

На правах рукописи

Храпова Анна Викторовна

**ЭПИФИТНЫЕ ДРОЖЖИ ВЫСШИХ ГРИБОВ КАК ОБЪЕКТЫ ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ КОРМОВЫХ ПРОДУКТОВ**

03.02.03 - «Микробиология»

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Оболенск – 2020

Работа выполнена в научно–исследовательской лаборатории микробиологического мониторинга кафедры «Прикладная биология и микробиология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный технический университет» Федерального агентства по рыболовству и в лабораторно-экспериментальном отделе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно–исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России, г. Астрахань.

Научные руководители:

Сопрунова Ольга Борисовна, доктор биологических наук (03.02.08 –экология), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный технический университет» Федерального агентства по рыболовству, профессор, заведующий кафедрой «Прикладная биология и микробиология».

Лужнова Светлана Алексеевна, кандидат биологических наук (03.03.01 – физиология), Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, доцент, заведующий кафедрой «Микробиология и иммунология с курсом биохимии».

Официальные оппоненты:

Градова Нина Борисова, доктор биологических наук (03.02.03 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», кафедра биотехнологии факультета биотехнологии и промышленной экологии, профессор, главный специалист.

Глушакова Анна Марковна, кандидат биологических наук (03.02.03 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», лаборатория почвенной микробиологии кафедры биологии почв Факультета почвоведения, младший научный сотрудник.

Ведущая организация: Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа.

Защита диссертации состоится «22» мая 2020 г. в 11-00 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 350.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Развитие биотехнологической промышленности в настоящее время базируется на разработке и внедрении технологий, основанных на использовании возобновляемых сырьевых ресурсов, где одной из актуальных задач является поиск новых источников белкового сырья. Значимым направлением для решения данной задачи остается разработка путей получения кормового белка, в том числе, путем микробного синтеза с использованием вторичных сырьевых ресурсов (Артюхова, Бондарева, 2013; Бабурина и др., 2018; Кошаев и др., 2013; Valle Rodriguez et al., 2014).

Дрожжи применяются во многих областях науки и производства, являясь одной из самых «технологичных» и перспективных групп микроорганизмов (Банницына и др., 2016). Наряду с гипоаллергенностью, дрожжевые культуры стимулируют усвоение питательных веществ, являются естественной альтернативой антимикробным препаратам, нейтрализуют токсины патогенных бактерий и даже вирусы (Chaucheyras-Durand et al., 2008; Victor, Bhatia, 2012).

Активные сухие дрожжи, применяющиеся в сельском хозяйстве, оказывают пробиотическое действие, взаимодействуя с аборигенной микрофлорой, стабилизируют pH желудочно-кишечного тракта и стимулируют профилактику ацидоза у жвачных животных (Дармограй, Шевченко, 2014, 2016; Chaucheyras-Durand et al., 2008).

В аквакультуре в качестве источника питательных веществ и биологически активных соединений применяются автолизаты и гидролизаты дрожжей. Иммуностимулирующие соединения, такие как β -глюканы, нуклеиновые кислоты, маннанные олигосахариды усиливают иммунные реакции и устойчивость к стрептококковой инфекции у рыб (Ferreira et al., 2010).

Дрожжевые автолизаты и экстракты в качестве источников витаминов и ростовых добавок входят в состав питательных сред, предназначенных для культивирования микроорганизмов различных физиологических групп (Аленкина и др., 2011; Базлов и др., 2012; Ковтун и др., 2014; Тимченко и др., 2010; Федорова и др., 2017).

Благодаря широкому распространению дрожжевых организмов в природе и уникальному набору их свойств, актуальным направлением является поиск новых перспективных штаммов для получения белковых продуктов (Храпова, Сопрунова, 2011; Храпова, Сопрунова, 2014; Dayo-Owoyemi, 2012; Greppi et al., 2017). Вследствие этого наблюдается растущий интерес к изучению различных экологических местообитаний с целью выявления источников биоразнообразия дрожжей (Магомедова и др., 2015; Vajaj et al., 2013; David et al., 2014).

Самым распространенным местообитанием дрожжей являются плоды и части растений, обогащенные органическими веществами, сахарами и белками. Среди подобного рода объектов можно выделить плодовые тела макромицетов, заселенные различными насекомыми, простейшими, микромицетами и бактериями (Воронина, 2009; Воронина и др., 2011, Загрядская и др., 2013; Курсанов, 2013; Gruber, 2013; Pankratov et al., 2017; Victor, Bhatia, 2012). В отличие от почвенно-ассоциированных местообитаний, исследования дрожжевых консорциумов высших грибов немногочисленны, поэтому сведений о наличии дрожжей в составе ассоциированной микробиоты недостаточно (Wei et al., 2015).

Степень разработанности темы. В настоящее время остро стоит вопрос изучения различных потенциальных источников белка, которые могут использоваться в качестве кормовой составляющей (Navarrete, 2014). Разработки в производстве функциональных добавок на основе дрожжевого белка могут стать значительным вкладом в обеспечение устойчивости экономической жизнеспособности будущего аквакультуры. Благодаря высокому содержанию белка, витаминов группы В и минералов, пивные дрожжи, их автолизаты и гидролизаты могут быть использованы в качестве источника питательных веществ для роста требовательных микроорганизмов и синтеза метаболитов.

По данным литературы, обогащение кормов биомассой каротинсинтезирующих микроорганизмов позволяет восполнить рацион сельскохозяйственных животных витаминами, аминокислотами, микро- и макроэлементами (Мусич, 2015; Червякова, 2015). В последние годы прослеживается тенденция снижения мирового вылова рыбы с одновременным увеличением потребления морепродуктов, что в свою очередь частично компенсируется ростом аквакультуры. В сложившейся ситуации возникла острая необходимость повышения устойчивости к болезням, эффективности кормления и производительности гидробионтов для существенного сокращения производственных затрат (Скоков, 2017; Яворская, 2017; Lara-Flores, 2011).

Выращивание дрожжей на средах, содержащих в своем составе вторичные продукты промышленного сырья (послеспиртовая зерновая барда, меласса), не только способствует повышенному содержанию протеина, но и позволяет решить актуальную экологическую проблему утилизации отходов производства (Римарева и др., 2015).

Таким образом, проводимые исследования по изучению и разработке дрожжевых культур в качестве белкового сырья являются актуальными и перспективными для различных отраслей производства и требуют пристального внимания.

Цель исследований. Изучение новых штаммов дрожжей ассоциированной микробиоты высших грибов для получения белковых компонентов.

Задачи исследования.

1. Выделить из эпифитной микробиоты высших грибов фоллиота (*Pholiota abstrouse*), шампиньон (*Agaricus* sp.), рядовка (*Tricholoma* sp.), чешуйчатка (*Pholiota aurivellus*), трутовик (*Laetiporus sulfareus*), навозник мерцающий (*Coprinus micaceus*), чистые культуры дрожжей, изучить их культуральные, морфологические и физиолого-биохимические свойства.
2. Изучить способность культур к накоплению дрожжевой биомассы на средах, содержащих побочные продукты производства (среда с мелассой и пивная барда).
3. Провести скрининг выделенных чистых культур дрожжей и молекулярно - генетическую идентификацию перспективных культур.
4. Установить показатели качества биомассы выбранных культур – лидеров согласно нормативно–технической документации.
5. Изучить безопасность (острую токсичность, вирулентность, токсигенность, способность к диссеминации) штаммов *Rhodotorula mucilaginosa* AgIV, *Candida tanzawaensis* TrP, *Clavispora lusitaniae* CmIII, *Wickerhamomyces anomalus* PhabV *in vivo*.
6. Изучить возможность использования названных штаммов в качестве добавки к аквариумным кормам.

Научная новизна работы. Впервые из эпифитной микробиоты высших базидиальных грибов Астраханской области (фоллиота *P. abstrouse*, шампиньон *Agaricus* sp., рядовка *Tricholoma* sp., чешуйчатка *P. aurivellus*, трутовик *L. sulfareus*, навозник мерцающий *C. micaceus*) выделены и методом секвенирования по Сэнгеру прямой нуклеотидной последовательности фрагмента ITS–региона идентифицированы новые штаммы дрожжей *R. mucilaginosa*, *C. tanzawaensis*, *C. lusitaniae*, *W. anomalus*. Изучены их культурально-морфологические (рост в жидких средах – бульон Сабуро, гигантские колонии – наибольший диаметр отмечен у культуры PhaurIII $5,5 \pm 1,5$ см, формирование псевдомицелия на картофельно-глюкозном агаре у культур PhaurIII, L.sulf, PhabV, TrP, FhI, выявление аскоспор у культур PhaurI, PhaurIII, Lsulf, TrP, Fh I и баллистоспор на модифицированной среде Городковой, осмоотолерантность – 50 % и 60 % глюкозы, рост при повышенных температурах (20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, физиолого-биохимические признаки (сбраживание глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы, раффинозы, ассимиляция источников углерода и азота: пептон, KNO_3 , NH_4^+ , меласса (0,5 %, 1%, 1,5 %, 2 %), меласса (0,5%, 1%, 1,5% и 2%) +0,5% кукурузного экстракта, качественные реакции на образование ретинола, тиамин и рибофлавина, способность к накоплению крахмалоподобных соединений, выявление амилолитической активности (зона гидролиза Phaur III $15 \pm 0,2$ мм, AgI $2 \pm 0,1$ мм, PhabV $2 \pm 0,1$ мм, PhabII $2 \pm 0,1$ мм, TrP $2 \pm 0,1$ мм, CmV $5 \pm 0,1$ мм), протеолитической активности (AgI –

гидролиз по краю колонии, $2 \pm 0,04$ мм; AgV – гидролиз по краю колонии, $2 \pm 0,05$ мм; PhabV - по краю штриха колонии, $3 \pm 0,02$ мм; PhaurIII - по краю колонии, $1 \pm 0,02$ мм), липолитической активности (зона гидролиза Phaur I $1 \pm 0,04$ мм, AgI $1 \pm 0,04$ мм, Cm III $2 \pm 0,02$ мм, Cm V $1 \pm 0,04$ мм, Cm VI $1 \pm 0,04$ мм) уреазная активность не выявлена, подобраны питательные среды - жидкая среда с мелассой (20 г/л) и пивной бардой (70 г/л) для оптимального продуцирования их биомассы. Определены показатели качества биомассы идентифицированных штаммов согласно ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия» (массовая доля влажности: *C. tropicalis* CK-4-1 – 11,8%; TrP – 8,0%; AgIV – 11,5%; PhabV – 12,4%; CmIII – 9,1%; CmV – 10,2%; CmVIII – 11,4%; массовая доля золы: *C. tropicalis* CK 4-1 – 7,8%, CmIII – 9,0%; CmV – 4,3%; CmVIII – 6,0%; TrP - 7,8%; AgIV – 7,0%; PhabV – 9,8%; массовая доля сырого протеина: *C. tropicalis* CK 4-1 – 48,0%; TrP - 64,9%; AgIV – 67,0 %; PhabV – 73,5%; CmIII – 28,0%; CmV – 89,4%; CmVII – 93,9%).

Исследована безопасность выделенных штаммов (острая токсичность, вирулентность и диссеминация, токсигенность), показана возможность их использования в качестве кормовых добавок для аквариумных рыб (на примере гуппи *Poecilia reticulata*) при изучении удельной скорости роста и увеличения веса рыбок. Более эффективное наращивание веса (47,3 мг и 45,87 мг соответственно) и удельной скорости роста (3,75% и 3,9% соответственно) за 35 суток эксперимента отмечено у рыбок с диетой автолизатов штаммов дрожжей *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalus* PhabV в качестве кормовой биодобавки в сравнении с коммерческими кормами «Дафния» и «Тетра».

Теоретическая и практическая значимость. Результаты полученных исследований расширяют и углубляют знания о популяции дрожжевой эпифитной микробиоты высших грибов Астраханской области. Выделенные и исследованные штаммы дрожжей депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Пушкин):

Штамм *C. tanzawaensis* TrP (справка № 484/10, рег. номер RCAM04985);

Штамм *W. anomalus* PhabV (справка № 485/10, рег. номер RCAM04986);

Штамм *C. lusitaniae* CmIII (справка № 486/10, рег. номер RCAM04987);

Штамм *R. mucilaginosa* AgIV (справка № 487/10, рег. номер RCAM05019).

Новые штаммы дрожжей *R. mucilaginosa* AgIV, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalus* PhabV предложены для белково-кормовых добавок. Автолизат штамма *Rhodotorula mucilaginosa* AgIV апробирован в составе комбикорма для кормления тилапии

(*Tilapia*) и гуппи (*Poecilia*) – акты производственных испытаний 12.04.2019г., 15.04.2019 г. на базе Инновационного центра «Биоаквапарк – НТЦ Аквакультуры», г. Астрахань.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование спланировано согласно поставленной цели. При выполнении работы использовали микробиологические, экспериментальные, химические и статистические методы исследований.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. В эпифитной микробиоте высших грибов Астраханской области (фолиота *P. abstrouse*, шампиньон *Agaricus* sp., рядовка *Tricholoma* sp., чешуйчатка *P. aurivellus*, трутовик *L. sulfareus*, навозник мерцающий *C. micaceus*) присутствуют преимущественно дрожжевые штаммы аскомицетового аффинитета: *C. tanzawaensis*, *C. lusitaniae*, *W. anomalus*. Исключение составляет штамм *R. mucilaginosa*, выделенный с шампиньона *Agaricus* sp., имеющий базидиомицетовый аффинитет.

2. Штаммы *R. mucilaginosa* AgIV, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalus* PhabV способны активно накапливать биомассу (AgIV- 10×10^6 кл/мл, TrP- 30×10^6 кл/мл, CmIII- 30×10^6 кл/мл, PhabV- 38×10^6 кл/мл) на средах, содержащих побочные продукты производства - среда с мелассой (20 г/л) и пивная барда (70 г/л).

3. Штаммы *R. mucilaginosa* AgIV, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalus* PhabV не проявляют острой токсичности, токсигенности и способности к диссеминации и соответствуют требованиям безопасности для живых организмов (МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов»).

4. Использование штаммов *R. mucilaginosa* AgIV, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalus* PhabV в качестве кормовой биодобавки в сравнении с коммерческими кормами способствуют наращиванию веса и удельной скорости роста аквариумных рыб (на примере гуппи *P. reticulata*). Более эффективное наращивание веса (47,3 мг и 45,87 мг соответственно) и удельной скорости роста (3,75% и 3,9% соответственно) за 35 суток эксперимента отмечено у рыбок с диетой включающей автолизаты штаммов дрожжей *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalus* PhabV в качестве кормовой биодобавки в сравнении с коммерческими кормами «Дафния» и «Тетра».

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность полученных результатов основана на использовании большого количества экспериментального материала, который обеспечивает репрезентативность выборок. Для

статистической обработки материала применяли пакет программ «BioStat-2009» (Analyst Soft Ins., США) и Microsoft Excel.

Результаты исследований представлены на студенческой научно-технической конференции АГТУ (Астрахань, 2008), Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Горбунова К.В. (Астрахань, 2008), Международной отраслевой научной конференции профессорско-преподавательского состава Астраханского государственного технического университета, посвященной 80-летию основания Астраханского государственного технического университета - АГТУ (54 ППС, Астрахань, 2010), программе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса (Астрахань, 2010 г), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Уфа, 2010), 14-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2010), XV Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2011), Всероссийской научной конференции профессорско-преподавательского состава Астраханского государственного технического университета (Астрахань, 2011), Международной заочной научно-практической конференции "Современные тенденции науки и образования" (Липецк, 2014), Международной научно-практической конференции "Инновационное развитие современной науки: проблемы, закономерности, перспективы" (Пенза, 2017), II Международной научно-практической конференции «Особенности инновационного этапа развития мировой науки» (Уфа, 2019), неоднократно докладывались на заседаниях кафедры «Прикладная биология и микробиология» ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет» Федерального агентства по рыболовству.

Личный вклад автора. Автор самостоятельно провел информационный поиск, анализ теоретических источников. Вместе с научными руководителями сформулировал цель и задачи работы, проанализировал и обобщил полученные результаты. Личное участие соискателя заключалось в проведении микробиологических, химических, экспериментальных исследований, оформлении первичной документации и статистической обработке полученных экспериментальных результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК.

Структура диссертации. Диссертация выполнена на 158 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка публикаций автора. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 56 рисунками. Список литературы содержит 259 источников, включая 137 зарубежных.

Благодарности. Особую признательность и благодарность автор выражает научным руководителям – д.б.н., профессору, зав. кафедрой «Прикладная биология и микробиология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный технический университет» Федерального агентства по рыболовству Сопруновой О.Б.; к.б.н., доценту, зав. кафедрой «Микробиология и иммунология с курсом биохимии» Пятигорского медико-фармацевтического института - филиала Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России Лужновой С.А. за ценные советы и всестороннюю помощь. Автор выражает глубокую благодарность д.м.н., директору Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России Дуйко В.В. за возможность проведения исследований на базе института и постоянную поддержку; к.б.н., с.н.с. лаборатории технологии микробных препаратов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» Щербакову А.В. за помощь в проведении молекулярно-генетической идентификации и депонировании культур, всему коллективу кафедры «Прикладная биология и микробиология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный технический университет» Федерального агентства по рыболовству за помощь и поддержку в процессе работы.

Глава 1. Актуальность поиска базы белковых продуцентов для использования в промышленном производстве (литературный обзор)

Рассмотрены экологические аспекты эпифитных дрожжей. Приведены примеры взаимодействий дрожжей с другими организмами. Представлены современные представления о систематике и генетике дрожжей. Подробно изложены перспективы использования дрожжей и дрожжевых продуктов в современной биотехнологии. Обоснована актуальность применения дрожжевых культур в качестве кормового ресурса.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объектами исследований являлись:

- высшие базидиальные грибы фоллиота (*P. abstrouse*), шампиньон (*Agaricus* sp.), рядовка (*Tricholoma* sp.), чешуйчатка (*P. aurivellus*), трутовик (*L. sulfareus*), печеночница обыкновенная (*F. hepatica*), навозник мерцающий (*C. micaceus*), произрастающие в северной части территории Астраханской области (с. Садовое, Ахтубинский район) для выделения дрожжевых культур;

- культуры дрожжей, выделенные с поверхности плодовых тел;

- коллекционный промышленный штамм *C. tropicalis* СК-4-1 (ФГБНУ ВНИИСХМ) в качестве контрольного штамма при изучении кинетики роста дрожжей при жидкофазном глубинном культивировании в колбах и периодическом культивировании в ферментере, используемый как продуцент кормового белка на средах, содержащих отходы промышленного производства (торф, отруби, меласса, барда).

- лабораторные животные - мыши линии Balb/c (виварий ФГБУ «НИИЛ» Минздрава России) для изучения безопасности (острой токсичности, вирулентности и диссеминации, токсигенности) исследуемых штаммов;

- мальки гуппи (*P. reticulata*) для изучения возможности применения биомассы живых и автолизированных клеток дрожжей в качестве биодобавки к аквариумным кормам.

Для выделения, изучения свойств, кинетики роста и получения маточных культур дрожжей при жидкофазном глубинном культивировании в колбах и периодическом культивировании в ферментере руководствовались стандартными методиками и тестами (Бабьева, Голубев, 1979; Бабьева, Чернов, 2004; Максимова, Чернов, 2006; Нетрусов и др., 2005; Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 1995). Предварительную идентификацию культур проводили с использованием определителей Кудрявцева В.И. «Систематика дрожжей» и Kurtzman et al. «The yeasts: a taxonomic study» (Кудрявцев, 1953; Kurtzman, 2014). Для молекулярно-генетической идентификации культур применяли метод секвенирования по Сенгеру с определением прямой нуклеотидной последовательности фрагмента ITS-региона (Буряченко, 2016; Baldwin et al., 1995).

Качественный состав дрожжевой биомассы (массовая доля влаги, массовая доля сырого протеина, содержание золы) определяли в соответствии с ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия».

При исследовании безопасности (острая токсичность, вирулентность, диссеминация, токсигенность) дрожжевых штаммов-лидеров руководствовались МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов» Отмечали особенности внешнего вида, двигательной активности мышей, реакцию на экспериментатора, следили за потреблением воды и корма. Диссеминационный эффект определяли посевом легких, сердца, почек, селезенки, печени и крови подопытных мышей на агаризированную среду Сабуро методом отпечатков, выросшие колонии окрашивали по Граму и микроскопировали под световым микроскопом Olympus CX41 (OlympusCorp., Япония).

Возможность использования дрожжевых штаммов в качестве добавки к кормам для аквариумных рыб изучали кормлением мальков гуппи (*P. reticulata*) контрольными кормами

- дафния и «Tetra» (сбалансированный гранулированный корм для гуппи и других живородящих аквариумных рыб) с добавлением сухой биомассы «живых» и автолизированных дрожжей в количестве 25%, 50% и 75%, определяя увеличение веса и удельную скорость роста (Gruber, 2012; Sahandi et al., 2013).

Глава 3. Скрининг и идентификация новых штаммов дрожжей, способных к накоплению максимального количества белковой биомассы

Результаты первичного скрининга по совокупности физиолого–биохимических свойств показали, что 16 предварительно выделенных дрожжевых культур, отличающихся по культуральным (окраска штриха варьировала от бежевого до насыщенного морковного) и морфологическим (овальные, округлые, удлинённые клетки диаметром от 2 до 5-6 мкм) признакам, активно растут в бульоне Сабуро и на меласно-кукурузной среде с образованием обильного осадка, плотной пленки, взвеси и выраженного помутнения. При образовании гигантских колоний наибольший диаметр отмечен у дрожжевой культуры PhaurIII ($5,5 \pm 1,5$ см). При исследовании микроморфологических признаков отметили, что большинство дрожжей не образуют псевдомицелий и баллистоспоры. Содержание в составе питательной среды 50% и 60% глюкозы оказывало незначительное угнетающее действие на скорость роста культур PhabV, PhaurI, AgIV, FhI, CmVI. Наиболее оптимальной для роста всех культур является температура 20-25 °С.

Исследуемые дрожжи сбраживают практически все использованные в эксперименте сахара (мальтоза, лактоза, галактоза, глюкоза, сахароза, раффиноза) за исключением раффинозы для культур PhaurIII, PhabII, AgI, CmVI.

При исследовании аэробной ассимиляции источников углерода и азота (пептон, KNO_3 , NH_4^+ , меласса (0,5 %, 1%, 1,5 %, 2 %), меласса (0,5%, 1%, 1,5% и 2%)+0,5% кукурузного экстракта) установлено, что основным и главным источником питания для всех исследуемых культур является углерод. Способность к синтезу тиамин, рибофлавина и фолиевой кислоты характерна для всех дрожжевых культур.

Исследуемые дрожжи отличались по проявлению ферментативной активности: липолитическая активность отмечена у пяти культур (зона гидролиза Phaur I $1 \pm 0,04$ мм, AgI $1 \pm 0,04$ мм, Cm III $2 \pm 0,02$ мм, Cm V $1 \pm 0,04$ мм, Cm VI $1 \pm 0,04$ мм), протеолитическая - у четырех (AgI – гидролиз по краю колонии, $2 \pm 0,04$ мм; AgV – гидролиз по краю колонии, $2 \pm 0,05$ мм; PhabV - по краю штриха колонии, $3 \pm 0,02$ мм; PhaurIII - по краю колонии, $1 \pm 0,02$ мм), амилолитическая – у шести культур из шестнадцати (зона гидролиза Phaur III $15 \pm 0,2$ мм, AgI $2 \pm 0,1$ мм, PhabV $2 \pm 0,1$ мм, PhabII $2 \pm 0,1$ мм, TrP $2 \pm 0,1$ мм, CmV $5 \pm 0,1$ мм); уреазная активность – отсутствует у всех дрожжевых культур.

Установлено, что отобранные в результате проведенного скрининга культуры дрожжей, способны к накоплению биомассы на средах. Исследования показали, что интенсивность роста подавляющего большинства дрожжевых культур выше на среде с мелассой. На данной среде стабильность стационарной фазы обуславливает быстрое наращивание биомассы исследуемых культур, в частности PhabV, AgIV, CmVIII (рис.1-3). Менее продуктивный рост отмечается на среде с добавлением глюкозы.

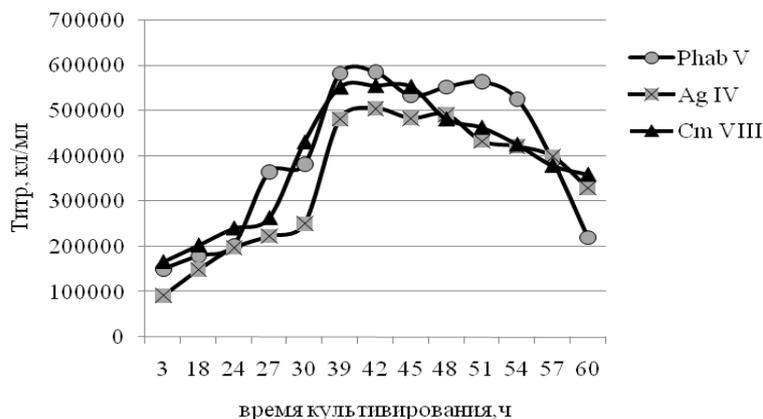


Рисунок 1 - Динамика роста клеток дрожжевых культур на среде с глюкозой

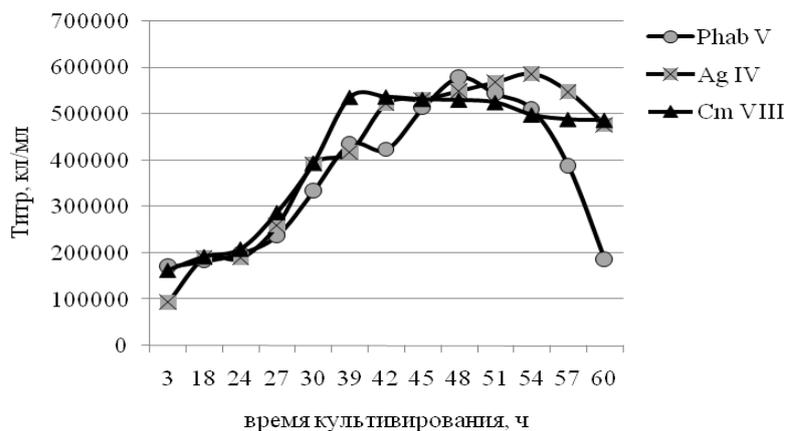


Рисунок 2 - Динамика роста клеток дрожжевых культур на пивной барде

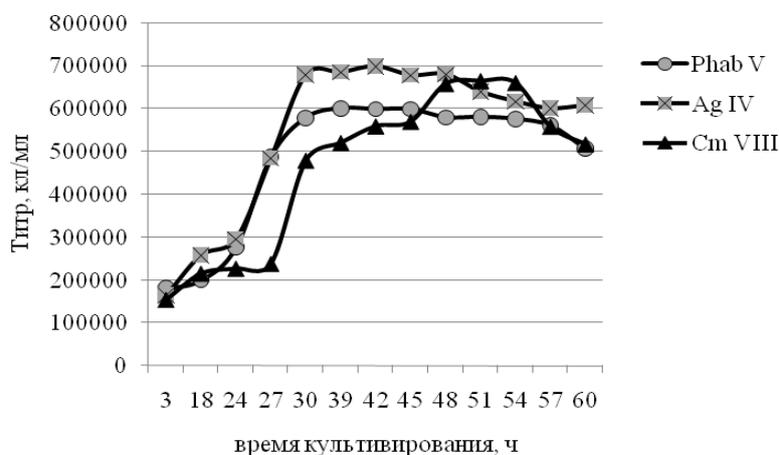


Рисунок 3 - Динамика роста клеток дрожжевых культур на среде с мелассой

При жидкофазном глубинном культивировании маточных культур в колбах на качалке установлено, что количество клеток значительно увеличивается уже через сутки

роста по сравнению с контрольным штаммом *C. tropicalis* CK-4-1. Наиболее высокий титр клеток зафиксирован у культур TrP и CmIII (30×10^6 кл/мл), PhabV (38×10^6 кл/мл), CmVIII (27×10^6 кл/мл) (рис. 4А). При выращивании маточных культур в газовой-вихревой биореакторе «Торнадо» («Саяны», Россия) все дрожжевые культуры, за исключением CmIII, показали способность накапливать биомассу значительно быстрее, чем контрольный штамм *C. tropicalis* CK-4-1. Наибольшей скоростью роста и накоплением биомассы по сравнению с контрольным штаммом *C. tropicalis* CK-4-1 отличаются PhabV и TrP: уже через 4 часа культивирования количество клеток данных культур более чем на порядок превышало контрольные показатели (рис. 4Б).

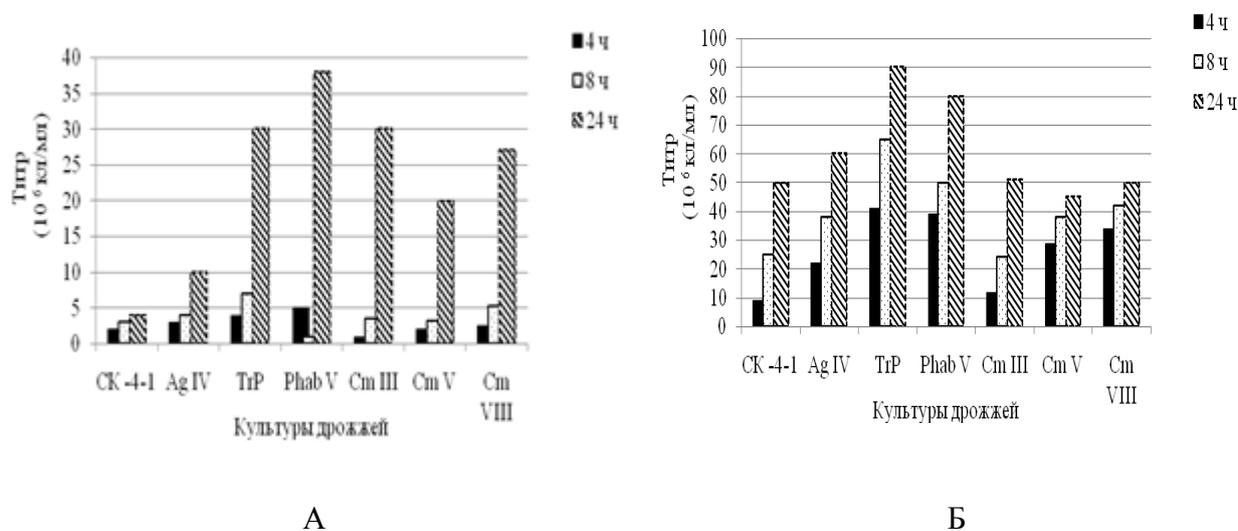


Рисунок 4 - Динамика роста титра клеток дрожжей при глубинном культивировании в колбах на качалке (А) и в ферментере (Б) (10^6 кл/мл).

При определении показателей качества дрожжевой биомассы, полученной в условиях периодического культивирования в биореакторе, установлено, что исследуемые дрожжевые культуры соответствуют требованиям ГОСТ 20083–74 по содержанию массовой доли золы и остальным показателям, за исключением массовой доли влажности для PhabV, и массовой доли сырого протеина для *C. tropicalis* CK-4-1 и Cm III (рис. 5-7).

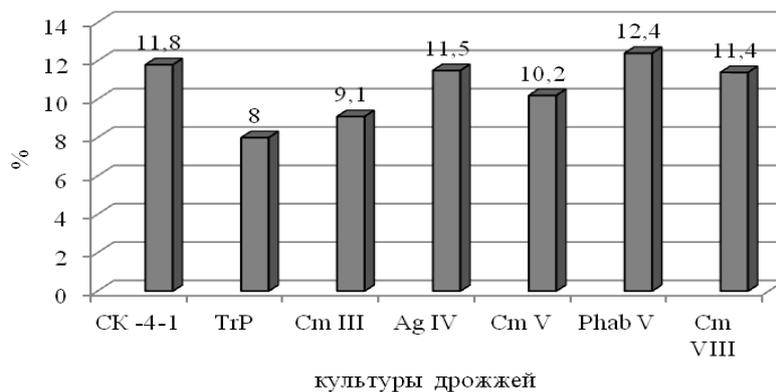


Рисунок 5 - Массовая доля влаги исследуемых дрожжевых культур

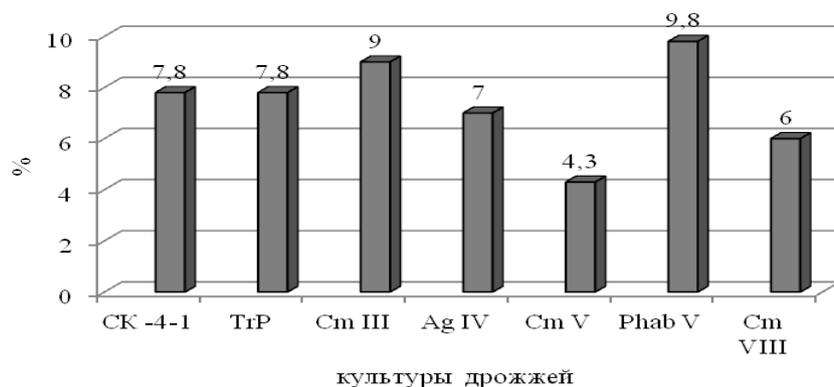


Рисунок 6 - Массовая доля золы исследуемых дрожжевых культур

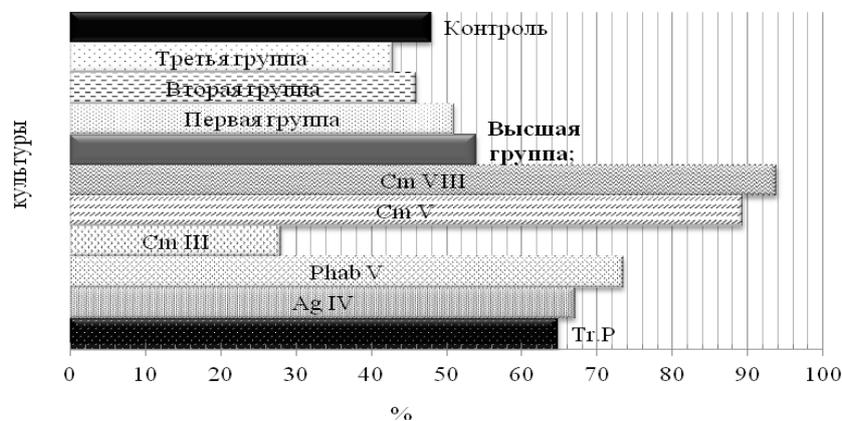


Рисунок 7 - Массовая доля сырого протеина исследуемых дрожжевых культур

Комплекс проведенных микро- и макроморфологических, физиолого-биохимических исследований, изучение кинетики роста и показателей качества дрожжевой биомассы позволили определить дрожжевые культуры-лидеры, которые использовались для проведения молекулярно-генетической идентификации и дальнейших исследований: *R. mucilaginosa*, *C. tanzawaensis*, *C. lusitaniae* и *W. anomalus*, депонированные в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Пушкин (табл. 1).

Таблица 1– Результаты анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента 18S ITS–региона рДНК идентифицированных дрожжевых штаммов

Культура	Систематическая группа	Сходство, %
AgIV	<i>Fungi; Basidiomycota; Rhodotorula; R. mucilaginosa</i> (рег.номер RCAM05019)	99,0
CmVIII	<i>Fungi; Basidiomycota; Rhodotorula; R. mucilaginosa</i>	99,0
TrP	<i>Fungi; Ascomycota; Saccharomycetales; C. tanzawaensis</i> (рег.номер RCAM04985)	99,0
CmIII	<i>Fungi; Metschnikowiaceae; C. lusitaniae</i> (рег.номер RCAM04987)	99,0
CmV	<i>Fungi; Saccharomycetales; W. anomalus</i>	99,0
PhabV	<i>Eukaryota, Saccharomycetales, Phaffomycetaceae, Wickerhamomyces, W. anomalus</i> (рег.номер RCAM04986)	99,0

Глава 4. Изучение безопасности идентифицированных штаммов дрожжей

При исследовании безопасности исследуемых дрожжевых культур установлено, что вводимые дрожжевые суспензии не оказывают негативного влияния на организм мышей, что свидетельствует об отсутствии у них токсичности (табл.2).

Таблица 2 – Дизайн эксперимента по исследованию острой токсичности

Группы	Введение <i>pe ros</i> , однократно	Группы	Введение в/б, однократно
Контроль	1 мл физ.р-р	Контроль	1 мл физ.р-р
1	CmIII, 1×10^{10} КОЕ/мышь	1А	CmIII, 1×10^{10} КОЕ/мышь
2	CmVIII, 1×10^{10} КОЕ/мышь	2А	CmVIII, 1×10^{10} КОЕ/мышь
3	AgIV, 1×10^{10} КОЕ/мышь	3А	AgIV, 1×10^{10} КОЕ/мышь
4	CmV, 1×10^{10} КОЕ/мышь	4А	CmV, 1×10^{10} КОЕ/мышь
5	TrP, 1×10^{10} КОЕ/мышь	5А	TrP, 1×10^{10} КОЕ/мышь
6	Phab V, 1×10^{10} КОЕ/мышь	6А	Phab V, 1×10^{10} КОЕ/мышь

Гибели животных не отмечено ни в одной из опытных групп. Мыши активно питались и прибавляли в весе (рис. 8).

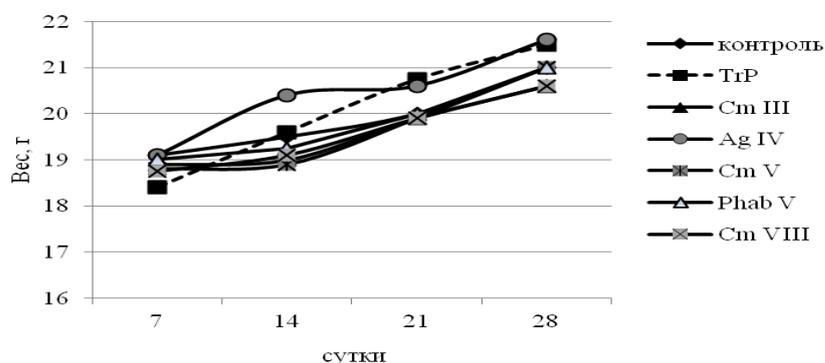


Рисунок 8 - Динамика веса мышей при исследовании вирулентности и диссеминации (1×10^7 КОЕ/мышь)

При исследовании отпечатков внутренних органов мышей выявлены дрожжевые колонии с нехарактерными для исследуемых культур морфологическими признаками, локализованные в органах преимущественно контрольной группы животных. В посевах

крови у мышей, забранной в контрольные сроки эксперимента, микроорганизмов не выявлено.

Таким образом, штаммы дрожжей *R. mucilaginosa* AgIV, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalus* PhabV не оказывают токсического, вирулентного, токсигенного действия на живой организм, не вызывают диссеминации в органах экспериментальных животных и соответствуют требованиям безопасности (МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов»).

Глава 5. Применение биомассы живых и автолизированных клеток дрожжей в качестве биодобавки к аквариумным кормам

В эксперименте по изучению применения биомассы дрожжей использовали живые и автолизированные клетки дрожжей в качестве биодобавки к аквариумным кормам, в качестве тест-объекта - трехнедельных мальков гуппи *P. reticulata*. Наибольшие показатели удельной скорости роста выявлены при кормлении диетой с автолизатом штаммов *R. mucilaginosa* AgIV (3,75 %), *W. anomalus* PhabV (3,9%) при их добавлении в объёме 50% от порции корма Tetra, и 4,3 % для обеих культур в варианте корма с дафнией (дафния+75 % автолизированных клеток) (рис. 9). Максимальное увеличение веса рыбок так же характерно при кормлении дафнией с 75% автолизированных клеток: *R. mucilaginosa* AgIV – 59,9 мг, *W. anomalus* PhabV – 57,85 мг (рис. 10). Данные показатели при добавлении в корма биомассы, как живых, так и автолизированных клеток штаммов *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII практически аналогичны таковым при кормлении кормом «Tetra» и незначительно уменьшались по сравнению с данными во второй контрольной группе («Дафния»).

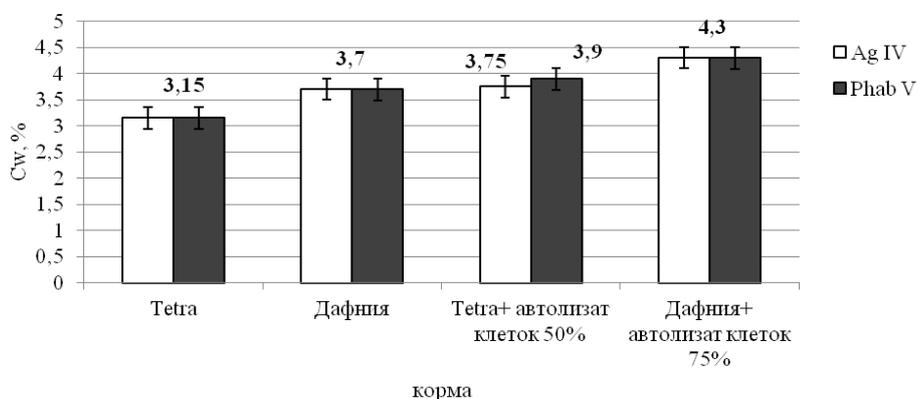


Рисунок 9 - Средние показатели удельной скорости роста гуппи *P. reticulata* при добавлении биомассы автолизированных клеток штаммов *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalus* PhabV к контрольным кормам

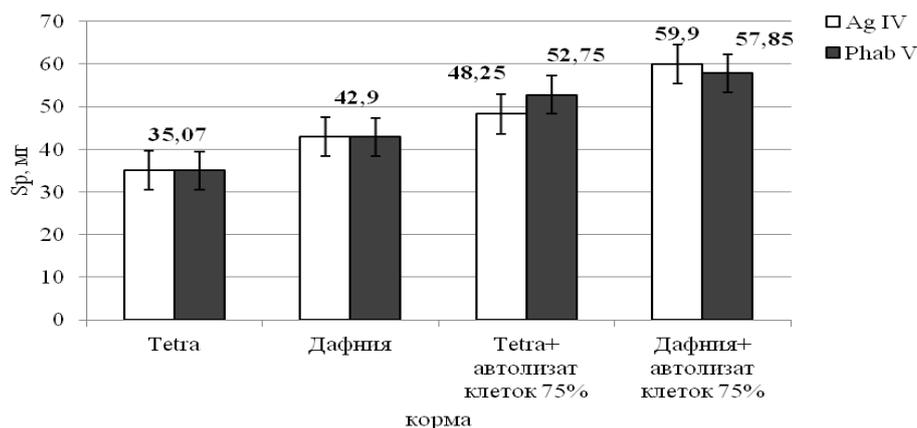


Рисунок 10 - Средние показатели увеличения веса группы *P. reticulata* при добавлении биомассы автолизированных клеток штаммов *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalous* PhabV к контрольным кормам

Таким образом, полученные результаты наглядно свидетельствуют об эффективности автолизированных клеток штаммов *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalous* PhabV в качестве биодобавки к аквариумным кормам.

Выводы

1. Из эпифитной микробиоты высших грибов Астраханской области (фолиота *P. abstrouse*, шампиньон *Agaricus* sp., рядовка *Tricholoma* sp., чешуйчатка *P. aurivellus*, трутовик *L. sulfareus*, навозник мерцающий *C. micaceus*) выделены изоляты дрожжей *R. mucilaginosa*, *C. tanzawaensis*, *C. lusitaniae*, *W. anomalous*.

2. Исследуемые культуры дрожжей способны активно накапливать биомассу (AgIV- 10×10^6 кл/мл, TrP- 30×10^6 кл/мл, PhabV- 38×10^6 кл/мл, CmIII- 30×10^6 кл/мл, CmV- 20×10^6 кл/мл, CmVIII - 27×10^6 кл/мл) на средах, содержащих побочные отходы производства - среда (20 г/л) с мелассой и пивная барда (70 г/л).

3. С помощью метода секвенирования ДНК по Сэнгеру определена первичная нуклеотидная последовательность фрагмента ITS-региона и идентифицированы новые штаммы дрожжей *R. mucilaginosa* AgIV, *R. mucilaginosa* CmVIII, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalous* PhabV, *W. anomalous* Cm V.

4. Штаммы *R. mucilaginosa* AgIV, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalous* PhabV демонстрируют преимущество по показателям качества биомассы в сравнении с контрольным промышленным штаммом *C. tropicalis* CK-4-1 согласно ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия» (массовая доля влажности: *C. tropicalis* CK-4-1 – 11,8%; TrP – 8,0%; AgIV – 11,5%; PhabV – 12,4%; CmIII – 9,1%; CmV – 10,2%; CmVIII – 11,4%; массовая доля золы: *C. tropicalis* CK 4-1 – 7,8%, CmIII – 9,0%; CmV – 4,3%; CmVIII – 6,0%; TrP - 7,8%; AgIV – 7,0%; PhabV – 9,8%; массовая доля сырого протеина: *C. tropicalis*

СК 4-1 – 48,0%; TrP - 64,9%; AgIV – 67,0 %; PhabV – 73,5%; CmIII – 28,0%; CmV – 89,4%; CmVII – 93,9%).

5. Штаммы дрожжей *R. mucilaginosa* AgIV, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalus* PhabV не оказывают токсического, вирулентного, токсикогенного действия на живой организм, не вызывают диссеминации в органах экспериментальных животных и соответствуют требованиям безопасности.

6. Более эффективное наращивание веса (47,3 мг и 45,87 мг соответственно) и удельной скорости роста (3,75% и 3,9% соответственно) за 35 суток эксперимента отмечено у рыбок с диетой включающей автолизаты штаммов дрожжей *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalus* PhabV в качестве кормовой биодобавки в сравнении с коммерческими кормами «Дафния» и «Tetra».

Рекомендации по использованию результатов работы

Результаты диссертационной работы рекомендуется использовать с целью возможного применения автолизата идентифицированных дрожжевых штаммов в составе комбикорма при выращивании тилляпии (*Tilapia*) и гуппи (*Poecilia*), апробированных на базе Инновационного центра «Биоаквапарк – НТЦ Аквакультуры», г. Астрахань для повышения рыбоводных и биологических показателей (начальная и конечная индивидуальная масса рыб, общий прирост массы, индивидуальный прирост массы, среднесуточный прирост, относительная скорость роста) при снижении затрат корма.

Список публикаций автора

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Храпова, А.В. Скрининг новых штаммов дрожжей для получения кормового белка / А.В. Храпова, О.Б. Сопрунова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13. – №. 5-3. – С. 210 – 213. РИНЦ ИФ=0.272, WoS(ZR). Количество цитирований: 6

2. Храпова, А.В., Новые изоляты дрожжей как перспективные объекты для получения кормового белка на пивной барде / А.В. Храпова, О.Б. Сопрунова // Естественные и технические науки. – 2011. – №. 6. – С. 113 –117. РИНЦ ИФ=0.197, Chemical Abstract.

3. Храпова, А.В. Дрожжи как перспективные объекты микробиологического синтеза каротиноидов / А.В. Храпова, О.Б. Сопрунова // Естественные и технические науки. – 2018. – №. 10 (124). – С. 48 –51. РИНЦ ИФ=0.197 Chemical Abstract.

В сборниках трудов конференций:

1. **Храпова, А.В.** Изучение свойств эпифитных дрожжей–спутников высших грибов / **А.В. Храпова**, О.Б. Сопрунова. Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем: Материалы международной научно–практической конференции, посвященной 100–летию со дня рождения К. В. Горбунова, 10–12 декабря 2008 года, Астрахань, Астраханский государственный технический университет – С.258 – 261.

2. **Храпова, А.В.** Скрининг новых штаммов дрожжей, перспективных для получения биомассы / **А.В. Храпова**, О.Б. Сопрунова. Международная отраслевая научная конференция профессорско-преподавательского состава Астраханского государственного технического университета, посвященная 80–летию основания Астраханского государственного технического университета – АГТУ (54 ППС), г. Астрахань, 19 – 23 апреля 2010 года. – С. 20 – 21.

3. **Храпова, А.В.** Разработка технологии получения полноценных кормовых продуктов на основе дрожжевого белка / **А.В. Храпова**, О.Б. Сопрунова. Инновационные технологии в управлении, образовании, промышленности «АСТИНТЕХ–2010» Программа «Участник молодежного научно – инновационного конкурса (У.М.Н.И.К.): Материалы Международной научной конференции 11-14 мая 2010 г., г. Астрахань. – С. 54 – 56.

4. **Храпова, А.В.** Влияние источников питания на продуктивность, физиологические и цитологические свойства дрожжей / **А.В. Храпова**, О.Б. Сопрунова. Актуальные проблемы современной науки и образования. Биологические науки: Материалы Всероссийской научно–практической конференции с международным участием. Т.П. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2010. – С.399 – 402.

5. **Храпова, А.В.** Влияние источников питания на продуктивность и свойства дрожжей / **А.В. Храпова**, О.Б. Сопрунова. Биология - Наука XXI века: 14 Международная Пущинская школа - конференция молодых ученых, сборник тезисов, том 2. – Пущино 2010. – С. 271– 272.

6. **Храпова, А.В.** Перспективы культивирования эпифитных дрожжей на пивной барде / **А.В. Храпова**, О.Б. Сопрунова. Биология - Наука XXI века: 15 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, сборник тезисов. – Пущино 2011. – С. 314 – 315.

7. **Храпова, А.В.** Использование пивной барды для получения дрожжевой биомассы / **А.В. Храпова**, О.Б. Сопрунова. Всероссийская научная конференция профессорско-преподавательского состава Астраханского государственного технического университета (55 ППС), 25 -30 апреля 2011 г. – С. 55– 56.

8. **Храпова, А.В.** Выявление особенностей цитологических признаков дрожжей при культивировании на средах с различными источниками питания / **А.В. Храпова**, О.Б.

Сопрунова. Международная заочная научно-практическая конференция «Современные тенденции науки и образования». – 2012. – С. 46 – 48.

9. **Храпова, А.В.** Выявление и изучение доминирующих представителей эпифитной микробиоты некоторых высших грибов Астраханской области / **А.В. Храпова.** IV Международная научно–практическая конференция «Инновационное развитие современной науки: проблемы, закономерности, перспективы». – 2017. – С. 35–38.

10. **Храпова, А.В.** Физиолого–биохимические особенности дрожжевой микробиоты, ассоциированной с высшими грибами Астраханской области / **А.В. Храпова, О.Б. Сопрунова.** II Международная научно–практическая конференция «Особенности инновационного этапа развития мировой науки». – 2019. – С. 53 – 57.

В других изданиях:

1. **Храпова, А.В.** Совместный скрининг новых дрожжевых культур и сырья для получения белковых продуктов / **А.В. Храпова, О.Б. Сопрунова.** // Наука и Мир. – 2014. – Т. 1. – №. 5. – С. 62 – 64. Global Impact Factor = 0.325.