

Исследование пектолитической способности дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*

Федосова Анна Николаевна

ФГБОУ ВО Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина
Адрес: 308503, город Белгород, ул. Вавилова, дом 1
E-mail: fedosova.anna2011@yandex.ru

Каледина Марина Васильевна

ФГБОУ ВО Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина
Адрес: 308503, город Белгород, ул. Вавилова, дом 1
E-mail: kaledinamarina@yandex.ru

Шевченко Надежда Павловна

ФГБОУ ВО Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина
Адрес: 308503, город Белгород, ул. Вавилова, дом 1
E-mail: shevchenko_np@bsaa.edu.ru

Волощенко Людмила Викторовна

ФГБОУ ВО Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина
Адрес: 308503, город Белгород, ул. Вавилова, дом 1
E-mail: voloshenko_lv@bsaa.edu.ru

Байдина Инна Алексеевна

ФГБОУ ВО Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина
Адрес: 308503, город Белгород, ул. Вавилова, дом 1
E-mail: baydina_ia@bsaa.edu.ru

Трубчанинова Наталья Савельевна

ФГБОУ ВО Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина
Адрес: 308503, город Белгород, ул. Вавилова, дом 1
E-mail: trubchaninova_ns@bsaa.edu.ru

Научный и практический интерес представляет поиск современных биотехнологических приемов получения новых пребиотических веществ, в частности пектиновых олигосахаридов (ПОС). ПОС получают расщеплением макромолекулы пектина химическими или биохимическими способами. ПОС имеют большой потенциал использования в пищевых и кормовых целях. В работе экспериментально доказана пектолитическая способность дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*, обеспечивающая возможность получения жизнеобеспечивающего источника энергии для их роста из раствора яблочного пектина. Питательной средой и растворителем пектина служила натуральная творожная пастеризованная сыворотка. В рабочей гипотезе энергетического использования пектина ключевое место отводится ферментам дрожжей, расщепляющим полигалактуроновую цепь пектина эндополигалактуроназе и пектин-лиазае, при одновременно протекающем процессе деметилирования пектина пектинэстеразой. Приведены экспериментальные данные в подтверждение указанной гипотезы. Полученные результаты свидетельствуют об использовании продуктов расщепления пектина дрожжами по типу дыхания. Результаты исследования подтверждают наличие пектинолитической активности у дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*, что обеспечивает расщепление пектина до уровня пектиновых олигосахаридов (ПОС) и использование отдельных мономеров полигалактуроновой цепи в энергетическом обмене дрожжей.

Ключевые слова: дрожжи; творожная сыворотка; пектин; пектиназы; эндополигалактуроназа; пектин-лиаза; пектинэстераза; пектиновые олигосахариды

Введение

Процессы культивирования дрожжей с целью получения вина, хлеба, кваса известны человечеству с глубокой древности. Не потеряли своей актуальности дрожжи и в настоящее время. Наряду с традиционным направлением использования, дрожжи используются в качестве основы в генной инженерии и не менее широко используются автолизаты дрожжей как концентраты белка и биологически активных веществ (витаминов, макро- и микроэлементов) для различных отраслей пищевой промышленности. Важная особенность дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*, значимая для данной работы, заключается в отсутствии фермента β -галактозидазы, и, как следствие, они не способны расщеплять и усваивать лактозу.

Исследованная возможность роста хлебопекарных дрожжей в среде с пектином при отсутствии других доступных для них углеводов – новое направление в биологии дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*. Рост дрожжей за счет пектина возможен при одновременно протекающем ферментативном гидролизе с образованием различных форм галактуроновой кислоты – главного компонента молекулы пектина, и продуктов деструкции макромолекулы – пектиновых олигосахаридов (ПОС). ПОС являются важным фактором здоровья человека и животных.

Пектиновые олигосахариды, полученные химическими способами из пектинов растительных источников, чаще всего обладающих априори лечебными свойствами, широко изучаются медициной с целью лечения различных трудно поддающихся медикаментозному лечению заболеваний.

Использование пектиновых олигосахаридов (ПОС) для создания особых продуктов и кормов, обладающих выраженными функциональными пребиотическими свойствами является новым актуальным направлением использования пектина. В данном исследовании приоритетом в выборе сырья и способов деструкции пектина до уровня ПОС являлись доступность, стоимость, экологичность.

Литературный обзор

Согласно современной классификации, дрожжи, используемые в хлебопекарном деле, виноделии, производстве пива и спирта, относятся к одному семейству, роду и виду *Saccharomycetaceae Saccharomyces Cerevisiae* (Меледина, 2015 с. 88).

Указанные дрожжи, наряду с традиционным направлением использования (хлебопечение, виноделие, пивоварение), применяются в генной инженерии в производстве лекарственных и других необходимых человеку веществ. Широко используются и автолизаты дрожжей в качестве концентрата белка и биологически активных веществ (витаминов, макро- и микроэлементов) в различных отраслях пищевой промышленности (Банницына, 2015, с. 176-183; Тулякова, 2004, с. 60-62; Мударисов, 2009, с. 31; Эльдаров, 2014).

Дрожжи – типичные факультативные анаэробы, в анаэробных условиях жизненный цикл протекает по типу брожения, в аэробных – по типу дыхания. На тип энергетического обмена дрожжей влияет также концентрация субстрата окисления – эффекты Пастера и Кребтри. Дегрированные в анаэробных условиях митохондрии (промитохондрии) при соответствующем изменении условий культивирования дрожжей способны к восстановлению своей структуры и функции (Исламмагомедова, 2007, с. 14-15; Пономарева, 2011; Качмазов, 2012, с. 224; Меледина, 2015, с. 88; Сафонова, 2015, с. 10).

Из анализа литературных данных следует вывод: дрожжи *Saccharomyces Cerevisiae* имеют высокую жизненную силу, они растут и при брожении, и при дыхании, при высокой и низкой концентрации субстрата окисления.

Энергетической основой для роста дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* обычно являются моно- и дисахариды. Из моносахаридов дрожжи используют гексозы – глюкозу, фруктозу, галактозу, маннозу, из дисахаридов – сахарозу и мальтозу. Важная особенность дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*: они не способны расщеплять и усваивать лактозу, пентозы (рибозу, ксилозу, арабинозу), крахмал, клетчатку (Качмазов, 2012, с. 224). На отсутствие роста этого вида дрожжей в среде с лактозой указывает и Т.В. Меледина (2015).

На сегодняшний день особый интерес дрожжи *Saccharomyces Cerevisiae* представляют как возможный источник пектинолитических ферментов (Sieiro, 2012).

Научный и практический интерес к пектину применительно к культивированию дрожжей и его расщеплению не случайный. Пектин – уникальное, природой созданное вещество, используется в различных сферах жизнедеятельности человека, и особая роль пектина в пищевой отрасли и медицине. В Белгородском ГАУ разработана ассортиментная

линейка функциональных молочных продуктов с использованием пектина (Каледина, 2017, с. 65-67; Fedosova, 2017, р. 44-53, Fedosova, 2018, р. 950-959). Использование пектина в пище человека рекомендовано во всех развитых странах мира.

В литературе стали появляться данные о пребиотических свойствах пектина и его производных (Вальшев, 2012). Чтобы вещество было классифицировано как пребиотик, оно не должно подвергаться воздействию пищеварительных ферментов человека, не должно усваиваться в верхних отделах пищеварительного тракта и поступать в толстый отдел кишечника в исходном виде (Yeо, 2010, р. 267-275; Bindels, 2015, р. 303-310). Пребиотик должен быть селективным субстратом для роста и/или активации обмена веществ одного вида или группы полезных микроорганизмов (бифидобактерий, лактобактерий), заселяющих толстый кишечник пробиотиков (Gibson, 2004, р. 257-259; Roberfroid, 2007, р. 830-837). К числу известных пребиотиков относятся лактулоза и инулин. К пребиотикам нового поколения относятся олигосахариды: фруктоолигосахариды (FOS), галактоолигосахариды (GOS), олигосахариды женского молока (Magne, 2008, р. 580-588; Vode, 2015, р. 619-622; Zhao, 2017, р. 135-145; Moreno, 2017, р. 50-55).

Пектиновые олигосахариды (ПОС) относительно недавно были выявлены как пребиотики и их потенциал в настоящее время оценивается. Для получения ПОС как из агропромышленных побочных продуктов, так и из очищенных пектинов используются несколько методов, в том числе частичный ферментативный гидролиз (Gullon, 2013, р.153-161). Источниками ферментов могут выступать грибы, некоторые штаммы бацилл и дрожжей (Sieiro, 2012, р.201-218).

Третий важный компонент биотехнологической системы, рассматриваемый в данной работе – творожная сыворотка, используемая как растворитель пектина и среда для роста дрожжей. В молочной сыворотке содержатся необходимые факторы роста (доступные источники азотного питания, витамины, макро- и микроэлементы) и нет доступных углеводов для дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*. Осмотическое давление в сыворотке 0,65-0,66 МПа (Тёпел, 2012, с. 832), что обеспечит нормальное протекание осмотических и диффузионных процессов дрожжей.

Дрожжи сохраняют жизнеспособность в

широком диапазоне рН среды. Выполненное исследование влияния диапазона рН от 3 до 11 на морфологические особенности дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* доказало высокую адаптивную способность к экстремальным условиям среды. Однако оптимальное значение для роста дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* является рН 4,5 (Исламмагомедова, 2018, с. 219-225).

При выработке кисломолочных продуктов, включая творог, для образования молочного сгустка требуется активная кислотность в диапазоне рН 4,5-4,6, что совпадает с оптимальным значением рН для роста дрожжей.

Теоретическое обоснование

Предпосылкой для исследования пектолитической активности дрожжей стала выявленная высокая адаптивная способность к изменяющимся условиям. Использование пектина в качестве источника энергии для роста дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* (при отсутствии в среде других доступных углеводов) – новое направление в биологии данного вида дрожжей. Целесообразность исследования направлена на получение фрагментов макромолекулы пектина в форме пектиновых олигосахаридов (ПОС) с помощью пектолитических ферментов дрожжей. Использование ПОС в качестве пребиотического фактора в производстве пищи и кормов также является относительно новым научным направлением.

Цель исследования

Исследование пектолитической способности хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* при культивировании в среде с пектином и отсутствии других доступных углеводов.

Задачи исследования

Тест-исследование реагирования указанных дрожжей на наличие в среде пектина;

Исследование способности дрожжей деструктурировать пектин как первый этап к возможности его использования;

Количественная оценка роста дрожжей (по массе сырого осадка) при культивировании в среде с пектином и отсутствии других доступных углеводов.

Рабочая гипотеза в исследовании

Высокая адаптивная способность дрожжей к условиям культивирования позволяют предполагать наличие пектолитических ферментов (пектиназ). У хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* Секреция пектиназ из дрожжевой клетки в виноматериал доказана в технологии белых столовых вин (Лисовец, 2017, с. 106).

Энергетическое использование пектина возможно только при синхронно протекающем ферментативном ступенчатом его гидролизе пектолитическими ферментами дрожжей. В направлении образования ПОС должны работать два вида ферментов: эндополигалактуроназа и пектин-лиазы.

Эндополигалактуроназа катализирует гидролиз полигалактуроновой цепи пектина внутри молекулы, его активность измеряется вискозиметрическим методом (ГОСТ Р 55298-2012).

Пектин-лиазы катализируют неупорядоченное расщепление высокоэтерифицированного пектина (как с конца цепи, так и внутри молекулы) не гидролитическим путем за счет трансэлиминирования с образованием двойной связи в положении 4,5 галактуронового цикла (ГОСТ Р 55979-2014). Наличие двойной связи в положении 4,5 пиранового цикла теоретически позволяет трансформировать галактозу в глюкозу – стартовый субстрат окисления и для брожения и для дыхания дрожжей. Действие ферментов пектин-лиаз должно проявляться в приросте биомассы дрожжей.

В пектолитическом процессе может участвовать фермент пектинэстераза, катализирующий гидролиз сложноэфирных связей метоксилированных участков пектина с образованием кислотной группы и метилового спирта. Активность пектинэстеразы измеряется (ГОСТ Р 55298-2012) повышением кислотности среды.

Продукты гидролиза молекулы пектина (ПОС), полученные с участием дрожжей, предполагается использовать в качестве пребиотика для роста пробиотических культур при производстве как пищевой, так и кормовой продукции.

Реализация поставленной цели и задач исследования базируются на указанной выше гипотезе.

Материалы и методы

Работа выполнялась на базе специализированной учебно-научной лаборатории исследования сырья и продуктов животного происхождения Белгородского ГАУ.

Объекты исследования:

- Творожная сыворотка, ГОСТ Р 53438-2009.
- Пектин яблочный (биологически активная добавка к пище), степень этерификации 75%, ТУ 9199-012-01014470-04.
- Прессованные дрожжи «Люкс», без консервантов, предназначенные для традиционного хлебопечения, производитель ЗАО «Красноярский дрожжевой завод»;
- Дрожжи сухие «Фермипан. Красный» растворимые, приготовленные из чистой высокоактивной культуры дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* современным методом высушивания, предназначены для основного хлебопечения, содержат только эмульгатор Е491, производитель ООО «Воронежские дрожжи».

Методы исследований. При выполнении физико-химических исследований применялись стандартные и общепринятые методы. Показатели, определяемые в работе:

- титруемая кислотность, ГОСТ Р 54669-2011, титриметрическим индикаторным методом;
- активная кислотность (рН), ГОСТ Р 54669-2011, потенциометрическим методом рН-метр/иономер Мультитест ИПЛ-201;
- вязкость, вискозиметрическим методом ГОСТ Р 55298-2012 для пектин содержащих объектов, вискозиметр Оствальда с диаметром капилляра 0,95мм;
- масса осадка, гравиметрическим методом, с точностью взвешивания 0,001 г.

Достоверность результатов исследований подтверждена математической обработкой с вычислением средних арифметических значений, среднестатистических ошибок и критерия достоверности не менее 0,95.

Обработка экспериментальных данных, построение графиков проводились на ПЭВМ с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 и Microsoft Office Excel 2010.

Методика исследований

Исследование проводилось на хлебопекарных дрожжах, культивируемых в творожной сыворотке, используемой в качестве жидкой питательной

среды, с внесением в нее пектина. Творожную сыворотку предварительно пастеризовали при температуре 90-95°C с целью исключения побочного влияния живых форм молочнокислых бактерий. В сыворотку при температуре 70-72°C вносили непрерывными малыми порциями при интенсивном перемешивании порошок пектина. Сывороточный раствор пектина фильтровали через сетчатый фильтр с целью получения однородной гомогенной структуры. В подготовленную питательную сывороточно-пектиновую среду при температуре 26-28°C вносили дрожжи, смесь перемешивали до образования однородной смеси. В исследованиях использовались прессованные и сухие дрожжи. Температура культивирования дрожжей 26-28°C. Компоненты смеси (сыворотка, пектин и дрожжи) взвешивали на лабораторных весах с точностью до 0,001 г.

Для оценки действия указанных в рабочей гипотезе пектиназ при культивировании дрожжей определяли показатели: относительную вязкость по истечению жидкости через капилляр диаметром 0,95 мм, принимая время истечения жидкости контроля за единицу. титруемую и активную кислотность. На заключительном этапе исследования, в дополнении к перечисленным показателям, измеряли прирост массы дрожжей по массе сырого осадка, взвешенного после центрифугирования проб со скоростью вращения центрифуги 5000 об/мин в течение 10 мин. В контроль дрожжи не вносили, пробы центрифугировали при тех же условиях. Жесткий режим центрифугирования обеспечивал формирование плотного осадка, позволяющего сливать без потерь надосадочную жидкость. Исполняя все правила гравиметрического метода, была проведена количественная оценка роста дрожжей в среде с пектином. Массу дрожжей определяли по разности общей массы осадка опытных образцов и массой осадка в контрольной пробе.

Дополнительные сведения к методикам указаны в конкретных исследованиях ниже.

Результаты и обсуждение

Средой для культивирования дрожжей во всех вариантах выполненного исследования являлась творожная сыворотка. Стартовые физико-химические показатели сыворотки определяли после пастеризации, охлаждения до температуры 20-22°C и фильтрации через фильтрующую ткань, с целью удаления взвешенных частиц

коагулированного белка (Таблица 1, средние арифметические результаты, n = 3).

Предварительно выполнено тестовое исследование по выявлению реагирования указанных дрожжей на присутствие пектина при одновременном наличии в среде глюкозы.

Массовая доля глюкозы в стартовой смеси составляла 1%, прессованных дрожжей – 1% к массе сыворотки. Смесь в форме однородной суспензии, делили пополам, разливая в конические колбы вместимостью 300 см³, обеспечивающих естественный достаточный доступ воздуха. В опытную пробу вносили 1% пектина.

Влияние пектина на жизнедеятельность хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* при наличии в среде глюкозы отражено в Таблице 2.

В пробах с пектином и кислотность, и вязкость относительно контроля была выше за счет химической природы пектина. Из Таблицы 1 следует, что дрожжи положительно реагируют на пектин, он стимулирует процесс брожения даже в присутствии глюкозы.

На следующем этапе исследовали способность дрожжей осуществлять свой жизненный цикл при наличии в сыворотке только пектина. В подготовленную творожную сыворотку вносили 1% прессованных дрожжей, смесь перемешивали до гомогенной суспензии. В опытную пробу вносили 1% пектина. В данном эксперименте и во всех последующих глюкозу не вносили.

Влияние пектина на жизнедеятельность хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* в отсутствии в среде глюкозы отражено в Таблице 3.

В контроле (Таблица 3) исследуемые показатели не изменялись, дрожжи не росли. Необходимо отметить, указанные дрожжи не могут расщеплять лактозу, и творожная сыворотка исполняет роль только жидкой питательной среды. В опыте уже через 3 часа наблюдалось заметное выделение газа в виде множества мелких пузырьков и этот эффект сохранялся в течение всего периода наблюдения.

Выполненный эксперимент указывает на способность дрожжей расщеплять пектин и использовать его в качестве источника энергии. В пробе с пектином через 3 часа относительная вязкость понизилась в 1,59 раза, что свидетельствует о работе фермента эндополигалактуроназы.

Таблица 1

Стартовые физико-химические показатели творожной сыворотки

Сухое вещество, %	Плотность, при 20°C, кг/м ³	Кислотность		Время истечения через капилляр, сек		Вязкость Па·с
		титруемая, °Т	активная, рН	вода	сыворотка	
6,0	1027,5	65	4,51	12,2	13,65	1,034·10 ⁻³

Таблица 2

Влияние пектина на жизнедеятельность хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при наличии в среде глюкозы

Время от начала, час	Контроль (проба с глюкозой)			Опыт (проба с глюкозой и пектином)		
	кислотность		Относительная вязкость к исходной сыворотке	кислотность		Относительная вязкость к исходной сыворотке
	рН	°Т		рН	°Т	
Старт	4,51	64	1,05	4,42	66	2,33
	Пробы на старте одинаковые (газообразования нет)					
3	4,51	64	1,05	4,23	72	2,31
	умеренное выделение газа			обильное газообразование газа		
24	4,50	65	1,05	4,16	75	2,46
	Разница между контролем и опытом сохраняется					

Таблица 3

Влияние пектина на жизнедеятельность хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в отсутствие в среде глюкозы

Время от начала, час	Контроль (без пектина)			Опыт (в среде пектин)		
	кислотность		Относительная вязкость к исходной сыворотке	кислотность		Относительная вязкость к исходной сыворотке
	рН	°Т		рН	°Т	
Старт	4,51	65	1,04	4,35	71	3,5
3	4,51	65	1,03	4,32	75	2,2
24	4,51	65	1,04	4,31	79	3,1

Повышение вязкости в пробах с пектином через 24 часа можно объяснить приростом биомассы дрожжей (заметный белый слой внизу колбы), влияющей на скорость истечения смеси через капилляр вискозиметра. Возникла очевидная необходимость центрифугирования проб. Режим центрифугирования оптимизировался, четкое технологичное разделение наблюдалось при 5000 об/мин в течение 10 мин.

В последующих исследованиях использовались сухие хлебопекарные дрожжи с высоким содержанием чистой культуры *Saccharomyces Cerevisiae*, без консервантов и дополнительных компонентов. Базовой основой был также сывороточный 1%-ный раствор пектина. Дрожжи вносили в количестве 0,1% (Опыт 1) и 0,3% (Опыт 2) к массе питательной среды.

Динамика изменения массы осадка в пробах при культивировании дрожжей в среде с пектином приводится на диаграмме (Рисунок 1).

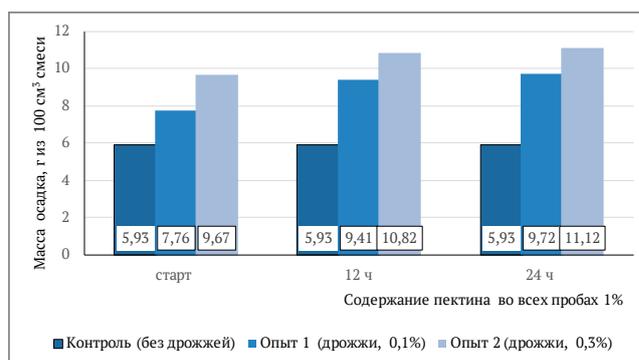


Рисунок 1. Динамика изменения массы осадка в пробах при культивировании дрожжей в среде с пектином.

Результаты исследования, приведенные на Рисунок 1, достоверно подтверждают возможность роста дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* за счет энергетического использования пектина, при отсутствии в среде других доступных для них углеводов.

В дополнении к диаграмме (Рисунок 1) в Таблице 4 отражено влияние пектина на физико-химические показатели жизнедеятельности хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*.

Масса дрожжей (Таблица 4) в Опыте 1 через 24 часа увеличивалась практически в два раза. При повышении доли дрожжей в исходной смеси (Опыт 2) прирост массы дрожжей был меньше и составлял 1,3 раза. Наблюдаемый факт косвенно указывает на отсутствие возможности достаточного уровня гидролиза пектина, а доступной доли пектина в Опыте 2 (содержание сухих дрожжей 0,3% в исходной смеси) явно не хватает для их активного роста. Способность дрожжей использовать пектин в качестве источника энергии подразумевает его гидролиз. У всех полимеров гидролиз протекает ступенчато, что приводит к накоплению в среде фрагментов стартовой молекулы процесса. Расщепление пектина неизбежно связано с образованием в среде фрагментов молекулы кислотного типа, состоящих из α -D-галактуронової кислоты и ее метилированной формы. В данном исследовании промежуточные продукты гидролиза объединены общим понятием пектиновые олигосахариды (ПОС). Понижение вязкости в среде с пектином свидетельствует о расщеплении молекулы пектина пектолитическими ферментами дрожжей, что обеспечивает их рост при отсутствии других доступных углеводов и отражается в приросте массы.

Во всех выполненных исследованиях при культивировании дрожжей в среде с пектином имеет место достоверное повышение титруемой кислотности, что указывает на действие фермента пектинэстеразы, отщепляющей метанол от этерифицированных карбоксильных групп глюкононової кислоты.

Ряд косвенных показателей (наличие мелких пузырьков газа, равномерно распределенных в смеси, слабый запах этанола, естественный доступ воздуха к культуре дрожжей с пектином, отсутствие доступных углеводов) указывают на рост дрожжей за счет дыхания. При дыхании дрожжи сохраняют жизнеспособность в течение длительного времени при низком расходе субстрата окисления и достаточном его содержании в среде.

С целью подтверждения, изложенной выше рабочей гипотезы, выполнен дополнительный эксперимент, направленный на изучение продолжительности жизни дрожжей в среде с пектином.

В выполненном эксперименте пастеризованная

сывороточно-пектиновая смесь содержала порошка пектина 1%, сухих дрожжей 0,1%.

Влияние продолжительности культивирования на жизнедеятельность хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* в среде с пектином приводится в Таблице 5.

Полученные результаты (Таблицы 4, 5) подтверждают изложенную выше рабочую гипотезу по наличию пектолитической способности хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*. Невысокий расход энергетического материала и жизнеспособность дрожжей в течение длительного времени указывают на аэробный путь его использования по типу классического дыхания.

Выводы

Результаты исследования достоверно подтверждают наличие пектолитической способности у хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*, обеспечивающей возможность активного роста за счет энергетического использования пектина, при отсутствии других доступных для них углеводов.

Расщепление пектина пектолитическими ферментами неизбежно связано с образованием в среде фрагментов молекулы кислотного типа, состоящих из α -D-галактуронової кислоты и ее метилированной формы, объединенных общим понятием пектиновые олигосахариды (ПОС).

К пектиновым олигосахаридам проявляет необычайно высокий интерес медицина, и в стадии научного исследования ПОС изучаются в качестве пребиотиков нового поколения в производстве продукции для людей, животных и птицы.

Хлебопекарные дрожжи можно использовать в качестве биологического способа синтеза ПОС с одновременным обогащением среды комплексом биологически важных веществ клеток дрожжей после последующего их автолиза.

Предполагаемые направления использования результатов исследования:

- расширение спектра веществ пребиотической направленности для применения в пищевой промышленности и агропромышленном комплексе;
- разработка новых технологических решений комплексной и безотходной переработки сырья, в том числе технологии бифидогенных добавок;

Таблица 4

Влияние пектина на физико-химические показатели жизнедеятельности хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ($n = 3, P > 0,95$)

Наименование показателя	Контроль без дрожжей	Опыт 1 (дрожжи 0,1%)			Опыт 2 (дрожжи 0,3%)		
		старт	12 ч	24 ч	старт	12 ч	24 ч
Титруемая кислотность, °Т	75	75	80	87	75	85	87
Вязкость относительно контроля	1,00	1,12	1,08	0,91	1,14	1,08	0,91
Масса дрожжей, г из 100 см ³ смеси	-	1,83	3,48	3,79	3,74	4,89	5,19
Прирост массы дрожжей, относительно старта, %	-	100	190,2	207,1	100	130,7	138,8

Таблица 5

Влияние продолжительности культивирования на жизнедеятельность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в среде с пектином ($n = 3, P > 0,95$)

Наименование показателя	Контроль без дрожжей	Продолжительность культивирования дрожжей, час			
		старт	24	72	120
Титруемая кислотность, °Т	73	73	87	84	82
Вязкость относительно контроля	1	0,92	0,86	0,83	0,81
Общая масса осадка, г из 100 см ³ смеси	5,91	7,72	9,45	10,35	10,41
Масса дрожжей, г из 100 см ³ смеси	-	1,81	3,52	4,44	4,50
Прирост массы дрожжей относительно старта, %	-	100	195,6	245,3	248,6

- расширение ассортимента продукции бифидогенного действия, как пищевой, так и кормовой продукции для животных и птицы.

В рамках программы импортозамещения разработка и внедрение технологий производства пребиотиков на базе собственных ресурсов является перспективным направлением, поскольку рынок отечественных пребиотиков практически отсутствует. Использование вторичного сырья (сыворотка, жом и др.) для решения поставленной задачи экономит ресурсы пищевой отрасли, увеличивает экономическую эффективность производства.

Благодарность

Научная работа выполняется при поддержке гранта Министерства сельского хозяйства Российской Федерации №8 от 21.02.2019 «Разработка бифидогенной кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птицы на основе гидролиза пектина».

Литература

Банницына Т.Е., Ле АньТуан, Канарский А.В. Применение дрожжей и продуктов их

переработки в пищевой промышленности // Вестн. Воронежского ГАУ. 2015. № 4 (47). С. 176-183.

Вальшев А.В., Головченко В.В. Пребиотическая активность пектинов и их производных // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). 2012. №3. URL: http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-3%20/Annotations/a_5Valyshev-Golovchenko.pdf (дата обращения 25.07.19).

Влияние условий культивирования на выход и качество хлебопекарных дрожжей / О.И. Пономарева [и др.] // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2011. С.10.

Влияние экстремальных значений pH на морфологические особенности дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* / Э. А. Исламмагомедова [и др.] // Изв. Самарского научн. центра Российской академии наук. Общая биология. 2018. т.20, №5(2) с.219-225.

ГОСТ Р 55298-2012. Методы определения пектолитической активности. М.: Стандартинформ, 2014. 39 с.

ГОСТ Р 55577-2013. Продукты пищевые специализированные и функциональные. Информация об отличительных признаках и эффективности (с измен. N 1 от 2017 г.). М.: Стандартинформ, 2014. 45 с.

ГОСТ Р 55979-2014. Методы определения пектат- и пектин-лиазной активностей. М.: Стандартинформ, 2014. 20 с.

- Дрожжи *Saccharomyces Cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: учеб. пособие / под. ред. Т.В. Мелединой, С.Г. Давыденко. СПб.: Университет ИТМО, 2015. 88 с.
- Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство: учебное пособие / под. ред. Г. С. Качмазова. СПб.Изд. Лань, 2012. 224 с
- Исламмагомедова Э.А., Котенко С.Ц. Физиолого-биохимические особенности дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* в зависимости от состава среды культивирования // Пиво и напитки. № 4. 2007. С.14-15.
- Каледина М.В., Федосова А.Н. Использование полисахаридов в технологии функциональных продуктов // Молочная промышленность. 2017. № 6. С. 65-67.
- Лисовец У.А., Агеева Н.М. Секреция ферментов из дрожжевой клетки в виноматериал в технологии белых столовых вин // Науч. труды КубГТУ. № 5. 2017. С. 93-106.
- Мударисов Т., Яхин А., Кумарин С. Автолизат пивных дрожжей в рационах // Животноводство России. 2009. № 8.С.31.
- Сафонова Е.А., Потапов А.Н., Вагайцева Е.А. Интенсификация технологических процессов производства пива при использовании роторно-пульсационного аппарата//Техника и технология пищевых производств. 2015. № 1. 10 с.
- Тёпел А. Химия и физика молока / пер. с нем. С. А. Фильчаковой. СПб. Профессия, 2012. 832 с.
- Тулякова Т.В., Пасхин А.В., Седов В.Ю. Дрожжевые экстракты – безопасные источники витаминов, минеральных веществ и аминокислот // Пищевая промышленность. 2004. № 6. с. 60-62.
- Эльдаров М.А., Равин Н.В. Дрожжи как фабрика для получения лекарств // Центр «Биоинженерия» РАН. 2014. URL: http://portal.tpu.ru/SHARED/a/ALLYSY/academic/Tab4/pr10_dr.pdf (дата обращения: 15.07.2019).
- Bindels L.B., Delzenne N.M., Cani P.D. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2015. no. 12. pp. 303–310. doi:10.1038/nrgastro.2015.47
- Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides // *Early Hum Dev*. 2015. no. 91(11). pp. 619–622.
- Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides / Moreno F.J. et al. // *Current Opinion in Food Science*. 2017. no.13. pp. 50–55.
- Effects on faecal microbiota of dietary and acidic oligosaccharides in children during partial formula feeding / F. Magne et al. // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2008. no. 46 (5). pp. 580-588.
- Fedosova A.N., Kaledina M. V. New Approaches to Creating Functional Products for a Closed Milk-Polysaccharide System // *Foods and Raw Materials*. 2017. no. 5(2). pp. 44-53.
- Gibson G. R., Probert H. M., Van Loo J. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics // *Nutr Res Rev*. 2004. no. 17. pp. 257-259.
- Gómez B, Gullón B, Yáñez R. Pectic oligosaccharides from lemon peel wastes: production, purification, and chemical characterization // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013. no. 61. pp. 43–53. doi: 10.1021/jf402559p
- Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties / B. Gullon et al.//*Trends Food Sci Tech*. 2013. no. 30(2). pp.153–161.
- Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited // *J. Nutr*. 2007. no. 137(3 Suppl. 2). pp. 830-837.
- Sieiro C. Microbial pectic enzymes in the food and wine industry // *Food Industrial Processes – Methods and Equipment*. 2012. URL: <http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes-methods-and-equipment/microbial-pecticenzymes-in-the-food-and-wine-industry>
- The phenomenon of pectin and its use in the dairy industry / A.N. Fedosova [et al] // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. no. 9(5). pp. 950-959.
- Yeo S.K., Liong M.T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk // *J. Sci. Food Agric*. 2010. no. 90 (2). pp. 267-275.

Research of the Pectolytic Ability of *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast

Anna N. Fedosova

*Belgorod State Agricultural University named after V.Ya. Gorina
1 Vavilova str., Belgorod, 308503, Russian Federation
E-mail: fedosova.anna2011@yandex.ru*

Marina V. Kaledina

*Belgorod State Agricultural University named after V.Ya. Gorina
1 Vavilova str., Belgorod, 308503, Russian Federation
E-mail: kaledinamarina@yandex.ru*

Nadezhda P. Shevchenko

*Belgorod State Agricultural University named after V.Ya. Gorina
1 Vavilova str., Belgorod, 308503, Russian Federation
E-mail: shevchenko_np@bsaa.edu.ru*

Lyudmila V. Voloshenko

*Belgorod State Agricultural University named after V.Ya. Gorina
1 Vavilova str., Belgorod, 308503, Russian Federation
E-mail: voloshenko_lv@bsaa.edu.ru*

Inna A. Baydina

*Belgorod State Agricultural University named after V.Ya. Gorina
1 Vavilova str., Belgorod, 308503, Russian Federation
E-mail: baydina_ia@bsaa.edu.ru*

Natalya S. Trubchaninova

*Belgorod State Agricultural University named after V.Ya. Gorina
1 Vavilova str., Belgorod, 308503, Russian Federation
E-mail: trubchaninova_ns@bsaa.edu.ru*

The searching for modern biotechnological techniques of obtaining new prebiotic substances, particularly of pectin oligosaccharides (POS) is the scientific and practical value. Pectin oligosaccharides (POS) are obtained by cleavage of pectin macromolecules by chemical or biochemical methods. Pectin oligosaccharides (POS) have great potential for food and feed use. The pectolytic ability of *Saccharomyces Cerevisiae* yeast has been experimentally proved in the work, providing the possibility of obtaining a life-supporting energy source for their growth from apple pectin solution. Nutrient medium and pectin solvent were natural curd pasteurized whey. In the working hypothesis of the energy use of pectin, the key place is given to yeast enzymes that break down the polygalacturonic chain of pectin endopolygalacturonase and pectin lyase, while the process of demethylation of pectin with pectin esterase occurs. The results of the study confirm the presence of pectinolytic activity in the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*, which ensures the breakdown of pectin to the level of pectin oligosaccharides (POS) and the use of individual polygalacturonic chain monomers in the energy metabolism of yeast.

Keywords: yeast; curd whey; pectin; pectinases; endopolygalacturonase; pectin lyase; pectin esterase; pectin oligosaccharides (POS)

Acknowledgments

The scientific work is supported by the grant of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation № 8 dated 02.21.2019 “Development of bifidogenic feed additives for farm animals and poultry based on pectin hydrolysis”.

References

- Bannicyna T.E., Le An'Tuan, Kanarskij A.V. Primenenie drozhzhej i produktov ih pererabotki v pishchevoj promyshlennosti [Application of yeast and products of their processing in the food industry]. *Vestnik Voronezhskogo GAU [Bulletin of Voronezh agrarian University]*, 2015, no. 4 (47), pp. 176-183.
- Valyshev A.V., Golovchenko V.V. Prebioticheskaya aktivnost' pektinov i ih proizvodnyh [Elektronnyi resurs] [Prebiotic activity of pectins and their derivatives], 2012, no. 3. URL: http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-3%20/Annotations/a_5Valyshev-Golovchenko.pdf (accessed 25.07.19)
- Ponomareva O.I., Chernysh V.G., Borisova E.V., Prohorchik I.P. Vliyanie uslovij kul'tivirovaniya na vyhod i kachestvo hlebopekarnyh drozhzhej [Influence of cultivation conditions on the yield and quality of baking yeast]. *Nauchnyj zhurnal NIUITMO. Seriya «Processy i apparaty pishchevyh proizvodstv» [The scientific journal ITMO. Series "Processes and devices of food production"]*, 2011, pp.10.
- Islammagomedova E. A., Halilova E.A., Kotenko S. C., Gasanov R. Z., Aliverdieva D. A. Vliyanie ekstremal'nyh znachenij pN na morfologicheskie osobennosti drozhzhej Saccharomyces Cerevisiae [Influence of extreme pH values on morphological features of yeast Saccharomyces cerevisiae]. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk. Obshchaya biologiya [Proceedings of the Samara scientific center of the Russian Academy of Sciences. General biology.]*, 2018. vol. 20, no. 5(2), pp.219-225.
- GOST R 55298-2012. Metody opredeleniya pektoliticheskoy aktivnosti [Methods for the determination of pectolitic activity]. M.: Standartinform, 2014, 39 p.
- GOST R 55577-2013. Produkty pishchevye specializirovannye i funkcional'nye. Informaciya ob otlichitel'nyh priznakah i effektivnosti [Food products are specialized and functional. Information on distinguishing features and effectiveness]. M.: Standartinform, 2014, 45 p.
- GOST R 55979-2014. Metody opredeleniya pektat- i pektin-liaznoj aktivnostej [Methods of determining pectolyase and pectinase activities]. M.: Standartinform, 2014, 20 p.
- Meledina T.V., Davydenko S.G. Drozhzhi Saccharomyces cerevisiae. Morfologiya, himicheskij sostav, metabolism [Saccharomyces cerevisiae. Morphology, chemical composition, metabolism], SPb.: Universitet ITMO, 2015, 88 p.
- Kachmazov G. S. Drozhi brodil'nyh proizvodstv. Prakticheskoe rukovodstvo [Yeast fermentation industries. Practical guide]. SPb: Lan', 2012, 224 p.
- Islammagomedova E.A., Kotenko S.C. Fiziologo-biohimicheskie osobennosti drozhzhej Saccharomyces cerevisiae v zavisimosti ot sostava sredy kul'tivirovaniya [Physiological and biochemical features of Saccharomyces cerevisiae depending on the composition of the culture medium]. *Pivo i napitki [Beer and drinks]*, no. 4, 2007, pp.14-15.
- Kaledina M.V., Fedosova A.N. Ispol'zovanie polisaharidov v tekhnologii funkcional'nyh produktov [The use of polysaccharides in the technology of functional products]. *Molochnaya promyshlennost' [Dairy industry]*, 2017, № 6, pp. 65-67.
- Lisovec U.A., Ageeva N.M. Sekreciya fermentov iz drozhzhevoj kletki v vinomaterial v tekhnologii belyh stolovyh vin [Secretion of enzymes from the yeast cell into the wine material in the technology of white table wines]. *Nauchnye trudy KubGTU [Scientific works of the Kuban state University]*, no. 5, 2017, pp. 93-106.
- Mударисов Т., Yahin А., Kumarin S. Avtolizatsiya pivnyh drozhzhej v racionah [Brewer's yeast autolysate in diets]. *Zhivotnovodstvo Rossii [Animal Husbandry of Russia]*, 2009, no. 8, pp.31.
- Safonova E.A., Potapov A.N., Vagajceva E.A. Intensifikaciya tekhnologicheskikh processov proizvodstva piva pri ispol'zovanii rotornopul'sacionnogo apparata [Intensification of technological processes of beer production using rotary pulsation apparatus]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevyh proizvodstv [Technique and technology of food production]*, 2015, no. 1, 10 p.
- Tyopel A. Himiya i fizika moloka [Chemistry and physics of milk]. SPb. Professiya, 2012, 832 p.
- Tulyakova T.V., Paskhin A.V., Sedov V.YU. Drozhzhevye ekstrakty – bezopasnye istochniki vitaminov, mineral'nyh veshchestv i aminokislot [Yeast extracts are safe sources of vitamins, minerals and amino acids]. *Pishchevaya promyshlennost' [Food industry]*, 2004, no. 6, pp. 60-62.
- El'darov M.A., Ravin N.V. Drozhzhi kak fabrika dlya polucheniya lekarstv. Centr «Bioinzhenneriya» RAN [Elektronnyi resurs] [Yeast as a factory for drugs. Bioengineering center of the Russian Academy of Sciences], 2014. URL: http://portal.tpu.ru/SHARED/a/ALLYSY/academic/Tab4/pr10_dr.pdf (accessed: 15.07.2019).
- Bindels L.B., Delzenne N.M., Cani P.D. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2015, no. 12, pp. 303–310. doi:10.1038/nrgastro.2015.47
- Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev*, 2015, no. 91(11), pp. 619–622.

- Fedosova A.N., Kaledina M. V. New Approaches to Creating Functional Products for a Closed Milk-Polysaccharide System. *Foods and Raw Materials*, 2017, no. 5(2), pp. 44-53.
- Fedosova A.N., Kaledina M.V., Shevchenko N.P., Voloshchenko L.V., Baydina I.A. The phenomenon of pectin and its use in the dairy industry. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2018, no. 9(5), pp. 950-959.
- Gibson G. R., Probert H. M., Van Loo J. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr Res. Rev.*, 2004, no. 17, pp. 257-259.
- Gómez B, Gullón B, Yáñez R, Parajó J.C, Alonso J.L. Pectic oligosaccharides from lemon peel wastes: production, purification, and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, no. 61, pp. 43–53. doi: 10.1021 / jf402559p
- Gullon B, Gomez B, Martinez Sabajanes M, et al. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends Food Sci Tech.*, 2013, no. 30(2), pp.153–161.
- Magne F., Hachelaf W., Suau A. et al. Effects on faecal microbiota of dietary and acidic oligosaccharides in children during partial formula feeding. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2008, no. 46 (5), pp. 580-588.
- Moreno F.J., Corzo N., Montilla A., et al. Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides. *Current Opinion in Food Science*, 2017, no.13, pp. 50–55.
- Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.*, 2007, no. 137(3 Suppl. 2), pp. 830-837.
- Sieiro C. Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. *Food Industrial Processes – Methods and Equipment*, 2012. URL: <http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes-methods-and-equipment/microbial-pecticenzymes-in-the-food-and-wine-industry>
- Yeo S.K., Liong M.T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *J. Sci. Food Agric.*, 2010, no. 90 (2), pp. 267-275.