості життя. З плином часу їх розмір зростає, а кислотність падає, але дочірні клітини народжуються з відновленою кислотністю [17]. У 1956 році Харман запропонував теорію, яка пов'язує молекулярне пошкодження, спричинене збільшенням утворення активних форм кисню (АФК) у мітохондріях, зі старінням. У старих клітинах мітохондрії агрегуються і фрагментуються,

тому вони не можуть служити так добре, як могли б, тому їх мембранний потенціал знижується, що впливає на процес накопичення енергії під час окисного фосфорилювання, а рівні АФК підвищуються, що може призвести до апоптозу. Навпаки, дочірні клітини мають низький рівень АФК і високий мембранний потенціал, але чим більше відбувається поділів, тим більше пошкоджених мітохондрій передається дочірнім, хоча вони відновлюють їх краще, ніж старі клітини [22]. Карбонільовані білки, форма білків, на які впливає окислювальне пошкодження, а також агреговані білки накопичуються в цитоплазмі старих клітин. Довжина теломер дріжджів не змінюється протягом реплікативного та хронологічного старіння через постійну активність теломерази [17].

1.3. Компонентний склад дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Дріжджі, як і бактерії, містять до 65% білку від сухої маси, у той час як м'ясо містить до 45%, а соя - до 35% [13].

Дріжджі містять від 30 до 50% вуглеводів від сухої маси, 4-7% ліпідів, які переважно представлені насиченими жирними кислотами та мононенасиченими жирними кислотами. Зола становить 5-10% від біомаси, і її частка залежить від поживного середовища [13].

Таблиця 1.1

Загальний склад сухої маси дріжджів [11, 13, 23]

Клас біомолекул	Відсоток від сухої маси дріжджів
Білки	40-65%
Ліпіди	4-7%
Нуклеїнові кислоти	8-12%
Вуглеводи	25-35%
Зола	5-10%

Біомаса дріжджів також містить мікроелементи, такі як: Кальцій, Мідь, Залізо, Фосфор, Калій, Магній, Манган, Селен, Цинк [13]. При цьому

екстракт майже не містить Натрію, що робить дріжджовий екстракт альтернативою солі як підсилювачу смаку.

Дріжджі та дріжджовий екстракт багаті на вітаміни групи В, а саме [23, 24]:

- тіамін, або вітамін В₁, що важливий для нервової функції;
- рибофлавін, або вітамін В₂, що має вагому роль для здоров'я шкіри та зору;
- ніацин, або вітамін В₃, який цінний для здоров'я шкіри, травної та нервової систем;
- фолієва кислота, або вітамін В₉, що відповідає за синтез ДНК та оновлення клітин;
- та кальцій пантотенат, або вітамін РР, що важливий для енергообміну.

Таблиця 1.2

Склад клітинної стінки дріжджів [9]

Клас біомолекул	Відсоток від сухої маси дріжджів	Відсоток від сухої маси клітинної стінки
Глікопротеїни (Манопroteїни)	5-10%	15%
Полісахариди (глюкани) (хітин) (маннани)	25-35%	85%

Бета-глюкани, отримані з пивоварних дріжджів мають широкий спектр корисних властивостей, таких як: антибактеріальні, антиоксидантні властивості, а також понижують рівень ліпідів у крові, мають імуногенний ефект та підвищують стійкість тварин до хвороб [25]. Вони

використовуються не тільки як біологічно активна добавка, а й як загусники в йогурті, крім того, вони прискорюють швидкість його бродіння [26]. Крім того, бета-глюкани використовуються як емульгатори, а дріжджовий екстракт і частинки клітинної стінки можуть бути використані як мікрокапсулюючі агенти [27].

1.4 Дріжджовий екстракт та його склад

Дріжджовий екстракт, або дріжджовий гідролізат, автолізат — водорозчинна фракція дріжджової біомаси [28]. Склад екстрактів залежить від умов ферментації, складу поживного середовища, виду та штаму дріжджів, тому досягти сталого складу проблематично [29]. Далі наведені середні значення деяких екстрактів *Saccharomyces cerevisiae*.

Таблиця 1.3

Вміст вітамінів на 100г дріжджового екстракту[23]:

Вітамін	мг/100 г екстракту
Тіамін, вітамін B1	3
Рибофлавін, вітамін B2	11,9
Ніацин, вітамін B3	68
Фолієва кислота, вітамін B9	3,1
Кальцій пантотенат, вітамін B5	30

Таблиця 1.4

Вміст мінералів (мг) на 100 г екстракту [23]:

Мінерали	мг/100 г екстракту
Кальцій, Ca	120
Магній, Mg	200
Калій, K	3,3
Мідь, Cu	5
Натрій, Na	500

SCP (Single cell protein), або білок одноклітинних організмів, — це висушена біомаса мікроорганізмів, яку можна отримувати за допомогою біоконверсії відходів інших виробництв [13]. SCP отримують швидше, дешевше та легше, ніж тваринний або рослинний білок, при цьому поживним середовищем можуть бути відходи сільського господарства, молочної промисловості, пивоваріння, виноробства, виробництва та обробки соків, фруктів, паперу [13]. Хоча ці середовища і містять багатий склад компонентів, для культивування дріжджів і отримання SCP потрібне джерело Нітрогену — амонійні солі, нітрати, триптон, або той же дріжджовий екстракт [13].

Дріжджовий екстракт містить більше 20% амінокислот, що підсилюють смак — глютамінова та аспарагінова кислота, як і такі речовини, як глютамат натрію (MSG), 5'-гуанозинмонофосфат (5'-GMP) та 5'-інозинмонофосфат (5'-IMP), які відповідають за незвичний “м'ясний”, солодкий або солоний смак та аромат екстракту, та додаються до м'яса, супів, соусів, снєків, фастфуду, консервованої їжі [13, 23, 30]. Регулюючи різні показники технології, такі як рН, температура та час екстракції, можна досягти певних смакових властивостей [30].

Гідролізат дріжджів містить замінні і незамінні амінокислоти, вітаміни, мінерали, пептиди, клітковину, нуклеїнові кислоти, фенольні сполуки та інші водорозчинні речовини. Показано, що дріжджовий екстракт містить протизапальні та антиоксидантні сполуки, а також антимікробні

пептиди, що сповільнюють ріст патогенних мікроорганізмів та можуть використовуватися як консерванти [31, 32]. Біоактивні пептиди є фрагментами білків, що складаються з 2-20 амінокислот, отриманими під час протеолітичного розщеплення та мають різноманітні функції та властивості в залежності від джерела. Ці пептиди поділяються на три групи: ті, що з'являються під час автолізу або гідролізу, та відповідають за властивості екстракту; ті, що вивільняються під час ферментації дріжджів та впливають на склад ферментованого продукту; ті, що з'являються під час фази росту та мають антимікробні властивості [31]. Поживність дріжджового екстракту робить його ідеальним додатком до поживних середовищ для росту мікроорганізмів [13]. Дріжджі містять до 40% вільних амінокислот, серед яких більшість становлять олігопептиди вагою від 2 до 3 кДа [30].

Таблиця 1.5

Порівняння складу *Saccharomyces cerevisiae*, автолізу та норми ВООЗ щодо вмісту незамінних амінокислот в білку [13, 30, 33]:

Амінокислота	Saccharomyces cerevisiae	Автолізат дріжджів	Згідно ВООЗ
	мг/г білку		
Гістидин	23,5	—	15
Ізолейцин	37	23,7	15
Лейцин	63	65,1	21
Лізин	65	47,2	18
Метіонин+цистеїн	14+9	23,8	20
Фенілаланін+тирозин	33+26	90,6	21
Треонін	48	61,3	11
Триптофан	9	11,9	5
Валін	53	69,7	15

Дріжджовий екстракт, або дріжджовий гідролізат, визначений як безпечний до вживання (Generally Recognized as Safe, GRAS). Цей статус надає йому статус “натурального підсилювача смаку” й дає ряд переваг при маркетингу на ринку.

Загалом, продукція SCP виглядає наступним чином [13]:

- 1) Ферментація (використання поживного середовища, відходів промисловості) і отримання дріжджової біомаси;
- 2) Екстракція внутрішньоклітинних компонентів;
- 3) Фільтрація та очистка;
- 4) Сушка;
- 5) Готовий продукт — мікробний білок.

Вихід продукту залежить від багатьох складових. Навіть склад дріжджової клітини зміниться за рахунок зміни умов навколишнього середовища, тому контролюючи умови ферментації, можна отримати продукти різного поживного складу. В залежності від використаного поживного середовища, методу екстракції, очистки та сушки, можна отримати вихід від 30 до 61% білку для *Saccharomyces cerevisiae* і до 70% білку для інших видів дріжджів [13, 34]. Дріжджовий екстракт має високий вміст нуклеїнових кислот, що може призвести до таких проблем, як подагра та камені в нирках, тому в готовому продукті треба зменшити вміст нуклеїнових кислот до 1% . Це можна зробити, обробивши екстракт з NaOH, додаванням або активацією рибонуклеаз, або термічним шоком [13].

1.5 Методи отримання дріжджового екстракту

Для промислового виробництва є безліч методів отримання дріжджового екстракту — механічні, серед яких бісерний млин та гомогенізація під високим тиском (HPH), фізичні, такі ультразвукова обробка та імпульсне електричне поле (PEF), гідроліз, викликаний хімічними, ферментативними методами або плазмолізом, автоліз, що є природним процесом, а також комбіновані методи. Кожний з цих методів має свої сильні та слабкі сторони.

1.5.1 Механічні методи

Для промисловості , або масштабування, використовують механічні методи руйнування клітинної стінки, які мають високий вихід продукту та високу ефективність, проте неселективно вивільняють внутрішньоклітинні компоненти. Клітинний осад, що формується після застосування механічних методів, містить всі компоненти клітини, тому для подальшої очистки потрібно використати більше енергії та селективних методів [11]. Окрім цього, нагрівання зразка та необхідність декількох запусків з подальшим охолодженням лімітують використання цих методів.

Бісерний млин

Один із найбільш ефективних механічних методів. Прилад складається з камери з сорочкою, обертового валу та мішалок. Вважається, що руйнування клітинної стінки при цьому методі викликано силами ущільнення або зсуву з передачею енергії від кульок до клітин [11]. Не дивлячись на високу ефективність екстракції, виділення біоактивних компонентів вимагає затрат на охолодження та подальшу очистку, що додає вартості до отриманих речовин, і цей метод не є ідеальним для селективної екстракції біологічно активних речовин [11].

Гомогенізація під високим тиском (HPH)

Цей метод найбільше використовується в молочній промисловості для отримання емульсій та однорідних продуктів. Суть методу полягає в підвищенні тиску суспензії ,що проходить явища турбулентності та зсуву з подальшим її пропусканням через вузький клапан [11, 35]. Ефективність цієї технології залежить від тиску при гомогенізації та кількості запусків, або прогонів, суспензії [36]. Лише гомогенізація, без подальшого немеханічного методу, продукує низький вихід речовин [35] . Ця технологія може пришвидшити хід автолізу, або викликати неразючі руйнування клітини, що може використовуватись у виноробстві [37] .Хоча цей метод підходить для промислового масштабування, екстрагує високомолекулярні компоненти та білки, він має деякі недоліки, які полягають на неселективності методу,

тобто руйнуванні клітини, її стінки та внутрішньоклітинних компонентів й підвищенні коштів готового продукту за рахунок витрат на його подальшу очистку [11, 36]. Окрім цього, затрати на утримання, роботу та охолодження такого приладу та суспензії є ще одним мінусом цього методу [11].

1.5.2 Фізичні методи

Ультразвукова обробка

Суть методу полягає в обробці суспензії ультразвуком, який викликає вибух кавітаційних бульбашок, наповнених газом, створюючи ударну хвилю. Ці хвилі схожі на дію високого тиску, що спричиняє руйнування клітинної стінки [11]. Цей метод є ефективним для лізису клітин, проте руйнує і клітинну стінку, і внутрішньоклітинні компоненти, що призводить до впровадження обов'язкових етапів розділення отриманого осаду. Окрім цього, нагрівання зразку також викликають труднощі при застосуванні цього методу [36].

Електричні методи екстракції

Суть електричних методів полягає в дії електричного поля або імпульсів, зазвичай 5-50 кВ/см, на суспензію клітин, тим самим руйнуючи клітину й вивільняючи її вміст [11, 36]. Контролюючи різні параметри, такі як час дії, сила електричного поля, напруга та інші, можна досягнути селективного пошкодження клітинної стінки та електропорації мембрани [11]. Імпульсне електричне поле (PEF) викликає втрату бар'єрної функції мембрани, або електропорацію мембран, щоб вивільнити внутрішньоклітинні компоненти клітини, не руйнуючи її [38]. Наприклад, застосування імпульсного електричного поля викликає електропорацію вакуолі, у якому зосереджена протеолітична активність дріжджів, що може пришвидшити подальший автоліз [39]. Дія PEF може інактивувати до 90% популяції клітин дріжджів [38]. Попередня обробка клітин PEF може прискорити час автолізу на 78%, при цьому збільшуючи вихід твердих

речовин до 10% [39]. Окрім вивільнення іонних та внутрішньоклітинних компонентів, що поглинають світло при 260 та 280 нм(нуклеїнові кислоти, білки, пептиди), PEF може екстрагувати манопротейни — компоненти клітинної стінки [38]. Ця методика не викликає тотальне руйнування клітини, сильно не нагріває суспензію, тому є більш делікатним методом, за якого можна відділити клітинну стінку від внутрішньоклітинних компонентів клітини, що відрізняє її від інших фізично-механічних методів, як обробка ультразвуком чи гомогенізація під високим тиском [38, 39]. Недоліком цього методу є недостатня ефективність для руйнування клітинної стінки дріжджів та виділення високомолекулярних сполук [36].

1.5.3 Гідроліз

Методи, засновані на специфічному лізисі клітинної стінки, часто лімітовані малими масштабами й дорогавартісні в промисловості, при цьому дозволяють селективно й делікатно виділити цільові продукти без подальшого забруднення [11, 36].

Хімічний гідроліз

Використання хімічних речовин, зазвичай агресивних кислот, наприклад HCl, що розчиняють або руйнують клітинну стінку та мембрану, що дозволяє внутрішньоклітинним речовинам проникнути через мембрану за межі клітини [11, 39]. Хоча вихід і є великим, передусім за рахунок розчинення як компонентів клітинної стінки, так і внутрішньоклітинних структур, недоліками є забрудненість екстракту хімічними реагентами та їх похідними, що потребують подальшого виведення задля отримання чистого продукту[11, 13].

Ферментативний гідроліз

Використання ферментів бактеріальної, рослинної, грибної природи для руйнування клітинної стінки й обережного вивільнення внутрішньоклітинних компонентів без їхнього руйнування. Ферменти діють

на складові клітинної стінки, не руйнуючи структуру клітини, уможлиблюючи селективну екстракцію. Ферменти мають протеолітичну, амілазну, деаміназну, ліполітичну активність, а також активність для розкладання клітинної стінки, РНК-руйнуючу активність [40]. Найчастіше використовують протеази, папаїн, зимолазу, глюканазу, пептидазу, ліпазу, лізоцим; можливе використання бета-глюканаз [37]. Метод є високоселективним та високоефективним, при цьому ціна ферментів часто є високою, роблячи промислове масштабування менш вірогідним [11].

Плазмоліз

Це модифікований автоліз, за якого до суспензії додаються допоміжні речовини, як солі чи розчинники (етанол, NaCl, етилацетат) [40]. Ці речовини викликають осмотичний стрес, що призводить до руйнування клітинної стінки або мембрани, та подальшого вивільнення внутрішньоклітинних компонентів. Хоча цей метод не потребує дороговартісного обладнання, але кінцевий продукт може містити солі чи проміжні продукти розкладення розчинників, що впливає на чистоту та нешкідливість екстракту, тому ці речовини потрібно вимивати чи прибирати задля безпеки споживача [39].

1.5.4 Автоліз

Автоліз є природнім процесом, викликаний старінням клітин, та настає після клітинної загибелі. Але ми можемо контролювати та пришвидшити цей процес, помістивши клітини в агресивне навколишнє середовище (підвищена температура, тиск і тд.), викликаючи літичне розкладення внутрішньоклітинних компонентів клітини, а саме глікогену, білків, нуклеїнових кислот (рис.1.4). Екстракція вуглеводів під час автолізу є двостадійним явищем: на першій стадії розкладається більшість резервних вуглеводів, таких як трегалоза та глікоген. Після цього настає стаціонарна фаза, за якою, через деякий час, починають розкладатися структурні вуглеводи — глюкани та манани клітинної стінки [40].

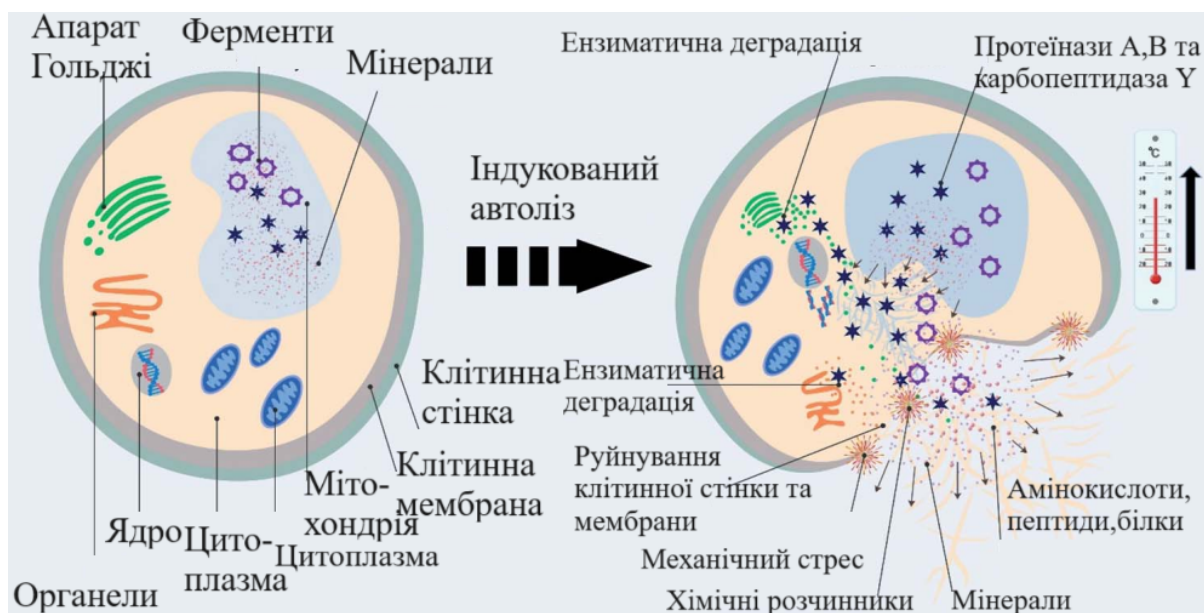


Рис.1.4 Схематичне зображення морфологічних змін при індукованому автолізі дріжджів. Адаптовано з [41]

Страждає також і клітинна стінка, вивільняючи водорозчинний вміст клітини в навколишнє середовище. Протеази вакуолі розкладають білки всередині клітини, саме там міститься найбільша протеолітична активність за рахунок протеаз А, В та карбопептидази У [35, 39]

Цей метод зазвичай застосовують за температур від 30 до 60 °С протягом 12-48 годин з перемішуванням [13, 42]. Більш довгий час автолізу дає більший вихід твердих речовин, при цьому чим довший автоліз, тим більше ризик контамінації [39]. Також сапоніни набувають популярності як допоміжні реагенти при автолізі. Недоліками цього методу є низький вихід продукту, потреба подальшої очистки продукту, ризик контамінації через довгий час інкубації [13, 35]. Для покращення результату можливе додавання допоміжних речовин, наприклад, сапонінів із *Quillaja saponaria*, які є медичним засобом, і показують протизапальні та протимікробні властивості. Головний механізм дії — пов'язування з ліпофільними спиртами, такими як холестерол, що знаходяться в клітинній мембрані, тим самим підвищуючи проникність мембран [43]. Загалом, автоліз протягом 24 годин є найбільш оптимальним за виходом білків та твердої речовини по

відношенню час/вихід продукту, оскільки після 24 год досягається плато і різниця між 24,48 і 72 год здебільшого не є суттєвою [34].

1.5.5 Комбіновані методи екстракції

Використання та розробка комбінованих методів екстракції — один із головних напрямків дослідження при виробництві дріжджових екстрактів [42]. Механічна обробка суспензії дріжджів призводить до швидшої активації ендогенних ферментів та запуску автолізу пришвидшуючи процес продукції екстракту [35]. Вихід твердої речовини від гомогенізації з подальшим автолізом був більшим, ніж при гомогенізації, що можна пояснити тим, що попередня обробка під тиском руйнує бар'єри між компонентами клітини, вивільняючи ендогенні ферменти та дозволяючи їм взаємодіяти зі своїми субстратами [35].

Подальша очистка за допомогою центрифугування, мікронізації, мембранної фільтрації проводяться задля ізолювання цільових біоактивних компонентів.

1.6 Приклади використання методів екстракції за для отримання дріжджового екстракту *Saccharomyces sp.*

Різні методи дають різний вихід твердих речовин, білків, ліпідів, вуглеводів та інших компонентів. Навіть використання одного методу в різних експериментальних групах або дослідях може дати різні показники, оскільки умови росту, склад середовища та інші фактори впливають на склад та метаболізм дріжджів.

Таблиця 1.6

Вихід речовин дріжджових екстрактів для методу автолізу та його модифікацій

Дріжджі	Методика	Результати	Висновки	Джерело
Біомаса <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red після ферментації	Автоліз, 55 °С, 48 годин+сапоніни з Q.saponaria(0,08% w/v)	Вихід у 29,3% незамінних амінокислот;	Сапоніни є ефективною допоміжною речовиною при автолізі дріжджів для виходу вільних амінокислот	[43]
		Вихід у 44,9 г/л вільних амінокислот		
Біомаса пивних дріжджів <i>S. cerevisiae</i> після продукції лагера	Автоліз, 45,50,55 і 60°С; 8, 24,48 і 72 годин, рН 6, подальша пастеризація (80°С,30 хв)	Найбільший вихід твердої речовини при 45°С (64,1%) і 50 °С(56,8%)	Автоліз при 50 °С протягом 24 год є найбільш оптимальним варіантом по відношенню час/вихід продукту	[34]
		Найбільший вихід вуглеводів при 60 °С(15,5%) і найнижчий при 45°С (12,35) після 72 год.	З підвищенням температури підвищується вихід вуглеводів	
		Найбільший вихід білку/сухий екстракт : 48,7% при 50 °С і найнижчий 38% при 60 °С	Активність протеаз за 45 і 50 °С і послаблення активності за 55 і 60 °С	
Біомаса пивних <i>S. cerevisiae</i> після ферментації	Автоліз 25,38,50 °С протягом 1,5; 3,8; 6 та 7 годин при перемішуванні(200 грм) з подальшою інактивацією (90°С, 15 хв)	Загальна кількість фенолів(TPC): найбільше значення за 38 °С, 6 годин	В комбінації : 36°С, 6 годин є оптимальними для отримання речовин з протизапальними та антиоксидантними властивостями з ферментованих пивних дріжджів	[32]
		Антиоксидантна активність(FRAP): найбільше значення за 40 °С , 6 год		
		Активність ACE-I : найбільше значення за 31 °С,6 годин		

Пекарські дріжджі <i>S. cerevisiae</i>	Автоліз, 52 °С, 72 год., рН 5,2, перемішування 120 грм	папайн(2,5%), 72 год		Папайн у концентрації 0.5% давав такий самий вихід, як і автоліз; папайн(5.0%) давав вихід, подібний до 2.5%	[40]	
		дріжджі:	інактивовані			активні
		тверді речовини	59,84%			61,95%
		білок	57 мг/мл			
	Ферментативний гідроліз: рН 6, інактивація ферментів при 100 °С,10 хв; папайн (0.5, 1.0, 2.5, 5.0%) або літіказа(0.005, 0.010,0.020, 0.025%), 60 °С	вуглеводи	10 мг/мл			Папайн є протеолітичним ферментом, тому вихід вуглеводів є малим
		Літіказа(0.025%), 72 год				
		дріжджі:	інактивовані	активні		Використання активних дріжджів збільшило вихід речовин
		тверді речовини	63,52%	69,15%		
		білок	10 мг/мл	37 мг/мл		
		вуглеводи	94 мг/мл	98 мг/мл		

Таблиця 1.7

Вихід твердих речовин дріжджових екстрактів для комбінованих методів екстракції

Дріжджі	Методика	Результати	Висновки	Джерело
Біомаса пекарських <i>S. cerevisiae</i>	Одностадійна гомогенізація під високим тиском (НРН) (до 35 °C) від 100 до 800 бар, від 1 до 8 запусків; Індекс дезінтеграції клітин: 1 - макс. руйнування клітини, 0 - немає руйнування	Індекс дезінтеграції клітин: 1 запуск за 500 бар : 0,47; 3 запуски за 500 бар : 0,79 ; 1 запуск за 800 бар: 0,87; 3 запуски за 800 бар: 0,97	Експоненційна модель описує кількість запусків та тиск для дезінтеграції клітин: чим вище тиск, тим менше запусків потрібно для більшого індексу дезінтеграції клітин	[35]
		Вихід сухої речовини: 34,9% (800бар/3 запуски)(гомогенізація)		
		Вихід бета-глюканів після екстракції: до 67%(800бар/3 запуски)при гомогенізації+автолізі (додатковий вихід 10% бета-глюканів у порівнянні з контролем (автоліз 24 год)		
	Подальший Автоліз, 52 °C, 24 год, рН 5,5, перемішування 180 rpm	Вихід білку: 52% (800бар/3 запуски)при гомогенізації; 29% після 24 год автолізу	До 8 запусків з тиском 100 бар не мали значного впливу на дезінтеграцію клітин(0,07 при 1 запуску)	
		Вихід сухої речовини: 47% (автоліз);	Попередня гомогенізація пришвидшує автоліз	
		Вихід сухої речовини: 62% (гомогенізація+автоліз);	Чим вище індекс дезінтеграції після гомогенізації, тим вище вихід твердих речовин	

Виноробні дріжджі <i>Saccharomyc es bayanus</i>	Двостадійна гомогенізація під високим тиском (НРН) з двома клапанами : 1) 0,50, 100 і 150 МПа; 2) 5 МПа; 19 °С	Кількість живих клітин (Log CFU/g) :		Термоліз призвів до повної інактивації клітин, при цьому гомогенізація зменшила кількість живих клітин на 1-2,2 одиниць	[37]
		Контроль:	11 одиниць		
		Гомогенізація: 0-150 МПа:	від 10 до 8,7 одиниць		
		Термоліз:	0 одиниць		
		Вихід водорозчинних білків: мг/г		Проходження суспензії клітин через клапан (0 мПа) вже підвищило вихід білку; вихід білку при 150 МПа значно не відрізняється від термолізу	
		Контроль:	14		
		Гомогенізація: 0-150 МПа:	29-51		
	Термолізат: нагрівання суспензії до 121 °С, 2 год у автоклаві	Термоліз:	58	Термоліз та гомогенізація (150 МПа) дають найбільший вихід вільних амінокислот	
		Вихід вільних амінокислот:мг/г			
		Контроль:	1,5		
		Гомогенізація: 0-150 МПа:	2,9-3,7		
		Термоліз:	4		

Біомаса пекарських <i>S. cerevisiae</i>	Імпульсне електричне поле (PEF) (від 5кВ/см до 20 кВ/см) та від 1 до 2000 імпульсів, , 25°C, частота 300 Гц, моніторване на осцилоскопі. Індекс дезінтеграції: 1 - макс. руйнування клітини, 0 - немає руйнування	Індекс дезінтеграції:		Підвищення сили ел. поля та кількості імпульсів збільшують індекс дезінтеграції	[39]
		5 кВ/см, від 250 до 2000 імпульсів	від 0,35 до 0,97 відповідно		
		20 кВ/см, від 5 до 100 пультів	від 0,22 до 0,99 відповідно	Концентрація білку росте експоненційно протягом перших 16 годин, виходячи на плато після 20 годин автолізу. Кінцевий результат (PEF+автоліз) або (автоліз) сильно не відрізняються.	
		Вихід білку :			
		Індекс дезінтеграції від 0 до 1 після обробки PEF:	початкова концентрація білку: від 180 до 310 мкг/мл		
	кінцева концентрація білку: 2500 мкг/мл				
	Подальший Автоліз, 52 °C, 24-72 год, рН 5,5, перемішування 180 грт+подальша інактивація (90 °C, 5 хв)	Вихід білку: 5 кВ/см - 20 кВ/см: більші значення виходу білку, ніж при контролі, ріст до 16 годин з виходом на плато		Чим більша кількість імпульсів та сила ел. поля, тим більший вихід білку	
		Вихід твердих речовин:			
		Автоліз: 50%			
		Автоліз + PEF(індекс дезінтеграції=1): 60%			

1.7 Використання дріжджових екстрактів

1.7.1 Використання екстрактів як частини поживного середовища

Екстракти мають багатий склад вітамінів, мікроелементів, амінокислот, пептидів та білків, що є гарним джерелом для росту грибів та мікроорганізмів. Наприклад, клітини яєчника китайського хом'яка (СНО), що широко використовуються для продукції рекомбінантних білків, з додаванням екстракту дріжджів набули більших розмірів та більшої ваги на 37%. Окрім цього, загальна кількість жирних кислот також збільшилася відносно контролю без екстракту на 44%, а вміст білку вже на 10-й день був таким самим, як на 12й день без екстракту [44]. Гриби часто мають дріжджовий екстракт як один із головних компонентів поживного середовища, окрім джерела вуглеводів та агару, тому склад екстракту впливає на синтез вторинних метаболітів грибів [29]. На прикладі декількох видів *Fusarium*, дріжджовий екстракт як компонент поживного середовища може впливати на синтез деяких вторинних метаболітів, збільшуючи їх вихід, але результат різниться від виду до виду та від продуцента екстракту [29].

Використання дріжджового екстракту може дати різницю у 50% росту *Escherichia coli*. Після 18 годин культивування з дріжджовим екстрактом (5 г/л) призвело до оптичної густини (мутності), що є критерієм прогресії росту мікроорганізмів, від 6 до 10 одиниць, у той час як контроль мав 2 одиниці, що свідчить про збільшення росту культури у 3-5 разів у порівнянні з контролем [45].

1.7.2 Джерело білку для тварин

Білок та екстракти, отримані з дріжджів, можуть бути цінними добавками для кормів для годівлі худоби та аквакультури. Дріжджі можуть бути частиною корму для риби, оскільки містять до 60% білку, окрім цього наявність бета-глюканів є імуномодуляторами й можуть підвищувати

імунну відповідь аквакультур. Наприклад, білок дріжджів засвоюється на 67% у дієті атлантичного лосося, складаючи 70% від його дієти. Подальший автоліз збільшив засвоєння білка на 11%, але цей показник залежить від виду дріжджів, і для деяких видів він не збільшується [46].

Поросята піддаються дії багатьох факторів, що можуть вплинути на їх здоров'я та смертність. Збалансована дієта з гарним джерелом білку є гарним рішенням для підтримки імунітету поросят. Розроблена добавка, свиняча плазма, висушена розпилювальною сушкою (*SDPP*), є тваринним білком для підвищення характеристик поросят, але є недешевою у виробництві та може становити біоризик на свинофермах. Використання дріжджового екстракту має позитивний вплив на імунітет, ріст та здоров'я травного тракту поросят. Добавка 50% у вигляді 20 г/кг дріжджового екстракту до *SDPP* має подібний вплив на здоров'я поросят, як і чистий *SDPP*, і може частково замінити це джерело білку для поросят, при цьому зберігаючи результат *SDPP* [47]. Свиноматки, яких годували раціонами з різною кількістю дріжджового екстракту від пізньої поросності до лактації, зменшували втрату ваги під час лактації, покращували продуктивність поросят та зменшували окислювальний стрес як свиноматки, так і поросята, при цьому додавання 10 г/кг екстракту до раціонів свиноматок має найвищу ефективність [48].

1.7.3 Виноробство та пивоваріння

Автоліз є потужним інструментом при дозріванні білого, бургундського або ігристого вина [37]. Під час цього процесу вивільняються різні водорозчинні компоненти, такі як білки, пептиди та вільні амінокислоти, естери, а також полісахариди та манопротеїни, компоненти клітинної стінки, які впливають на якість вина [37]. Винороби прагнуть отримати автолізовані дріжджі, щоб зменшити час дозрівання вина, яке може займати місяці чи роки [38].

Пептиди та амінокислоти, отримані під час автолізу, можуть давати неприємний запах або смак, оскільки ними можуть живитися інші мікроорганізми [37].

Наприклад, гомогенізація під високим тиском є гарним варіантом для пришвидшення автолізу виноробних дріжджів, при цьому не руйнуючи й не нагріваючи білки клітини, що призводить до зменшення вивільнення амінокислот та їх продуктів. Окрім цього, після гомогенізації, були отримані й інші летючі компоненти, що відповідають за приємний запах та смак вина, такі як спирти, ефіри та жирні кислоти. Ця методика може пришвидшити старіння, або витримку вина, знижуючи вміст речовин, що мають неприємний запах, проте не інактивує клітини дріжджів повністю [37].

Фенольні сполуки, такі як таніни, а також антоціаніни, впливають на колір та смак напоїв частково прибираються рафінуванням. Між фенольними сполуками та дріжджовими екстрактами білків відбуваються взаємодії, що пов'язані зі зв'язуванням фенольних сполук. Це може допомогти при створенні дріжджових екстрактів для контролю вмісту фенольних сполук у виноробстві [49].

Додавання дріжджового екстракту до пива, що ферментується, підвищує толерантність дріжджів до етанолу, підвищує ферментацію дріжджів та надає продукту багатий поживний склад та аромат [42].

1.7.4 Імуномодуляторна добавка

Наприклад, корови, які вживали харчову добавку, що містить комплекс вітамінів групи В та дріжджовий екстракт, давали більше молока та молочних жирів та проявляли більший апетит у порівнянні з тими, що не мали цієї добавки. При цьому корови не набрали зайвої ваги, мали більшу концентрацію глюкози в крові, менше число соматичних клітин у молоці, що відповідає імуномодуляторному ефекту добавки за рахунок фагоцитозу викликаючих мастит бактерій. Також вони мали меншу температуру

поверхні тіла при спекотних та вологих умовах, що підтверджує, що добавка з дріжджовим екстрактом покращила терморегуляцію корів під час стресових умов [50]. Включення бета-глюканів до раціону свиноматок у період лактації збільшило вміст імуноглобуліну А у молоці та молозиві та могло стимулювати проліферацію епітеліальних клітин кишечника *in vitro* [51].

1.7.5 Елісітор для рослин та культур клітин рослин

Отримання метаболітів рослин за допомогою культур тканин та клітин рослин набуває популярності в порівнянні з класичним вирощуванням рослин у ґрунті [52]. Ці культури можна отримувати з різних експлантів рослин, а потім вирощувати в контрольованих умовах. Елісатори є хімічними або фізичними факторами, що сигналізують клітинам рослини до застосування різних шляхів адаптації до стресу, у тому числі абіотичних(солей, важких металів і т.д.), так і біотичних(екстрактів з грибів, дріжджів, бактерій або інших мікроорганізмів). Екстракт дріжджів можна використовувати як елісатор для накопичення культурами вторинних метаболітів. На прикладі різновиду італійського яблука Аннурка, дріжджовий екстракт (500мг/л) збільшив масу калусу у 1,3 рази, а також вміст поліфенолів, у тому числі хлорогенової кислоти у 2 рази в порівнянні з контролем, процианідину В2 та епікатехіну у отриманій калусній культурі. Антиоксидантна активність обробленого екстрактом зразку збільшилася на 23% у порівнянні з контролем. Окрім цього, використання екстракту з цієї культури, обробленої дріжджовим екстрактом, мали захисний антиоксидантний вплив на кераноцити, що перебували під УФ-стресом [52].

Леуцена (*Leucaena spp.*), або мімоза, тропічний рід квіткових рослин, що має розвинену кореневу систему та азот-фіксуєчі властивості, добре росте на пісчаних землях,у тому числі Близького Сходу. Під час надмірного вмісту солей, висота, діаметр стебла, біомаса рослин та інші параметри

зменшуються на 30%, а максимальне засолення у 8000 одиниць на мільйон(помірно засолена вода) NaCl призводить до зменшення показників росту до 50%. Розпилювання розчину активного дріжджового екстракту (100 мл/л) покращило параметри росту Леуцени, що були вражені стресом. Наприклад, використання екстракту при засоленості 4000 одиниць зменшило негативний вплив на стебло леуцени так, що ця рослина набула ростових характеристик контрольного зразку, тобто діаметр стебла збільшився на 41% у порівнянні з засоленими зразками без використання екстракту [53].

1.7.6 Вплив на мікробіоту травоядних жуйних тварин

Дріжджі як додаток до харчування жуйних тварин покращує травлення клітковини та ферментацію у рубці загалом. Вважається, що дріжджі стимулюють ріст специфічних бактерій рубцю, впливають на накопичення лактату, метану, переварювання їжі, на рН рубцю та загальний стан здоров'я [54].

Впровадження живих дріжджів до раціону корів зменшує доступний розчинний кисень, стимулюючи ріст целлюлітичних та лактат-використовуючих бактерій, при цьому збільшуючи рН. Дріжджовий екстракт стабілізував рН рубцю травного тракту корів, стимулював розкладення клітковини та збільшив ріст мікроорганізмів у ньому [55].

1.7.7 Підсилювач смаку

Дріжджовий екстракт є природнім підсилювачем смаку завдяки наявності 5-нуклеотидів, глутамату натрію та багатьом амінокислотам, що надають неповторний смак. Як підсилювач смаку, екстракт використовується у супах, м'ясних продуктах, у штучному м'ясі, закусках, снеках, стравах швидкого приготування, при цьому не збільшуючи вміст солей у цих продуктах. Вони мають смак м'яса, барбекю, грибів, сиру та,

головним чином, смак “умами”, п’ятий смак країн Азії, який має м’ясний смак та інші варіації [41, 42].

Змієголова риба (*Channa argus*), що природньо водиться в країн Азії та Африки, є розпосюдженим видом прісноводних риб для приготування приправлених філе-закусок. Додавання екстракту не зменшило термін придатності філе, але й покращило структуру, запах, смак та надало смаку умамі приправленим філе риби [56].

Додавання 1% екстракту з використаних пивних дріжджів підвищує твердість, жувальну здатність, вміст золи, білка і вільних амінокислот шинки. Показано, що екстракт додає смакових та запахових властивостей, не впливаючи на термін придатності шинки, при цьому стабілізуючи гелеву структуру шинки завдяки більшому вмісту білку [57].

1.7.8 Функціональне харчування

Дріжджові екстракти, маючи багатий склад, можуть бути використані для продукції функціонального харчування та харчових добавок. Екстракти з внутрішнього вмісту дріжджових клітин є багатим джерелом білків, що містять незамінні амінокислоти, а загальний вміст амінокислот відповідає нормам ВООЗ для споживання [58]. Окрім цього, наявність РНК, вітамінів (В3, В6 і В9), мінералів, низькомолекулярних пептидів, а також фенольних сполук та сполук з антиоксидантними властивостями, як і безпечний статус (GRAS), роблять цей продукт ідеальним для виходу на ринок [30].

Розділ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

Матеріали

Для дослідів були використані свіжі комерційні пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* (“Львівські дріжджі”, Україна). Дріжджі мають 33% сухих речовин (визначено експериментально). Дріжджі зберігалися за 4 °С в холодильній камері й були витягнуті перед проведенням експериментів задля зменшення ризику контамінації.

Руйнування дріжджів

Докритична екстракція

Дріжджова суспензія була приготована шляхом розчинення 250 г мокрих (82,5 г сухих) дріжджів у 1 л дистильованої води (за 20 °С протягом 15 хвилин з перемішуванням, для отримання однорідної маси й розподілення клітин дріжджів. Суспензія, підігріта до 40°C переносилась до металевого балону високого тиску об'ємом 2 л і додавали 170-190 г рідкого вуглекислого газу (CO₂). Екстракція проводилась при тиску в балоні 50 атм. протягом 30 хв. Після завершення процесу екстракції отримані зразки центрифугували для осадження клітин, що залишилися, при 3000 g, протягом 20 хв. Осад клітин висушували у жаровій шафі за температури 40 °С до постійної маси.

Надкритична екстракція

Дріжджова суспензія була приготована шляхом розчинення 250 г мокрих (82,5 г сухих) дріжджів у 1 л дистильованої води (за 20 °С протягом 15 хвилин з перемішуванням, для отримання однорідної маси й розподілення клітин дріжджів. Суспензія, підігріта до 40°C переносилась до металевого балону високого тиску об'ємом 2 л і додавали 170-190 г

рідкого вуглекислого газу (CO₂). Екстракція проводилась при тиску в балоні 76 атм. протягом 30 хв. По закінченню екстракції отримані зразки центрифугували при 3000 g, протягом 20 хв. Осад клітин висушували за температури 40 °C до постійної маси.

Переадаптація

Для попередньої адаптації дріжджів до низької температури один із варіантів дріжджової суспензії інкубували при температурі 6°C. Через 24, 48, 72 і 96 годин відбирали аліквоти і в них визначали кількість водорозчинних компонентів, вміст мікроелементів і спектральні характеристики.

Автоліз

Проведення автолізу. У роботі використовували пекарські дріжджі *S. cerevisiae*. Готували 33% суспензію дріжджових клітин у дистильованій воді (у розрахунку на сухий залишок). Автоліз водної суспензії дріжджів проводили при температурі 55°C при перемішуванні протягом 24, 48, 72 і 96 годин. Кожні 24 години відбирали 10 мл суспензії та після автолізу водорозчинні компоненти відокремлювали від клітин і клітинних органел центрифугуванням при 3000 g протягом 15 хвилин при 20°C.

Термоліз

Вивчаючи вплив високої температури і надлишкового тиску, зразки автоклаували при 121°C, 1,5 атм протягом 10 хв. Всі наступні операції виконувалися як і для попередніх варіантів.

Аналітичні методи

Загальна кількість твердих речовин у свіжих дріжджах та дріжджовому екстракті були визначені висушенням дріжджів у жаровій шафі при 40 °C до отримання постійної маси. Для екстракту супернатант

відокремлювали від осаду, брали аліквоти з кожного зразка двічі, по 2 мл, та визначали вміст сухих речовин в ньому. Масу сухих водорозчинних речовин зважували на аналітичних вагах. Значення сухого залишку отримали, коли знайшли середні значення для кожного зразка.

$$(\overline{m}_{\text{екс}} = \frac{m_{1\text{екс}} + m_{2\text{екс}}}{2})$$

,

де $m_{1\text{екс}}$ та $m_{2\text{екс}}$ — маса екстракту з аліквоти 2 мл для першого та другого зразка.

Значення у г/л отримуємо, помноживши отримане значення на 500:

$$z = \overline{m}_{\text{екс}} \cdot 500,$$

Де $\overline{m}_{\text{екс}}$ — середнє значення сухих речовин (г), отримане при висушуванні супернатанту.

Вихід сухих речовин у % був визначений як маса сухого залишку, отриманого експериментально, помножена на об'єм отриманого супернатанту на 100%, до сухої маси у свіжих дріжджах:

$$y(\%) = \frac{z \cdot V \cdot 100\%}{z_0},$$

де z — сухий залишок, г/л;
 V — об'єм отриманого супернатанту, л;
 z_0 — початкове значення сухих речовин хлібопекарських дріжджів, г/л.

Спектрофотометрія

Усі спектри робилися на спектрофотометрі (UV-2600, Shimadzu, Японія). Для визначення водорозчинних компонентів екстракту,

спектральний аналіз був проведений в УФ-області спектру. Поглинання зразків визначалося на довжині хвилі від 200 до 400 нм.

Усі експерименти повторювали не менше 3 разів. Аналіз даних проводили за допомогою Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) та STATISTICA 8 (Stetsoft, США).

Розраховувалися середні значення : $\bar{z} = \frac{\sum z}{n}$,

де z – сухий залишок, г/л;

де n —кількість зразків.

Похибка середнього: $\frac{s}{\sqrt{n}}$,

де s – стандартне відхилення від середнього значення;
 n – кількість зразків.

Дані представлені у вигляді групових середніх і стандартної похибки (SE), які були піддані статистичній обробці за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні . Відмінності вважалися достовірними при $P < 0,05$.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Суперкритична CO₂-екстракція

У сьогоденній час надкритична CO₂-екстракції набуває широкої популярності при отриманні різноманітних фармацевтичних та харчових продуктів завдяки ефективності, дешевизні та нешкідливості на відміну від використання органічних розчинників. Цей метод є підтипом надкритичної рідинної екстракції. У зв'язку з цим, великий інтерес представляє використання надкритичної-CO₂-екстракції для руйнування та вилучення водорозчинних компонентів з клітин дріжджів, тому процес екстракції може тривати лише кілька годин, а не дів як у разі застосування автолізу. Економічно вигідним є те, що через газоподібний стан при тиску навколишнього середовища не потрібна стадія розділення для видалення розчинника з екстрактів. Крім того, нижча критична температура вилучення CO₂ не деградує термолабільні сполуки, а по закінченню екстракції його можна конденсувати та зріджувати за допомогою компресора та, зрештою, повертати до циклу екстракції. Перш за все, через низьку полярність реагента для цієї методики, неполярні або частково полярні сполуки екстрагуються більш ефективно. Цей метод також має вищу ефективність екстракції низькомолекулярних розчинених речовин. Крім того, із збільшенням тиску суперкритичної CO₂-екстракції розчинність розчинених речовин з високою молекулярною масою посилюється [59].

Цей метод зазвичай застосовується для екстракції ліпідів, каротеноїдів, фенольних та антиоксидантних сполук, нестабільних та термолабільних компонентів рослин та мікроводоростей [60].

3.1 Докритична екстракція

У першій серії експериментів визначався вихід водорозчинних компонентів за докритичних умов CO_2 -екстракції. Було виявлено, що близько 94% клітин дріжджів перейшло в осад (77,7г з 82,5 у початковій суспензії). Також важливим є факт, що після екстракції CO_2 колір осаду сухого залишку відрізнявся—він мав темний колір у відмінності від початкових зразків дріжджів(рис.3.1).

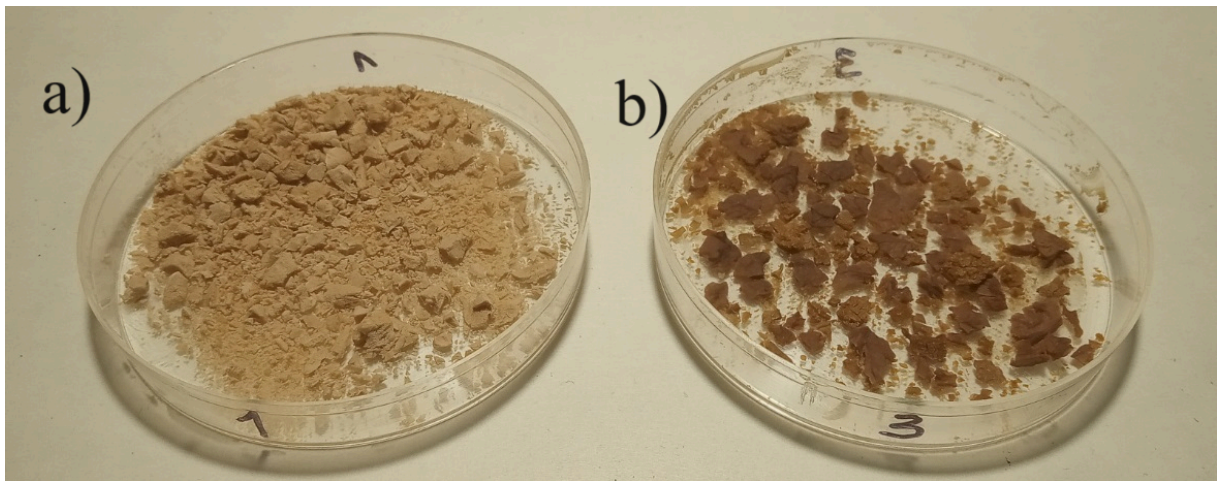


Рис.3.1. Візуальний стан висушених дріжджів (а) та дріжджового осаду, отриманого після CO_2 -екстракції (b)

Ці відмінності свідчать про те, що склад дріжджів змінився у процесі CO_2 -екстракції чи відбулося часткове окислення білків.

У цих умовах у водну фазу переходило лише 2,6 г або 3,8 г/л, що в 10 разів менше теоретично очікуваного, про це переконливо свідчать результати надзвичайно низької оптичної густини в ультрафіолетовому діапазоні (рис.3.2).

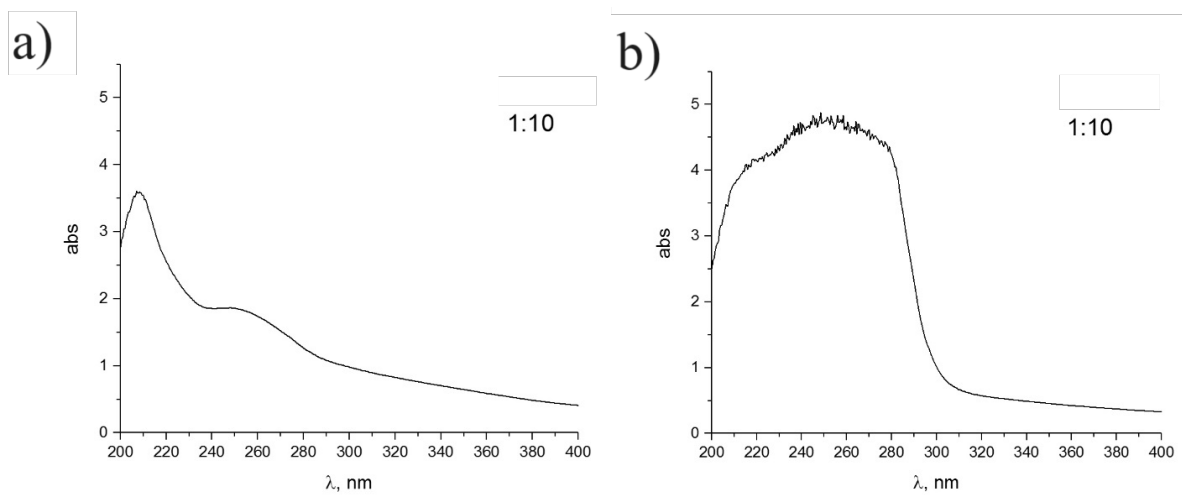


Рис.3.2. Спектри поглинання водорозчинних екстрактів дріжджів після CO_2 екстракції при 50 атм. протягом 30 хвилин (а) та спектри поглинання водних екстрактів після автолізу дріжджів при 55°C протягом 4 діб (б)

Більш того, після висушування цих водорозчинних екстрактів у ротаційному випарнику при температурі не більше 40°C , було отримано неочікуваний результат. Колір отриманих зразків змінився на темно-зелений (рис.3.3). Водночас, автолізати дріжджів завжди були темно-жовтими.



Рис.3.3. Зміна кольору водорозчинних компонентів дріжджів після CO_2 - екстракції при 50 атм. протягом 30 хвилин і сушінні при 40°C

Морфологічний аналіз клітин дріжджів після CO₂-екстракції при 50 атм. показав, що клітини не зазнали видимих руйнувань (рис.3.4).

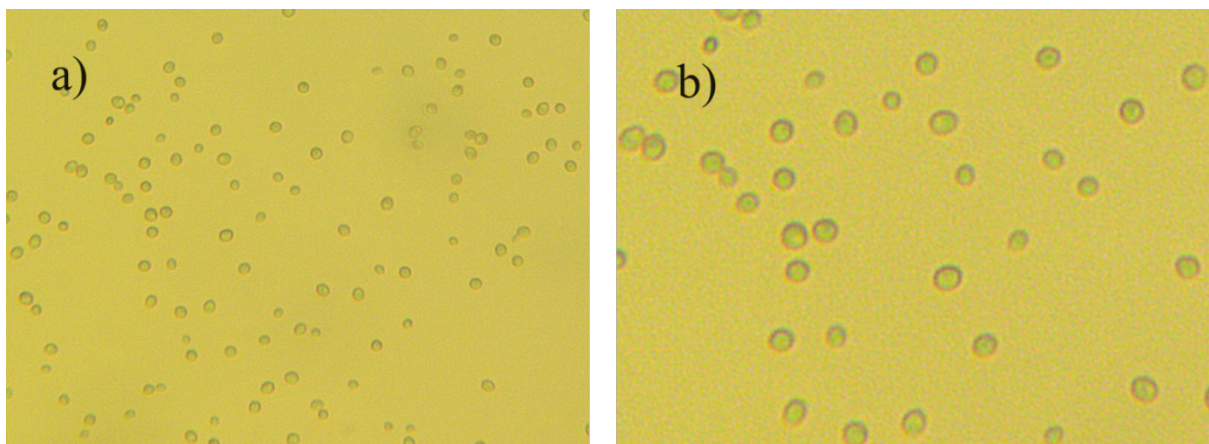


Рис.3.4. Зовнішній вигляд клітин дріжджів після CO₂-екстракції при тиску 50 атм. протягом 30 хвилин; при збільшенні x100 (a) и при збільшенні x200 (b)

Отже, можна зробити висновок, що CO₂-екстракція при 50 атм. протягом 30 хвилин не призводила до руйнування клітин дріжджів та екстракції водорозчинних компонентів, у зв'язку з цим було проведено подальшу серію експериментів при досягненні критичних умов CO₂-екстракції.

3.2 Надкритична CO₂-екстракція

У другій серії експериментів визначали вихід водорозчинних компонентів дріжджів за критичних умов CO₂-екстракції.

Визначення спектра поглинання компонентів, отриманих після цієї схеми екстракції, показало, що на відміну від першої серії, у цьому варіанті була досить велика кількість амінокислот і білків (рис.3.5).

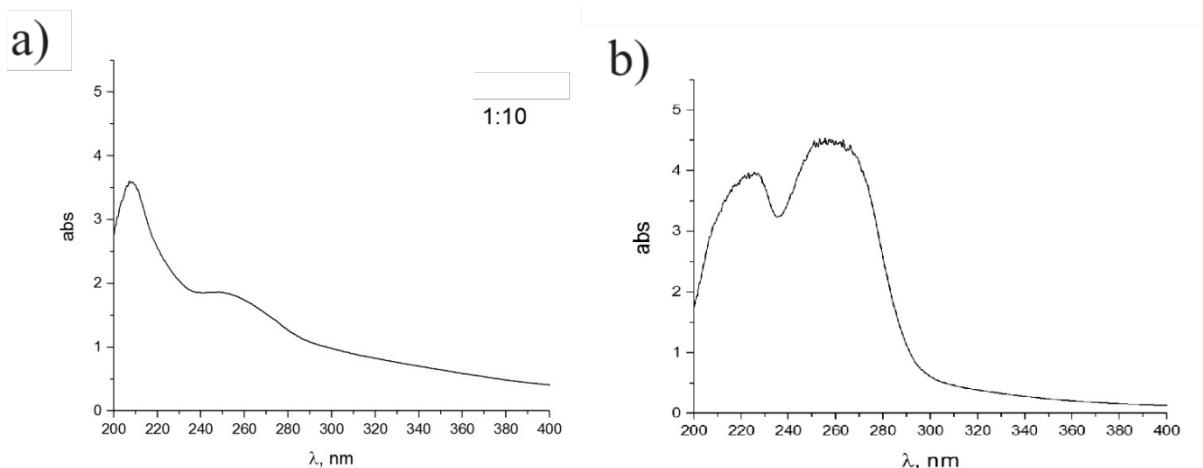


Рис.3.5. Спектри поглинання водорозчинних екстрактів дріжджів після CO₂ екстракції при 50 атм (а) та при 76 атм. (b) протягом 30 хвилин.

Отже, екстрактивність водорозчинних компонентів дріжджів залежить від рівня досягнення надкритичних умов CO₂ екстракції.

Як відомо, на клітинну стінку дріжджів припадає близько 30% від маси клітин дріжджів. Якщо виходити з цього, при досягненні тиску близько 76 атм. у водну фазу переходило лише 22% від загальної біомаси дріжджів. Це свідчить про те, що більшість водорозчинних компонентів залишаються у складі клітин, або іншими словами відбулося часткове переведення водорозчинних компонентів у середовище. У зв'язку з цим на наступному етапі роботи досліджувався вплив поєднаної дії передаптації дріжджів в умовах зниженої температури (6 °C) з подальшим автолізом і додатковим автоклавуванням зразків.

3.3 Оцінка ефективності автолізу та подальшої дії температури та тиску на вихід водорозчинних компонентів з біомаси дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Як відомо, у суспензії клітин дріжджів завжди присутня невелика кількість зруйнованих клітин та деяка кількість клітинних екзометаболітів. Виявилося, що якщо приготувати водну суспензію дріжджів і протягом 24 годин клітини видалити клітини центрифугуванням, то в ній виявлялося від

0.6 до 1 г/л водорозчинних компонентів, що становить не більше 1% від загальної маси клітин. Така вихідна суспензія дріжджів було прийнято контроль (рис. 3.6, нульова точка на осі).

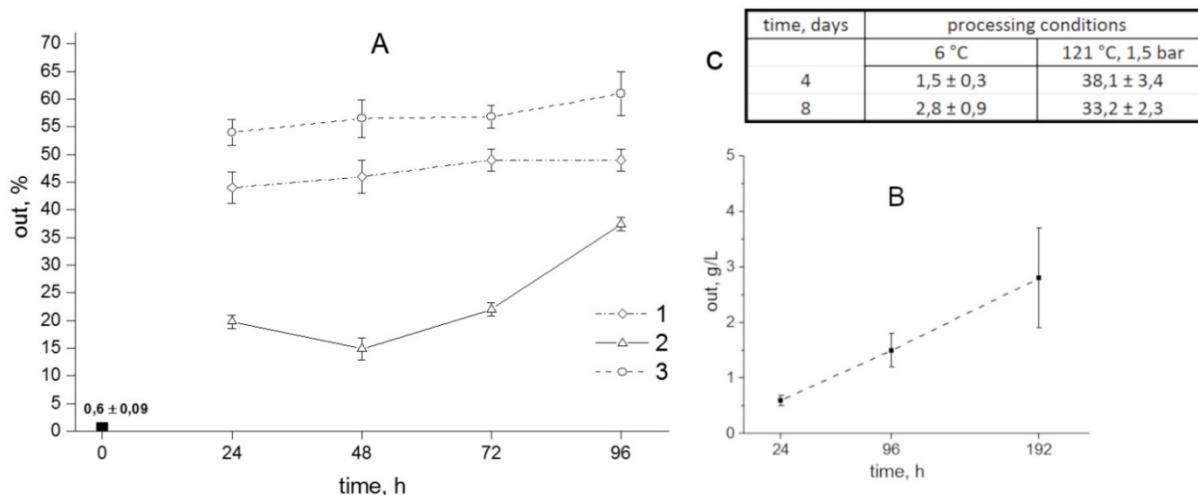


Рис 3.6. **А** - вміст водорозчинних компонентів дріжджів у відсотках від вихідної біомаси в контрольному зразку (нульова точка на осі) після інкубації водної суспензії дріжджів при температурі 55 °С протягом 24, 48, 72 і 96 годин - автолізу (1), суспензії дріжджів при 6 °С протягом 24, 48, 72 і 96 годин з подальшим автоклавовання цих суспензій дріжджів при 121 С (1,5 атм.) протягом 10 хв. (2) і після автолізу з наступним автоклавованням (3). **Б** - вміст водорозчинних компонентів дріжджів після їх інкубації протягом 4 і 8 діб при 6 °С і після наступного автоклавовання. **С** - вміст водорозчинних компонентів дріжджів після їх інкубації при 6 °С після 24, 96 та 192 годин.

* - відзначені варіанти, для яких $P < 0,05$ в порівнянні з 24 годинами,
 ** - відзначені варіанти в порівнянні з контролем (вихідна суспензія).

У разі, якщо суспензію дріжджів інкубувати протягом 24 годин при температурі +55°С, тобто. забезпечували "оптимальний" режим автолізу, то вміст водорозчинних компонентів (ВК) склав близько 45 г. по сухому залишку, що склало більше 40% загальної біомаси дріжджів (рис. 3.6.А, крива 1).

Збільшення часу автолізу до 48 годин супроводжувалося незначним збільшенням виходу водорозчинних компонентів, і до 72 годин цей показник виходив на стаціонарний рівень (рис. 3.6. А, крива 1).

Отже, якщо вважати, що збільшення виходу ВК з клітин дріжджів забезпечується ендогенними ферментами лізосом клітин дріжджів, які активізуються за температури 55°C, гідроліз клітинних компонентів реалізується в першу добу інкубації.

З метою зміни структурно-функціональної організації клітин дріжджів була проведена передаптація культури до зниженої температури (6 °C). Відомо, що при перенесенні культури у неоптимальні для них умови (стрес), відбувається зниження інтенсивності загального метаболізму та індукція синтезу групи стрес-білків, структурно-функціональної реорганізації клітинних структур зокрема і мембран [61]. Показано, що з пониженням температури нижче 10 °C активність ферментів у клітині знижується на 80-90% від вихідної [62]. За таких умов може відбуватися руйнація слабких міжмолекулярних взаємодій, загибель якоїсь частини клітин та як наслідок перехід водорозчинних компонентів у водне середовище.

Виявилося, що якщо суспензія дріжджів витримувалася при 6 °C протягом 24 годин, то в середовище переходило 0.6 г/л, тоді як після 96 годин кількість речовин, що вивільняються з клітин, збільшувалася в 2 рази (рис.3.6. В). Подальше збільшення часу витримування дріжджів за таких умов до 8 діб збільшувалося незначно порівняно з 96 годинами (рис. 3.6) [63].

Отримані результати підтверджують припущення про зміну структурно-функціональної організації клітин дріжджів при культивуванні їх при 6°C. Оптимальною з позиції виходу ВК у середу може бути експозиція протягом 96 годин. Якщо ці припущення вірні, можна очікувати,

що додатковий вплив, спрямований на збільшення виходу ВК з клітин у середовище, залежатиме від попереднього часу передаптації суспензії дріжджів до екстремальних для них умов.

Відомо, що висока температура призводить до руйнування міжмолекулярних взаємодій, і насамперед водневих зв'язків [64], що може супроводжуватися розпадом надмолекулярних структур, і як наслідок — можливим збільшенням виходу клітин ВК водне середовище.

У наступній серії експериментів клітинна суспензія дріжджів піддавалася дії температури 121 °С при надмірному тиску 1,5 атм протягом 10 хвилин, тобто автоклавування після передаптації дріжджів при 6 °С протягом 24, 48, 72 і 96 годин[63].

Виявилося, що автоклавування суспензії дріжджів, яке проводилося після передаптації протягом 24, 48 і 72 годин забезпечувало вихід від 18 до 22 % водорозчинних компонентів твердого залишку від загальної маси дріжджів, що було в 2 рази менше в порівнянні з виходом водорозчинних компонентів при автолізі (рис.3.6. А, крива 2).

Однак, якщо суспензія дріжджів проходила передаптацію при 6 °С протягом 96 годин, а після цього піддавалася автоклавуванню, то вихід ВК збільшувався до 38% від біомаси дріжджів, тобто майже вдвічі в порівнянні з 24-72 годин зберігання при 6 °С (рис.3.6. А ,крива 2). У той же час збільшення передаптації дріжджів до 8 діб з подальшим автоклавуванням не впливало на збільшення виходу ВК у водне середовище (рис, 3.6. С).

Отримані результати підтверджують припущення про те, що передаптація дріжджів при 6°С протягом саме 96 годин дійсно забезпечувала збільшення виходу ВК після додаткової дії високої температури і тиску.

Це дозволяє вважати, що при автолізі та при автоклавуванні відбуваються два різні механізми збільшення виходу водорозчинних компонентів у водне середовище. Якщо перший може бути віднесений до гідролітичного руйнування молекул клітин дріжджів, другий до механічно-фізичного розбирання молекулярних комплексів на окремі компоненти. У зв'язку з цим, з'явився інтерес до поєднання цих двох способів отримання водорозчинних компонентів дріжджів з метою збільшення їх виходу.

Виявилося, що передадаптація з подальшим автолізом і додатковим автоклавуванням супроводжувалася збільшенням виходу водорозчинних компонентів, так їх кількість після 24 годинного автолізу з наступним автоклавуванням становила 54%, не змінювалося після 48 і 72-годинного автолізу і збільшувалося до 61% після 96 годин (рис. 3.6. А, крива 3).

Важливо, що саме після 96-годинної передадаптації суспензії дріжджів був найбільший вихід ВК у середовище і після подальшої послідовної дії автолізу та автоклавування.

Якщо осад клітин дріжджів після передадаптації з наступними автолізом і автоклавуванням промивали додатковою порцією води, то до водного розчину переходило ще до 6-10% компонентів дріжджів, що в сумі становило близько 70% компонентів клітин від початкової біомаси, тобто в осаді після центрифугування залишалися лише клітинні стінки.

Можна вважати, що умови отримання ВК впливатимуть як на кількісні, так й на якісні характеристики одержуваних продуктів.

3.4 Оцінка інтегрального складу водорозчинних компонентів *Saccharomyces cerevisiae* отриманих різними способами

Найбільший інтерес серед клітинних компонентів дріжджів становлять амінокислоти, пептиди та нуклеїнові кислоти, інтегральний

склад яких можна визначити за спектрами поглинання в ультрафіолетовій ділянці.

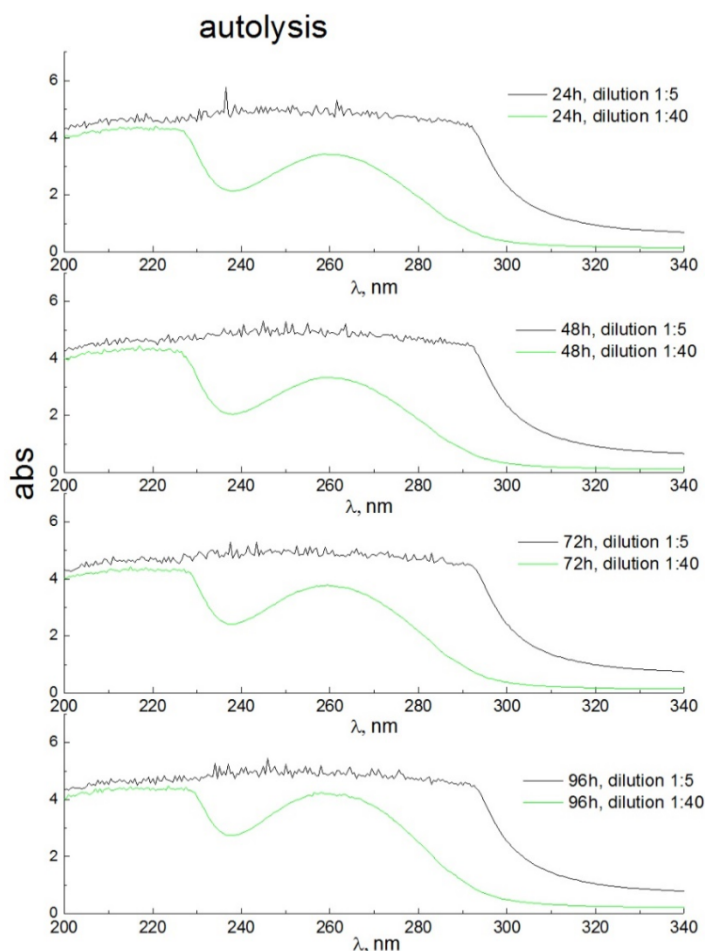


Рис.3.7. Типові спектри поглинання водорозчинних компонентів дріжджів в ультрафіолетовій ділянці, які були отримані через 24,48 72 та 96 годин автолізу (55 °C). Представлені типові спектри поглинання при розведенні вихідного розчину ВК у 5 (1:5) та 40 разів (1:40).

Виявили, що після автолізу дріжджів, який проводили при 55°C протягом 24, 48, 72 і 96 годин компоненти були представлені двома основними фракціями, білковою (яка представлена сумішшю вільних амінокислот і пептидів - область поглинання 200-230 нм область поглинання з чітким піком при 260 нм) (Рис. 3.7).

Необхідно відзначити, що співвідношення цих двох фракцій (пептидної/нуклеотидної) були однаковими у зразків, отриманих при різних тимчасових експозиціях від 24 до 96 годин (рис. 3.7).

У тому випадку, якщо кількість водорозчинних компонентів у зразку збільшувалася в 8-9 разів, за рахунок збільшення їх концентрації, то в такому випадку реєструвалися речовини, які поглинали в ширшому діапазоні спектру від 200 до 290 нм (Рис. 3.4.1). При цьому був виявлений широкий набір індивідуальних пептидів та білків, до складу яких входять і ароматичні амінокислоти. Слід зазначити, що його склад був нестабільний ,тобто він залежав від часу проведення автолізу (Рис. 3.7).

На наступному етапі роботи визначали спектральний склад речовин, які були присутні у водорозчинних компонентах після переадаптації при 6°C протягом 24 і 96 годин інкубації, з наступним автолізом протягом 4 діб і додатковим автоклавуванням після автолізу при 121°C, 1,5 атм. протягом 10 хвилин.

Виявилося, що після інкубації суспензії дріжджів при 6 °C, протягом 24 годин з'явилося невелике поглинання в області 200-205 нм, і воно зменшувалося лінійно до 240 нм. Фіксувалося невелике поглинання в ділянці 260-270 нм (рис. 3.8).

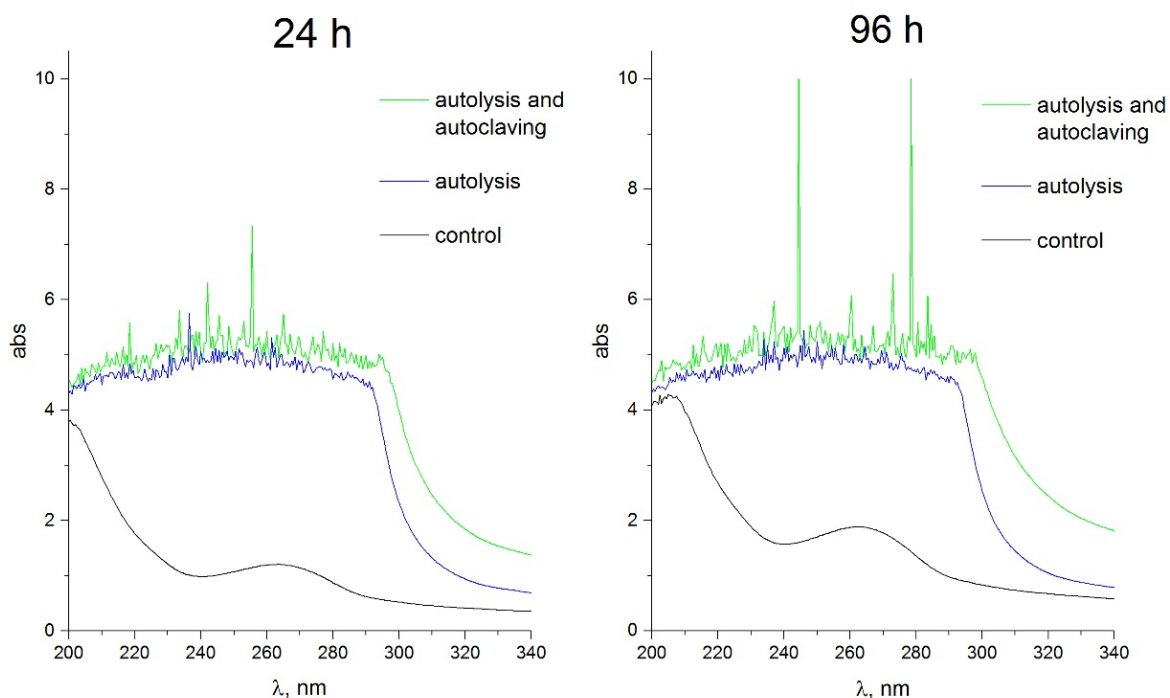


Рис. 3.8. Типові спектри поглинання водорозчинних компонентів дріжджів для зразків, які були отримані після передадаптації суспензії дріжджів при температурі 6 °C протягом 24 і 96 годин і після автолізу, який проводили при 55 °C протягом 24 і 96 годин і після передадаптації. , автолізу з подальшим автоклавуюванням при 121 °C (1,5 атм.) протягом 10 хв.

У тому випадку, якщо водну суспензію дріжджів інкубували при 6 °C протягом 96 годин, кількість водорозчинних амінокислот і пептидів (область поглинання 200-210 нм) збільшувалася в порівнянні з 24 годинною експозицією (Рис.3.8). Ці результати свідчать про те, що після 96- годинної передадаптації в клітинах дріжджів відбувалися структурно-функціональні перебудови, які могли призводити до збільшення виходу ВК після автолізу та автоклавуювання.

Проведення автолізу дріжджів протягом 24 годин при температурі 55°C після їх передадаптації при 6°C протягом 24 годин супроводжувалося отриманням ВК, що містять досить широкий спектр амінокислот, білків і нуклеїнових кислот (Рис.3.8). Однак, найбільший інтерес представляє склад ВК, який був отриманий після послідовних процедур передадаптації,

автолізі та подальшого автоклавування. Так, кількість речовин, які поглинали в широкому діапазоні від 200 до 300 нм, порівняно з автолізом, збільшилася, і це особливо яскраво проявилось після 96-годинної передінкубації і 96-годинному автолізі з подальшим автоклавуванням при 121 °С (1,5 атм.) протягом 10 хв. (Рис.3.8).

Необхідно відзначити, що компоненти, отримані за таких умов, відрізнялися від компонентів автолізату і за органолептичними властивостями.

Отже, послідовна процедура обробки клітинної суспензії дріжджів, яка складається з трьох етапів: передадаптація, автоліз і автоклавування, дозволяє перевести у водну фазу до 70% компонентів клітин дріжджів, які містять вільні амінокислоти, пептиди, білки та нуклеїнові кислоти. Подальший повний аналіз складу водорозчинних компонентів дріжджів дозволить визначити області найбільш ефективного застосування.

У висновку зазначимо, що розроблена технологія, яка заснована на поєднанні передадаптації, автолізі і подальшому автоклавуванні дозволяє перевести близько 70% компонентів дріжджів у водорозчинний стан, що відповідає повному поділу клітинних стінок і водорозчинних компонентів. Разом з тим, цей метод досить тривалий, він займає до 9 діб. У той же час, екстракція при субкритичних умовах може бути здійснена протягом доби. Однак, цей метод поступається за повнотою екстракції автолізу та іншим методам.

ВИСНОВКИ

Розроблений комбінований метод передадаптації, автолізу та автоклавування суспензії дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* дозволяє проводити ефективну екстракцію водорозчинних компонентів і забезпечує майже повне руйнування клітинних стінок і вивільнення водорозчинних компонентів.

1. Клітини *Saccharomyces cerevisiae* виявляють високу міцність до механічних впливів та зберігають свою цілісність навіть при стрибкоподібній зміні тиску до 50 атм. у середовищі CO₂.

2. При досягненні надкритичних умов (76-80 атм. у середовищі CO₂) відбувалося часткове руйнування клітин дріжджів, що супроводжувалося переходом у водну фазу до 22% твердих речовин дріжджів.

3. Поєднання передадаптації, автолізу та автоклавування дозволяє отримувати до 70% водорозчинних компонентів дріжджів.

СПИСКИ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Toward Better Food Security Using Concepts from Industry 5.0 / S. Guruswamy et al. *Sensors*. 2022. Vol. 22, no. 21. P. 8377
2. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). World Population Prospects 2022: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3. Available online: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf (accessed on 10 may 2024).
3. Wu G. Dietary protein intake and human health. *Food & Function*. 2016. Vol. 7, no. 3. P. 1251–1265.
4. Environment and food safety: a novel integrative review / S. Jiang et al. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021. Vol. 28, no. 39. P. 54511–54530.
5. Goals in Nutrition Science 2020-2025 / J. Bassaganya-Riera et al. *Frontiers in Nutrition*. 2021. Vol. 7. P. 606378.
6. Smith M. G., Snyder M. Yeast as a Model for Human Disease. *Current Protocols in Human Genetics*. 2006. Vol. 48, no. 15. P. 1561–1568.
7. Steinkraus K. A., Kaeberlein M., Kennedy B. K. Replicative Aging in Yeast: The Means to the End. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2008. Vol. 24, no. 1. P. 29–54.
8. Bharat Helkar P., Sahoo A. Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. *International Journal of Waste Resources*. 2016. Vol. 6, no. 3. P. 248–253.
9. Ribeiro R. A., Bourbon-Melo N., Sá-Correia I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 13. P. 953479.

10. Extraction of brewer's yeasts using different methods of cell disruption for practical biodiesel production / T. Řezanka et al. *Folia Microbiologica*. 2014. Vol. 60, no. 3. P. 225–234.
11. Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bioactive compounds – A review / D. Liu et al. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2016. Vol. 36. P. 181–192
12. Lahir Y. General Overview of Yeast and Yeast Cell as a Novel Model for Investigations. *Advances in Clinical Toxicology*. 2022. Vol. 7, no. 4. P. 1–17.
13. Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source / M. E. Jach et al. *Metabolites*. 2022. Vol. 12, no. 1. P. 63.
14. Biobased Materials from Microbial Biomass and Its Derivatives / C. Cottet et al. *Materials*. 2020. Vol. 13, no. 6. P. 1263
15. Feldmann H. Yeast: Molecular and Cell Biology. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2012. 464 p
16. Cytology, Cell Walls and Septa / I. van der Klei et al. *The Yeasts*. 2011. P. 111–128.
17. Denoth Lippuner A., Julou T., Barral Y. Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014. Vol. 38, no. 2. P. 300–325.
18. Mirisola M. G., Longo V. D. Yeast Chronological Lifespan: Longevity Regulatory Genes and Mechanisms. *Cells*. 2022. Vol. 11, no. 10. P. 1714.
19. Longo V. D., Fabrizio P. Visions & Reflections. Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2002. Vol. 59, no. 6. P. 903–908
20. Sampaio-Marques B., Burhans W. C., Ludovico P. Yeast at the Forefront of Research on Ageing and Age-Related Diseases. *Yeasts in Biotechnology and Human Health*. Cham, 2019. P. 217–242.
21. Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan / J. Yang et al. *Cell Cycle*. 2011. Vol. 10, no. 1. P. 144–155

22. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*. 1992. Vol. 275, no. 3-6. P. 257–266
23. Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food / B. Podpora et al. *Czech Journal of Food Sciences*. 2016. Vol. 34, No. 6. P. 554–563
24. A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010 / Y. Zhang et al. *Molecules*. 2018. Vol. 23, no. 6. P. 1484.
25. Yeast-derived β -1,3/1,6 glucan, upper respiratory tract infection and innate immunity in older adults / R. Fuller et al.. *Nutrition*. 2017. T. 39-40. C. 30–35
26. Use of β -glucan from spent brewer's yeast as a thickener in skimmed yogurt: Physicochemical, textural, and structural properties related to sensory perception / V. Raikos et al. *Journal of Dairy Science*. 2018. T. 101, № 7. C. 5821–5831
27. Spent brewer's yeast proteins and cell debris as innovative emulsifiers and carrier materials for edible oil microencapsulation / E. M. Vélez-Erazo et al. *Food Research International*. 2020. P. 109853.
28. Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives / Z. Tao et al. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2023. Vol. 33, no. 2. P. 151–166.
29. Sørensen J. L., Søndergaard T. E. The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*. 2014. Vol. 170. P. 55–60
30. Spent Brewer's Yeast Autolysates as a New and Valuable Component of Functional Food and Dietary Supplements / B. Podpora et al. *Journal of Food Processing & Technology*. 2015. Vol. 6, no. 12. P. 526.
31. Bioactive peptides from yeast: A comparative review on production methods, bioactivity, structure-function relationship, and stability / M. Mirzaei et al. *Trends in Food Science & Technology*. 2021. Vol. 118. P. 297–315

32. Vieira E. F., Melo A., Ferreira I. I. M. P. L. V. O. Autolysis of intracellular content of Brewer's spent yeast to maximize ACE-inhibitory and antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology*. 2017. Vol. 82. P. 255–259.
33. FAO/WHO/UNU, Technical Report Series 935: Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. WHO Press, Geneva. 2007. P. 1-265.
34. Tanguler H., Erten H. Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. *Food and Bioproducts Processing*. 2008. Vol. 86, no. 4. P. 317–321
35. Dimopoulos G., Tsantes M., Taoukis P. Effect of high pressure homogenization on the production of yeast extract via autolysis and beta-glucan recovery. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2020. Vol. 62. P. 102340.
36. Electrically-assisted extraction of bio-products using high pressure disruption of yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) / M. V. Shynkaryk et al. *Journal of Food Engineering*. 2009. Vol. 92, no. 2. P. 189–195.
37. Potential of high pressure homogenization to induce autolysis of wine yeasts / P. Comuzzo et al. *Food Chemistry*. 2015. Vol. 185. P. 340–348.
38. Factors influencing autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells induced by pulsed electric fields / J. M. Martínez et al. *Food Microbiology*. 2018. Vol. 73. P. 67–72.
39. Effect of pulsed electric fields on the production of yeast extract by autolysis / G. Dimopoulos et al. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2018. Vol. 48. P. 287–295.
40. Vukasinovic-Milic T., Rakin M., Siler-Marinkovic S. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: Effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2007. Vol. 72, no. 5. P. 451–457.

41. The complexity of yeast extracts and its consequences on the utility in brewing: A review / F. F. Jacob et al. *Brewing science*. 2019. Vol. 72. P. 50–62 [Jacob2019]
42. Jacob F. F., Hutzler M., Methner F.-J. Comparison of various industrially applicable disruption methods to produce yeast extract using spent yeast from top-fermenting beer production: influence on amino acid and protein content. *European Food Research and Technology*. 2018. Vol. 245, no. 1. P. 95–109.
43. Utilization of post-fermentation yeasts for yeast extract production by autolysis: the effect of yeast strain and saponin from *Quillaja saponaria* / J. Berłowska et al. *Journal of the Institute of Brewing*. 2017. Vol. 123, no. 3. P. 396–401.
44. Physiological responses of Chinese hamster ovary cells to a productivity-enhancing yeast extract / D. Hu et al. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018. Vol. 126, no. 5. P. 636–643.
45. Tachibana S., Watanabe K., Konishi M. Estimating effects of yeast extract compositions on *Escherichia coli* growth by a metabolomics approach. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019. Vol. 128, no. 4. P. 468–474.
46. Yeast as a novel protein source - Effect of species and autolysis on protein and amino acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar*) / J. O. Agboola et al. *Aquaculture*. 2022. Vol. 546. P. 737312
47. Yeast extract could be used as a partial substitute for spray-dried porcine plasma in diets for weaned pigs / L. Pan et al. *Livestock Science*. 2019. Vol. 224. P. 20–25.
48. Effects of dietary supplementation of different amounts of yeast extract on oxidative stress, milk components, and productive performance of sows / C. Q. Tan et al. *Animal Feed Science and Technology*. 2020. P. 114648.
49. Understanding the molecular interactions between a yeast protein extract and phenolic compounds / T. Francisco et al. *Food Research International*. 2021. Vol. 143. P. 110261.

50. Influence of a feed additive containing vitamin B12 and yeast extract on milk production and body temperature of grazing dairy cows under high temperature-humidity index environment / J. R. Gandra et al. *Livestock Science*. 2019. Vol. 221. P. 28–32.
51. Effect of yeast extracted β -glucans on the immune response and reproductive performance of gilts in the adaptation, gestation, and lactation periods / M. C. dos Santos et al. *Livestock Science*. 2023. T. 275. P. 105289.
52. Use of yeast extract to elicit a pulp-derived callus cultures from Annurca apple and potentiate its biological activity / C. Laezza et al. *Journal of Functional Foods*. 2024. Vol. 112. P. 105988
53. Nassar R. M. A., Shanan N. T., Reda F. M. Active yeast extract counteracts the harmful effects of salinity stress on the growth of leucaena plant. *Scientia Horticulturae*. 2016. Vol. 201. P. 61–67
54. Review: The effects of dietary yeast and yeast-derived extracts on rumen microbiota and their function / L. M. Baker et al. *Animal Feed Science and Technology*. 2022. P. 115476
55. Effect of feeding *Yucca schidigera* extract and a live yeast on the rumen microbiome and performance of dairy cows fed a diet excess in rumen degradable nitrogen / C. A. Johnson et al. *animal*. 2023. P. 100967
56. Quality changes and shelf-life prediction of pre-processed snakehead fish fillet seasoned by yeast extract: Affected by packaging method and storage temperature / Y. An et al. *Food Chemistry Advances*. 2023. Vol. 3. P. 100418.
57. Spent brewer's yeast extract as an ingredient in cooked hams / G. Pancrazio et al. *Meat Science*. 2016. Vol. 121. P. 382–389.
58. Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract / E. F. Vieira et al. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016. Vol. 52. P. 44–51

59. Recent Advances in Lipid Extraction for Biodiesel Production / N. Moradi-kheibari et al. *Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts*. 2019. P. 179–198.
60. Green Chemistry Extractions of Carotenoids from *Daucus carota* L.–Supercritical Carbon Dioxide and Enzyme-Assisted Methods / N. Miękus et al. *Molecules*. 2019. Vol. 24, no. 23. P. 4339.
61. Guyot S., Ferret E., Gervais P. Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to thermal stress. *Biotechnology and bioengineering*. 2005. Vol. 92. P. 403-409.
62. Changes in Biochemical Characteristics and Activities of Ripening Associated Enzymes in Mango Fruit during the Storage at Different Temperatures / M. A. Hossain et al. *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014. P. 1–11.
63. Pre-Adaptation of *Saccharomyces Cerevisiae* to Low Temperatures Affects the Resistance of Yeast Cells to Subsequent Autolysis, High Temperature and Overpressure / A. Bozhkov et al. *Food Science and Nutrition*. 2023. Vol. 9, no. 4. P. 1–9
64. Dougherty R. C. Temperature and pressure dependence of hydrogen bond strength: A perturbation molecular orbital approach. *The Journal of Chemical Physics*. 1998. Vol. 109, no. 17. P. 7372–7378.