

М. Н. Шихова, И. Е. Соколова
Днепропетровский национальный университет

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ДРОЖЖЕЙ

Розглядаються нові розробки щодо поліпшення живильних середовищ для вирощування дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Мікродозіжки препаратів панкреатичної РНКазы або РНКазы *Bacillus intermedius* (бінази) стимулюють ріст дріжджів та поліпшують їх якість. Використання геотермальної води, як джерела мінерального живлення, забезпечує отримання біомаси з високими біотехнологічними властивостями.

The new researches in optimisation of nutrient medium for cultivation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* is discussed in this abstract. Microdoses of a pancreatic RNA-ase preparation or RNA-ase of *Bacillus intermedius* stimulate the yeasts growth and improve their quality. Using geothermal water as the mineral source, ensures recovery of biomass with high biotechnological properties.

В настоящее время особую важность приобретает вопрос улучшения качества хлебопекарных дрожжей. Как известно, дрожжам принадлежит ведущая роль в формировании качества хлеба. Их главная функция при выпечке хлеба состоит в заквашивании теста, в результате чего оно поднимается; дрожжи оказывают и ряд других благоприятных воздействий. Микробиологические процессы и связанные с ними биохимические изменения в тесте определяют его пористость, окраску, прочность среза и сохранение свежести хлеба, придают ему вкус и аромат, повышают его питательную ценность. В то же время необходимо учитывать и рентабельность промышленного производства дрожжей и соответственно хлеба. Таким образом, актуальна как проблема улучшения качества пекарских дрожжей, так и удешевления процесса их производства. Хлеб является одним из основных продуктов потребления, поэтому его стоимость играет роль показателя благосостояния страны в целом.

Основные стадии выращивания дрожжей сопровождаются постоянной аэрацией питательной среды. Затем их переносят в микроаэрофильные условия для брожения в тесте. Эта смена условий жизнедеятельности обуславливает те требования, которые предъявляются хлебопекарным дрожжам [3].

Прежде всего, они должны обладать высокой потенциальной активностью гликолитических ферментов. Она выражается как зимазная активность (сбраживание глюкозы, фруктозы и сахарозы) и мальтазная активность (сбраживание мальтозы) [3]. Дрожжи должны иметь также высокую активность инвертазы и других гидролитических ферментов, способность расти и синтезировать ферменты и коферменты в анаэробных условиях, быстро адаптироваться к изменяющимся субстратам [4]. Кроме того, они должны проявлять осмотическую стабильность по отношению к жирам и относительно высокой концентрации сахара в начальной стадии брожения теста, быть солеустойчивыми и стойкими к изменениям pH, содержать небольшое количество глутатиона [3]. Производственные штаммы дрожжей должны быть устойчивыми к

примесям, содержащимся в мелассе, на которой их выращивают, иметь высокую генеративную активность, быть стойкими при хранении [4].

Одно из важнейших потребительских свойств пекарских дрожжей – их подъемная сила. Подъемную силу дрожжевого теста принято рассматривать как суммарный показатель активности ферментов зимазно-мальтазного комплекса.

В данной работе сделана попытка проанализировать результаты внесения ферментов, в частности рибонуклеаз, и их влияние на основные биотехнологические характеристики дрожжей.

В качестве стимулятора роста культуры дрожжей применяли внеклеточную щелочную РНКазу *Bacillus intermedius*, очищенную до гомогенного состояния, с молекулярной массой 12300 Да и удельной активностью 1 млн. ед./ мг белка. Во всех экспериментах РНКазу добавляли в экспоненциальной фазе роста культуры (4 ч) в концентрации, равной 0,01 мкг/мл. Культуру *Saccharomyces cerevisiae* выращивали на солодовом сусле (6% сухих веществ по Баллингу) при 28°C в вибротерме (185 об/мин). Исходная концентрация клеток составляла 10 млн. кл./мл среды. После этого культуру растили в присутствии РНКазы до стационарной фазы роста (8–9 ч) [5; 6].

Под действием экзогенной РНКазы улучшается подъемная сила дрожжей. При этом повышение бродильной активности дрожжей происходило за счет усиления сбраживания глюкозы, а не мальтозы муки. Возрастала бродильная активность в 1,5 и более раз, в зависимости от времени культивирования совместно с РНКазой. Но вкусовые качества при этом не ухудшались [7].

РНКазы оказывает протекторное действие на клетки [7]. Сейчас очень широко применяют сухие дрожжи. Это связано с тем, что такой продукт легче транспортируется, дольше сохраняет свои качества и более удобен в использовании как в домашних условиях, так и на производстве. Для получения сухих дрожжей необходимо производить обезвоживание клеток. Как известно, одно из основных негативных последствий обезвоживания клеток – снижение активности ферментов бродильного комплекса. Об этом судят по величине подъемной силы интактных и частично обезвоженных дрожжей. Исследования показали, что время подъема дрожжевого теста интактными клетками *S. cerevisiae* контрольного (выращены без РНКазы) и опытного (с РНКазой) вариантов колеблется в пределах от 66 до 63 минут, то для обезвоженных дрожжей оно возрастало до 118 и 84 минут соответственно [6].

Из этого следует, что подъемная сила дрожжей, выращенных в среде с РНКазой, сохраняется на более высоком уровне. Таким образом, мы можем сохранить высокую активность дрожжевых клеток.

Также выяснилось, что добавление РНКазы способствует стабилизации клеток в условиях повышенной температуры и улучшает их осмотические свойства [5].

Основным недостатком применения РНКазы *Bacillus intermedius* является ее дороговизна. Поэтому начали изучать влияние панкреатической РНКазы на клетки пекарских дрожжей [7]. Этот фермент является относительно недорогим и серийно производимым препаратом, что облегчает внедрение этой технологии в производство и имеет немаловажное значение при разработках по улучшению питательных сред для промышленного производства пекарских дрожжей. При выращивании дрожжей в лабораторных условиях установлено, что стимулирующий

эффект панкреатической РНКазы находится в зависимости как от количества ферментного препарата, так и начальной концентрации клеток в культуре [7].

Исследование влияния панкреатической РНКазы на основные свойства дрожжей, определяющие качество товарной продукции, показало, что их осмоустойчивость и подъемная сила не только сохранялись в пределах контроля, но и превосходили эти показатели. Существенно, что во всех случаях культивирования *S. cerevisiae* в среде с добавленной в нее РНКазой увеличивалась стойкость дрожжей при хранении на 10–16% [6]. При этом влияние панкреатической РНКазы и РНКазы, производимой *Bacillus intermedius*, практически одинаково, то есть они по действию на клетки дрожжей идентичны.

Для объяснения полученных результатов мы исходили из данных литературы. В условиях, вызывающих замедление или прекращение роста культуры, в клетках происходит накопление запасных веществ, в частности трегалозы [10]. Наряду с функцией запасных веществ трегалоза выполняет функцию осмопротектора, а также криопротектора [8]. Из этого следует, что РНКазы способствуют не только повышению устойчивости к высокой температуре, но и пониженной, что облегчает транспортировку и хранение товарной продукции (сухих и прессованных дрожжей). При стрессовых воздействиях на клетку трегалоза специфически связывается с фосфолипидами мембран, стабилизируя их. При дегидратации клеток трегалоза как бы заменяет воду и стабилизирует обезвоженные мембраны. Возможно, этим объясняется то, что именно при замедлении роста культуры *S. cerevisiae* в ней возрастает число клеток, устойчивых к воздействию неблагоприятных факторов. В присутствии РНКазы уже на 7-й час роста культуры пул трегалозы в клетках превышает уровень контрольного варианта в 2 раза [6]. Прирост уровня дисахарида в клетках опытного варианта можно объяснить ускорением начала стационарной фазы роста популяции.

Согласно данным литературы, существует корреляция между возрастной и трофической структурой популяции [2]. При низких скоростях роста (стационарная фаза роста) в культуре преобладают непочкующиеся клетки, накапливающие запасные вещества, в данном случае трегалозу, за счет экзогенного субстрата – экзотрофные клетки. Повышение скорости развития популяции (экспоненциальная фаза роста) сопровождается снижением содержания в ней экзотрофных клеток с одновременным изменением ее возрастной структуры за счет увеличения количества почкующихся клеток (эндотрофных), содержание трегалозы резко падает. Таким образом, накопление трегалозы может быть одним из элементов простейшей системы регуляции чередования экзотрофии и эндотрофии у дрожжей. Это имеет большое значение для дальнейших исследований в данной области.

На основании изложенного можно предположить, что в момент добавления РНКазы в популяцию в экспоненциальной фазе роста размножение клеток дрожжей стимулировалось, в то время как пул трегалозы оставался низким. Однако поскольку скорость роста культуры возрастала, она раньше вступала в стационарную фазу роста. Из-за замедления роста культуры и более длительного пребывания ее в этом состоянии концентрация трегалозы в клетках достигала более высокого уровня. Таким образом, клетки, выращенные в присутствии РНКазы, содержат значительно больший пул трегалозы. Это дает возможность клеткам *S. cerevisiae* переживать неблагоприятные условия.

Следовательно, выявленная антистрессовая функция рибонуклеазы не только коррелирует с более ранним наступлением стационарной фазы и с увеличением пула трегалозы, но и обусловлена этими процессами. Из этого следует, что РНКазы действуют опосредованно на клетки дрожжей.

Также очень интересно использование геотермальной воды в качестве источника минерального питания. Геотермальная вода представляет значительный интерес в связи с возможностью использования ее в качестве дешевого и качественного компонента, позволяющего исключить ныне применяемые минеральные элементы среды, так как соли, используемые сейчас в промышленном производстве пекарских дрожжей, довольно дорогостоящи.

Известно, что для производства пекарских дрожжей, в основном, используют свекловичную мелассу и такие добавки, как сульфат аммония, соли ортофосфорной кислоты, гидроксид аммония, хлорид калия, сульфат магния, а также ростовые вещества – кукурузный экстракт и дестибиотин [3].

Основу экспериментальной среды составляла меласса, разбавленная геотермальной водой, обладающей высокой минерализацией (6,47 г/л). Учитывается также радиоактивность и органолептические свойства используемой геотермальной воды [1]. Критерием для отбора подземной воды служит отсутствие фенолов, свинца и ртути, которые, как известно, отрицательно влияют на функции микроорганизмов [3].

Было установлено, что геотермальная вода содержала (г/л): K^+ (0,0168), Mg^{2+} (0,01), Ca^{2+} (0,0182), Na^+ (2,4112), NH_4^+ (0,005), Mn^{2+} (0,000065), Li^+ (0,0003), Si^{2+} (0,0019), Zn^{2+} (0,000069), Fe^{2+} (0,00013), Co^{2+} (0,000003), Cu^{2+} (0,000008), F^- (0,0005), Cl^- (1,2120), Br^- (0,0028), I^- (0,0002), CO_3^{2-} (0,102), HCO_3^- (0,7515), HPO_4^{2-} (0,0000474), а также органические вещества, в состав которых входят битумы (1,7 мг/л) и гумусовые вещества (3,0 мг/л) [1].

За счет использования геотермальной воды из состава среды оказалось возможным исключить хлорид калия, гидроксид аммония, сульфат аммония, дестибиотин (ростовой фактор), что снизило себестоимость продукции на 35%. Разбавление минеральной водой углеводсодержащего сырья значительно удешевляет и упрощает процесс. Вместе с высокой скоростью роста клеток дрожжей на питательной среде с добавлением минеральной воды подъемная сила, зимазная и мальтазная активность остаются в пределах ГОСТа. Дрожжи характеризуются высокой стойкостью и генеративной активностью. По содержанию белка, трегалозы, липидов и углеводов дрожжи, выращенные на геотермальной воде, не уступают дрожжам, выращенным на обычной питательной среде. При этом не требуется дополнительная очистка воды от примесей, возрастает энергетическая ценность хлеба, выпеченного из теста, приготовленного на таким образом выращенных дрожжах [1].

Исходя из рассмотренных нами данных можно предположить, что необходимо внедрение данной методики, особенно в районах залегания минеральных вод. К таким районам относится и Днепропетровская область. Минеральную воду можно использовать не только как источник минерального питания, но и вместо водопроводной воды, которая используется для разбавления углеводсодержащего сырья. Такое решение, где геотермальная вода одновременно используется для разбавления углеводсодержащего сырья, упрощает и удешевляет процесс приготовления среды, позволяет повысить продуктивность дрожжей. При

использовании минеральной воды достаточно введения одного минерального вещества – гидроортофосфата аммония, чтобы получить полноценную питательную среду, дающую биомассу с высокими биотехнологическими свойствами. Также не следует забывать, что в нашей области очень напряженная экологическая ситуация и водопроводная вода загрязнена. Используя минеральную воду, мы исключаем накопление клетками дрожжей тяжелых металлов и радионуклидов.

Таким образом, нами были рассмотрены новые разработки в области улучшения качества хлебопекарных дрожжей и удешевления самого процесса их производства, благодаря применению микродобавок биназы и панкреатической РНКазы, а также замены дорогостоящих минеральных солей геотермальной водой.

Библиографические ссылки

1. **Абрамов Ш. А.** Новая питательная среда для выращивания дрожжей / Ш. А. Абрамова, С. Ц. Котенко, Д. А. Эфендиева // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31, № 2. – С. 232–233.
2. **Иванов В. Н.** Экзо- и эндотрофия клетки. – К.: Наукова думка, 1990.
3. Инструкция по микробиологическому и техникохимическому контролю дрожжевого производства. – М.: ВНИИХП. Легкая и пищевая промышленность, 1984.
4. **Квасников Е. И.** Дрожжи. Пути развития / Е. И. Квасников, И. Ф. Щелкова. – К.: Наукова думка, 1991. – 328 с.
5. **Колпаков А. И.** Влияние экзогенных рибонуклеаз на размножение дрожжей рода *Candida*: Автореф. канд. дисс. – Казань: КГУ, 1993.
6. **Колпаков А. И.** Влияние рибонуклеазы *Bacillus intermedius* на свойства дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / А. И. Колпаков, Ф. Г. Куприянова-Ашина, И. Б. Лещинская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36, № 4. – С. 479–483.
7. **Луцкая А. Ю.** Применение панкреатической РНКазы в производстве хлебопекарных дрожжей / А. Ю. Луцкая, А. И. Колпаков, Р. М. Кепечева, Н. П. Игнатьев // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т. 34, № 5. – С. 588–591.
8. **Феофилова Е. П.** Роль трегалозы в жизнедеятельности дрожжей // Микробиология. – 1992. – Т. 61, № 5. – С. 741–755.
9. **Balaban N. P.** Proc. of the first international meeting «Structure and chemistry of ribonucleases» / N. P. Balaban, M. R. Sharipova, I. A. Golubenko. – Moscow, 1988. – P. 349–352.
10. **Vandijck P.** Appl. Environ. Microbiol / P. Vandijck, D. Colavizza, P. Smeet. – 1995. – Vol. 61, № 1. – P. 109–115.

Надійшла до редколегії 14.02.05