

**Федеральное агентство по рыболовству
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Астраханский государственный технический университет»
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт по изучению лепры»
Минздрава России**

на правах рукописи

Храпова Анна Викторовна

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

Специальность 03.02.03— «Микробиология»

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, профессор
Сопрунова Ольга Борисовна
кандидат биологических наук, доцент
Лужнова Светлана Алексеевна

Астрахань – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПОИСКА БАЗЫ БЕЛКОВЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)	15
1.1. Распространение дрожжей – продуцентов белка	15
1.2. Современные представления о систематике и генетике дрожжей	18
1.3. Перспективы использования дрожжей и дрожжевых продуктов в современной биотехнологии	20
1.4. Дрожжи как кормовой ресурс для использования в животноводстве и аквакультуре	27
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1 Объекты исследования	32
2.2 Выделение чистых культур дрожжей	33
2.3 Молекулярно–генетический и биоинформатический методы идентификации дрожжевых культур	33
2.4. Исследование качественных и количественных характеристик дрожжевых культур	34
2.4.1 Изучение макро – и микроморфологических признаков	34
2.4.2. Изучение специфических признаков	35
2.4.3. Изучение физиолого-биохимических признаков	35
2.4.4. Изучение кинетики роста дрожжевых культур	37
2.4.5. Изучение особенностей роста дрожжевых культур при культивировании на средах с различной концентрацией источников питания	37
2.4.6. Получение маточных культур дрожжей при жидкофазном глубинном культивировании	38
2.4.7. Культивирование маточных культур дрожжей при периодическом культивировании в ферментере	38
2.4.8. Определение качественного состава дрожжевой биомассы	39
2.5. Определение безопасности дрожжевых культур	39
2.5.1. Животные, использованные в исследовании	39
2.5.2. Исследование острой токсичности	40

2.5.3. Исследование вирулентности и диссеминации	41
2.5.4. Исследование токсигенности	41
2.6. Исследование возможности использования живых и автолизированных клеток дрожжей в качестве добавки для аквариумных кормов	42
2.7. Статистические методы исследования	43
Глава 3. СКРИНИНГ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ, СПОСОБНЫХ К НАКОПЛЕНИЮ МАКСИМАЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА БЕЛКОВОЙ БИОМАССЫ	44
3.1. Культурально-морфологические характеристики чистых культур дрожжей	44
3.2. Изучение макроморфологических признаков выделенных дрожжевых культур	47
3.2.1. Особенности роста в жидких средах	47
3.2.2. Культивирование гигантских колоний	48
3.3. Изучение микроморфологических признаков дрожжевых культур	50
3.4. Изучение специфических свойств дрожжевых культур	51
3.4.1. Изучение роста на средах с повышенным осмотическим давлением	51
3.4.2. Особенности роста при повышенных температурах	52
3.5. Изучение физиолого–биохимических признаков дрожжевых культур	53
3.5.1. Способность исследуемых дрожжевых культур к сбраживанию сахаров	53
3.5.2. Изучение аэробной ассимиляции углерода и азота	56
3.5.3. Изучение способности к росту на безвитаминой среде	58
3.5.4. Выявление способности к образованию крахмалоподобных соединений	60
3.5.5. Изучение ферментативной активности дрожжевых культур	60
3.5.6. Изучение особенностей роста дрожжевых культур при культивировании на средах с различной концентрацией источников питания	63
3.6. Изучение кинетики роста исследуемых дрожжей	72
3.6.1. Получение маточных культур дрожжей при жидкофазном глубинном культивировании	81

3.6.2. Культивирование маточных культур при периодическом культивировании в ферментере	82
3.7. Определение показателей качества дрожжевой биомассы	83
3.8. Идентификация дрожжевых культур–лидеров	85
Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ	89
4.1. Исследование острой токсичности	89
4.2. Исследование вирулентности и диссеминации	90
4.3 Исследование токсигенности	91
Глава 5. ПРИМЕНЕНИЕ БИОМАССЫ ЖИВЫХ И АВТОЛИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ В КАЧЕСТВЕ БИОДОБАВКИ К АКВАРИУМНЫМ КОРМАМ	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	101
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА	138
Приложение А. Графики калибровочных кривых для дрожжевых культур	141
Приложение Б. Исследование острой токсичности, вирулентности, диссеминации и токсигенности дрожжевых штаммов	145
Приложение В. Динамика показателей роста гуппи <i>P. reticulate</i> при кормлении биомассой живых и автолизированных клеток дрожжевых штаммов	148
Приложение Г. Справки о депонировании идентифицированных дрожжевых штаммов	155

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АКД – Автолизированные клетки дрожжей

ЕИК – Единичные изолированные колонии

ЖКД – Живые клетки дрожжей

КОЕ – Колониеобразующая единица

КЭ - Кукурузный экстракт

МУК - Методические указания

ТУ – Технические условия

ФГБНУ ВНИИСХМ – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно–исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

ФГБУ «НИИЛ» Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно–исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России

sp. – species

ХР – Характерный рост

ВВЕДЕНИЕ

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 [9, 10,52, 245].

Дрожжи применяются во многих областях науки и используются в производстве, так как являются одной из самых «технологичных» и перспективных групп микроорганизмов [14]. Они признаны безусловными лидерами среди продуцентов белковых продуктов, обогащенных витаминами группы В, нуклеиновыми кислотами, минералами, включая биологически активную форму хрома, регулирующую уровень инсулина при лечении диабета [14, 64, 77, 88, 111, 112,119, 159]. Наряду с гипоаллергенностью, дрожжевые культуры стимулируют усвоение питательных веществ, являются естественной альтернативой антимикробным препаратам, нейтрализуют токсины патогенных бактерий и даже вирусы [144, 247].

Благодаря устойчивости к инфекциям и способности к росту на огромном количестве дешевых субстратов, включая отходы сельского хозяйства и пищевой промышленности, независимо от климатических условий, дрожжевые организмы используются для получения кормовых добавок [35, 36, 48,52, 88, 106].

В настоящее время в сельском хозяйстве применяются высушенные живые клетки дрожжей, сохраняющие способность к ферментации [35,36]. Активные сухие дрожжи оказывают пробиотическое действие, взаимодействуя с аборигенной микрофлорой, стабилизируют рН желудочно-кишечного тракта и стимулируют профилактику ацидоза у жвачных животных [144].

В аквакультуре в качестве источника питательных веществ и биологически активных соединений применяются автолизаты и гидролизаты дрожжей. Пивные

дрожжи, признанные потенциальным заменителем живого корма и рыбной муки, служат пищей при выращивании нематод для последующего кормления рыбы и личинок ракообразных. Иммуностимулирующие соединения, такие как б-глюканы, нуклеиновые кислоты, а также маннанные олигосахариды усиливают иммунные реакции и устойчивость к стрептококковой инфекции у рыб [159].

Дрожжи высоко востребованы в сфере разработки микробиологических питательных сред [46]. Дрожжевые автолизаты и экстракты в качестве источников витаминов и ростовых добавок находят применение при культивировании микроорганизмов различных физиологических групп [6, 13, 46, 104,107].

Благодаря широкому распространению дрожжевых организмов в природе актуальным направлением является поиск новых перспективных штаммов для получения белковых продуктов [115, 116, 154, 173]. Вследствие этого наблюдается растущий интерес к изучению различных экологических местообитаний с целью выявления источников биоразнообразия дрожжей [62,128,149].

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 [20, 21, 41,58, 170, 215, 247]. В отличие от почвенно-ассоциированных местообитаний, исследования дрожжевых консорциумов высших грибов немногочисленны, поэтому сведений о наличии дрожжей в составе ассоциированной с макромицетами микробиоты недостаточно [256].

Степень разработанности темы. В настоящее время остро стоит вопрос изучения различных потенциальных источников белка, которые могут использоваться в качестве кормовой составляющей [213]. Дальнейшие 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, дрожжи, их автолизаты и гидролизаты могут быть использованы в качестве источника питательных веществ для получения кормов и белково-витаминных добавок и синтеза метаболитов.

По данным литературы известно, что обогащение кормов биомассой каротинсинтезирующих микроорганизмов позволяет восполнить рацион сельскохозяйственных животных витаминами, аминокислотами, микро- и макроэлементами [70,115]. 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 объектов аквакультуры к болезням, эффективности кормления и производительности гидробионтов для существенного сокращения производственных затрат [98, 122, 191].

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 [88].

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 фолиота (*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 (фолиоота *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 амилазной 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, Tr.P2 $2 \pm 0,1$ 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, AgI1 $1 \pm 0,04$ 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 группы *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 исследования.

Объектами исследований являлись:

- высшие базидиальные грибы флюиота (*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 *Candida 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.

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 «Tetra».

Личное участие автора в получении результатов. Автор самостоятельно провел информационный поиск, анализ источников литературы. Вместе с научными руководителями сформулировал цель и задачи работы, проанализировал и обобщил полученные результаты. Личное участие соискателя заключалось в проведении микробиологических, химических и экспериментальных исследований. Токсикологическая часть исследований выполнена в составе группы экспериментальной химиотерапии и токсикологии ФГБУ «Научно-исследовательского института по изучению лепры» Минздрава России под руководством старшего научного сотрудника, к.б.н. Лужновой С.А. Оформление первичной документации, статистическая обработка результатов проведены диссертантом самостоятельно.

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» (Analist 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 Пушинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2010), 15-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 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».

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 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.

Глава 1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПОИСКА БАЗЫ БЕЛКОВЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1. Распространение дрожжей – продуцентов белка

Дрожжи широко распространены почти во всех экосистемах Земного шара, включая местообитания с экстремальными условиями – морские гидротермальные источники, полярные почвы, и чрезвычайно кислые континентальные воды [150,198]. В настоящий момент эти микроорганизмы относят к внетаксономической группе одноклеточных высших грибов, утративших мицелиальное строение, размножающихся почкованием или делением, и насчитывают около 1500 видов [14].

В природе дрожжи обычно формируют консорциум между своими же видами, микромицетами, бактериями, простейшими и насекомыми посредством симбиотических, конкурентных и паразитических отношений [90, 189, 232]. Аскомицетовые и базидиомицетовые дрожжи, обсеменяющие поверхность листьев, гниющую древесину и почву, осуществляют функцию редуцентов, подавляют рост патогенных грибов в тканях растений, вырабатывают антифунгальные вещества и стимулируют развитие ассоциированных с ними насекомых [26, 27, 108, 218, 232]. Дрожжи активно используют в своем метаболизме липиды, гемицеллюлозу, ксилан и дубильные кислоты [157, 185, 198]. Такая способность к расщеплению и потреблению питательных веществ из сложных органических соединений определяет различия в составе дрожжевых видов среди микробных сообществ в почве и древесине.

Дрожжи являются одними из наиболее типичных эпифитных микроорганизмов. Они относятся к эккрисотрофам и питаются сахарами, органическими кислотами, сахарными спиртами, усваивая их из различных природных субстратов [27, 71, 252]. Интенсивное развитие дрожжевых культур зафиксировано на поверхности виноградных ягод [1,4, 5]. Большое количество

работ посвящено мониторингу видового разнообразия дрожжей в виноградниках различных стран [1, 127, 131, 139, 147, 149, 155, 177, 181, 182, 189, 199, 209, 214, 217, 230, 232, 238, 241].

Одним из специфических местообитаний дрожжей, является млечный сок гевеи бразильской *Hevea brasiliensis*. Дрожжевое сообщество загустевшего и застывшего латекса, представленное родами *Kodamea*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Cutaneo trichosporon*, стимулирует антифунгальную активность растительного сока [27]. Из литературных источников известно, что дрожжи *R. mucilaginosa* и *Candida famata* выделяют гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки фитопатогенных грибов [28, 197]. Производство цитрусовых несет значительные экономические потери при сборе урожая, причиной которых являются «зеленая» и «голубая» плесени, вызываемые *Penicillium digitatum* и *P. italicum*. Аргентинские исследователи доказали, что дрожжи *Pichia* и *Wickerhamomyces* ингибируют рост *P. digitatum* и эффективны в отношении грибковых поражений лимонов [218]. Отмечена высокая антибактериальная активность киллерного токсина *Pichia kudriavzevii* в отношении патогенной микрофлоры *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas alcaligenes* [128].

Большое количество работ посвящено исследованиям симбиотических связей между дрожжами и жуками, комарами, мухами, муравьями, пчелами, осаами, пауками и ракообразными [132, 134, 135, 151, 152, 158, 166, 172, 173, 194, 195, 211, 212, 226, 244]. По мнению исследователей, в ближайшие десятилетия изучение экологических и эволюционных связей между этими группами организмов позволит спрогнозировать появление новых культур, перспективных для различных отраслей промышленности [135].

Одним из наиболее перспективных направлений является взаимодействие дрожжей в желудочно-кишечной системе насекомых – вредителей [151, 152, 241]. К числу наиболее известных видов, ассоциированных с насекомыми, относятся

Candida, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma* [135, 168, 232]. Дрожжи обеспечивают насекомых питательными веществами, а насекомые в свою очередь переносят дрожжевые клетки в новые места обитания. В пищеварительном тракте насекомых дрожжи «запускают» цепочку химических превращений, что и объясняет, например, способность жуков утилизировать древесину [167, 198, 235]. Дрожжевые клетки, богатые витаминами В₃, В₅, белками и аминокислотами, легко усваиваются насекомыми и обеспечивают детоксикацию вредных веществ [164].

К настоящему времени накоплен обширный материал, касающийся исследований филлопланы растений, представленной в основном базидиомицетовыми дрожжами родов *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Bensingtonia*, *Cystofilobasidium*, *Leucosporidium* [27, 37, 38, 43, 62, 67, 89, 101, 123, 150]. По мнению ряда авторов, дрожжи цветковых растений и фруктов выделяют особые летучие вещества, одно из них, 2-фенил-этанол, обуславливающие их характерный сладковатый запах, которые и привлекают насекомых – опылителей [125, 132, 133, 138, 148, 184, 195, 221, 228, 235].

Имеются отдельные данные об ассоциации дрожжей с лишайниками, где последние являются источником выделения новых дрожжевых видов [44, 215]. Рядом авторов [233] показано, что дрожжевые клетки, выделенные из талломов североамериканских лишайников *Bryoria fremontii* и *B. tortuosa* принадлежат базидиомицетовым дрожжам *Cyphobasidium*. Способность дрожжей синтезировать биологически активные соединения, включая растительные гормоны, позволяет выполнять им регуляторную функцию в слоевище лишайника [236].

Другим, широко распространенным, но малоизученным субстратом для развития дрожжей, характеризующимся высоким содержанием органических соединений, являются плодовые тела высших грибов [255]. Большой интерес вызывает взаимодействие между обилием микробных сообществ, ассоциированных с макромицетами [20, 21, 41, 58, 96, 251]. Дрожжевые сообщества, представленные аскомицетовыми и базидиомицетовыми видами,

обнаруживаются, как в молодых, свежих макромицетах, так и в старых, разлагающихся плодовых телах [255]. В то же время отмечено отсутствие дрожжей в разрушающихся плодовых телах макромицетов семейства *Coprinaceae* [255]. В исследованиях Юркова А.М. показано влияние дрожжевой микрофлоры, ассоциированной с болетовыми грибами, на качество плодовых тел. Болетовые грибы подвержены заражению микопаразитами рода *Sepedonium*, с которыми активно конкурируют дрожжи, ингибируя их рост [255].

1.2. Современные представления о систематике и генетике дрожжей

В настоящее время применение анализов генных последовательностей, за которыми последовали сравнения целого генома, привело к значительному разъяснению взаимосвязей между микроорганизмами и предоставило возможность точной идентификации видов, которые необходимы для всех областей медицины, сельского хозяйства и биотехнологии.

На основании этого, обнаружение, идентификация и классификация дрожжей претерпели серьезную трансформацию за последние полтора десятилетия. Важнейшей мишенью при определении состава дрожжевых ассоциаций являются гены рибосомной РНК, в частности 18S рРНК. В связи с незначительным количеством различий в генах 18S рДНК таксономическая идентификация выражается на уровне рода или семейства, но разработка баз данных последовательностей генов из доменов D1/D2, большой субъединичной рРНК и транскрибируемые спейсеры ITS позволили значительно увеличить количество идентифицируемых известных видов дрожжей [72, 188]. Анализ участка ITS1–5.8S–ITS2 рДНК позволил Никитину Д.А. и др. [75] установить родовую и видовую принадлежность дрожжей растительных сообществ острова Нортбрук (Земля Франца-Иосифа), представленных базидиомицетовыми дрожжами: *Glaciozyma*, *Goffeauzyma*, *Leucosporidium*, *Mrakia*, *Phenoliferia* и *Rhodotorula*. В работах Качалкина А.В. и др. [183] и Абдуллабековой Д.А. и др. [1] изучен таксономический и структурный состав дрожжей виноградников

Республики Дагестан на основе анализа нуклеотидных последовательностей ITS1–5.8S–ITS2 региона и D1/D2 доменов региона 26S рДНК, что позволило выявить преобладание аскомицетовых культур.

Некодирующие регионы ITS ввиду способности к быстрой эволюции более вариабельны, чем регионы кодирующие гены рРНК, нередко выполняющие роль генетических маркеров, например ген лакказы аскомицетов [196]. Немаловажное значение имеет выбор специфических праймеров для ПЦР для нуклеотидных последовательностей эукариотических организмов [174]. На сегодня среди ПЦР праймеров, специфичных участку 18S рДНК, известны EF3, EF4, ITS1, ITS2, ITS4, ITS1F, ITS4. В работе Manter, Vivanco [200] показана высокоспецифичность праймеров ITS1F и ITS4 в отношении ДНК аскомицетов, базидиомицетов и зигомицетов. Другими исследователями [201] установлена неспособность праймера ITS4-B к амплификации участков ДНК аскомицетов и предложены ПЦР – праймеры, специфичные для дикариомицетов.

Молекулярно–генетические исследования подвергают сомнению вопрос размещения дрожжей в царство *Mycota*. Многие грибы являются диморфными, т.е. имеют дрожжеподобное состояние, а также гифальный рост, и это наряду с простой морфологией большинства дрожжей привело к предположениям о том, что дрожжи являются примитивными грибами, либо они могут быть миниатюрной версией более крупных мицелиальных таксонов. Некоторые виды дрожжей являются базидиомицетами и обладают типичными базидиями с базидиоспорами, на сегодняшний день их относят к внетаксономической группе одноклеточных высших грибов, утративших мицелиальное строение, размножающихся почкованием или делением, и насчитывают около 1500 видов [14,188].

Разделение дрожжей на базидиомицетовые и аскомицетовые формы с помощью специальных наборов признаков аффинитета стало настоящим прорывом в систематике дрожжей в 1960-е годы. Именно это открытие является

удачным примером возможного применения характеристик генома в дальнейших разработках [18].

Классификация дрожжей требует многоэтапного подхода, включая идентификацию на уровне рода посредством изучения морфологии и физиологии клеток. Так, например, особенности жизненного цикла *Saccharomyces cerevisiae* заключается в размножении почкованием с последующим образованием характерных шрамов на клеточной стенке, указывающих на возраст материнской клетки. Для дрожжевых культур характерно наличие клеток двух полов – α и α , а также бесполок клеток, генетически контролируемых аллелями *MATa* и *MAT α* [18].

Кроме того, дрожжи являются удобной моделью для наблюдения клеточных процессов, так как существует возможность поддержания клеток в гаплоидной (сфероиды) и диплоидной (эллипсоиды) форме с целью упрощения генетического анализа. Современные методы пополняются использованием различных микрочипов и белковых сетей, делая доступным полное исследование дрожжевого генома, который в свою очередь включает ДНК, РНК и даже вирусные частицы. Такое разнообразие подходов во многом сделало доступным, например исследование механизмов регуляции синтеза и физиологической роли гетерохроматина в дрожжевых клетках [18].

Таким образом, современные подходы позволяют систематизировать вновь открываемые виды, уточняя их систематическую принадлежность, основываясь на генетически детерминированных таксономических характеристиках.

1.3. Перспективы использования дрожжей и дрожжевых продуктов в современной биотехнологии

Исследование дрожжей, которые являются одними из главных промышленных микроорганизмов, широко ведутся в различных странах мира. В дополнение к их успешному использованию в производстве пищевых продуктов, напитков и фармацевтических препаратов, дрожжи играют важную роль в

качестве модельных эукариотических клеток в биологических и медицинских исследованиях [14, 130, 178].

Дрожжи издавна используются в многочисленных биотехнологических процессах [176]. Археологами установлено, что еще жители Месопотамии, Китая, Египта, Индии, Греции и Рима были знакомы с процессами приготовления алкогольных напитков, выпечки хлеба и даже получения уксуса [14, 94, 114, 120, 178]. Чистые культуры *Saccharomyces cerevisia* и других дрожжей были выделены в 1888 году Эмилем Кристианом Хансенем на пивоваренном заводе Carlsberg в Копенгагене, а его современники, Эмиль Фишер и Эдуард Бюхнер, начали детальное исследование биохимии и метаболизма дрожжей [178].

Значительная часть населения земного шара страдает от недоедания, вследствие бедности и недостаточного распределения продовольствия. Это заставляет человечество искать альтернативные источники белка. В последние годы акцент сместился к использованию микроорганизмов в обогащении продуктов питания. Приоритетным направлением в биотехнологии считается использование дрожжей с целью получения микробного белка [14, 15, 46, 88].

Стремительный рост мирового населения повлек за собой увеличение потребности не только в продовольствии, но и в топливе и энергетике. Истощение запасов нефти, проблема загрязнения, глобальное потепление, политическая нестабильность и разногласия привели к необходимости создания экологически чистых и возобновляемых источников энергии [22, 72, 92, 94, 108]. Использование ископаемых видов топлива приводит к выбросам углекислого газа, что способствует повышению температуры поверхности Земли и влечет плачевные последствия для человечества [153, 186].

Жидкое биотопливо является многообещающей альтернативой ископаемым видам топлива, которое позволит не учитывать изменение климата, расходы на оборудование, поставку и другие факторы [238].

В настоящее время основным источником биотоплива является биоэтанол, получаемый из сахара, или биодизель, производимый из липидов пальмового

масла, рапса или сои [225]. Биоэтанол представляет собой один из наиболее перспективных и экологически чистых видов биотоплива. Не смотря на то, что в настоящее время почти весь топливный этанол генерируется из источников углерода, все большее внимание привлекает целлюлозосодержащая биомасса [256].

Переработка растительного сырья с помощью микроорганизмов представляет собой рациональный подход для производства транспортного топлива [63, 142, 143, 179, 190, 253]. Липиды микробных клеток обладают большим потенциалом в качестве ресурса биотоплива [105].

В последние годы разработаны технологии экстракций липидов из дрожжевых клеток, основанные на использовании растворителей под разным давлением [156, 208]. Дрожжи, в частности *S. cerevisiae*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Arxula adenivorans*, *Candida melibiosica*, *R. glutinis*, *Lipomyces starkeyi*, *Metschnikowia pulcherrima* являются «рабочими лошадками» в биотопливной отрасли, так как способны к ферментации сахаросодержащих субстратов, что позволяет использовать их в качестве источников этанола и других видов топлива [2, 23, 24, 76, 87, 140, 141, 174, 175, 176, 219, 225, 238, 245, 252, 253, 254, 257]. Олиготрофные дрожжи *Yarrowia lipolytica* применяются также для получения лимонной кислоты, протеаз и липаз [61, 137, 154, 183, 228, 238]. В Северной Европе микроводоросли уже вытеснены дрожжами при производстве биотоплива [225].

Среди часто используемых в биотехнологических разработках микроорганизмов, дрожжи оказались особенно подходящими для синтеза разнообразных вторичных метаболитов для косметологии и фармацевтики [230]. Коммерческих масштабов достигли технологии получения аминокислот, включая триптофан, тирозин, лизин, ликопин, метионин, фенилаланин и пролин с использованием *S. cerevisiae*, *R. glutinis*, *C. utilis*, *Y. lipolytica* [17, 53, 178, 193, 203, 223, 226, 228, 242]. Накоплены данные о синтезе интерферона дрожжами *P. pastoris* [113]. Дрожжи являются продуцентами опиоидов [160, 161, 163, 192] и

витаминов группы В, Е, Н, F, К, аскорбиновой кислоты [49, 70, 80, 81, 88, 92]. К высокопродуктивным источникам витамина D относят *S. cerevisiae* и *C. albicans* [210].

С каждым годом все больше внимания уделяется поиску потенциальных источников каротиноидов [39, 54, 116]. Каротиноиды представляют собой жирорастворимые пигменты терпеноидной природы, используемые в различных отраслях промышленности и косметологии. Они не только являются натуральными красителями, предшественниками витамина А, но и обладают антиоксидантными свойствами, чем привлекают внимание ученых, так как относятся к числу биоактивных фитохимических соединений, которые снижают риск появления рака, сердечно-сосудистых заболеваний, макулярной дегенерации и катаракты [202].

Каротиноиды широко распространены в высших растениях, бактериях, плесневых грибах, водорослях и дрожжах [126, 204]. Микробный синтез каротиноидов может быть лучшим альтернативным вариантом при использовании недорогого сырья и отходов агропромышленного комплекса, обогащенного углеродом и азотом и другими необходимыми микроэлементами для метаболизма, что в свою очередь уменьшает производственные расходы и загрязнение окружающей среды [202].

Отмечается возможность дрожжей продуцировать широкий спектр каротиноидных пигментов, среди которых наиболее распространенные β -, γ -каротины, торулин, торулародин и ликопин [54, 247]. При этом наблюдается большой выход биомассы в процессе брожения при культивировании на дешевом сырье. Эта группа эукариотических микроорганизмов обладает высоким уровнем микробиологического синтеза каротиноидов [25]. Среди дрожжей *Rhodotorula spp.* считаются основными каротиногенными видами, среди пигментов которых преобладают β -каротин, торулин, каротиноидная кислота [204]. Исследованиями ряда авторов показано влияние внешних факторов (освещение и др.) и добавления пероксида водорода, растительного масла, органических кислот и цистеина на

синтез каротиноидов у рода *Rhodotorula* [25, 115, 116]. Каротиноидные пигменты *Phaffia rhodozyma* широко используются в косметической, пищевой, фармацевтической промышленности и аквакультуре [207].

По данным литературы, обогащение кормов биомассой каротинсинтезирующих микроорганизмов позволяет восполнить рацион сельскохозяйственных животных витаминами, аминокислотами, микро- и макроэлементами [70, 115].

Растущий интерес наблюдается к β -глюканам дрожжей. Манукян Г.А. и Красноштанова А.А. [66] изучали условия предварительной обработки дрожжевой биомассы *S. cerevisiae* и *Candida maltosa* для последующего извлечения β -глюкана. Виноделие имеет богатую тысячелетнюю историю [205]. Изучение данного вопроса включает в себя разнообразные сельскохозяйственные, механические, химические и микробиологических процессы для улучшения микроклимата почвы виноградников. Еще в Древнем Китае готовили ферментированный напиток из смеси риса, меда и фруктов [205]. Брожение виноградного сусла вызвано активностью разнообразных микроорганизмов присутствующих на поверхности виноградных ягод, среди которых идентифицированы дрожжевые культуры *Hanseniaspora (Kloeckera)*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Kluveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces* and *Dekkera* [180, 205]. Разнообразие и состав дрожжевого населения вносят существенный вклад во вкусовые характеристики вина. Винный букет является одним из важнейших параметров качества напитка, причем немаловажную роль принимают в этом летучие ароматические вещества дрожжей [239].

S. cerevisiae - один из основных видов дрожжей, отвечающих за брожение и органолептические свойства вин. Значительный вклад в процессах брожения виноградного сока играют также рода *Metschnikowia*, *Candida*, *Torulasporea*, *Lachancea/Kluveromyces* и *Zygosaccharomyces* [146]. Метаболиты дрожжей способствуют изменению фенольного состава и особенно цвета вин в процессе

ферментации [162, 206]. Помимо этого, белки дрожжей способствуют формированию и устойчивости пены в газированных напитках [129]. Кроме того, использование селекционных рас дрожжей в виноделии представляет собой достаточно простой и дешевый способ мониторинга динамики дрожжевой популяции.

Несмотря на большое количество винных штаммов, информация о детальной геномной структуре дрожжей, используемых в виноделии, все еще ограничена [124, 136]. Изменение климата приводит к увеличению срока созревания винограда и увеличению содержания этанола, что отрицательно сказывается на вкусовых качествах вина, здоровье человека. На сегодняшний момент актуальны стратегии уменьшения содержания этанола без ущерба для вкусовых качеств вина [165, 167]. В работах французских ученых [240] показана возможность «перестройки» ферментативной системы нескольких штаммов сахаромицетов с целью уменьшения брожения и, как следствие, снижение количества этанола.

Основным фактором успешной исследовательской или производственной работы микробиологов являются питательные среды, которые насчитывают более 5000 прописей с учетом модификаций. В последние десятилетия конструирование питательных сред получило дальнейшее развитие в связи с увеличением разнообразных стратегий применения микробиологических технологий.

В производстве питательных основ и сред для культивирования микроорганизмов актуальна проблема замены дорогостоящего мясного сырья на альтернативное, экономически выгодное, стандартное и доступное растительное сырье. Характеристика физико-химических свойств питательных основ для приготовления микробиологических сред имеет существенное значение для оценки их качества и стандартизации [57]. Оптимальный состав питательной среды обеспечивает жизнеспособность посевного материала, питательные компоненты стимулируют жизнедеятельность, накопление, выделение и сохранение микроорганизмов, влияют на синтез целевого продукта. Кроме того,

данные макро- и микроэлементы должны входить в среды в доступном для исследуемых культур виде [107].

До недавнего времени в производстве питательных сред в России использовали панкреатический гидролизат каспийской кильки, ферментативных и кислотных гидролизатов казеина, пептона ферментативного и панкреатического гидролизата кормовых дрожжей. В 90-х годах XX века начался выпуск ферментативного гидролизата рыбной муки и сред на его основе. С прекращением промышленного производства кормовых дрожжей приостановилось и изготовление соответствующего гидролизата.

Несмотря на универсальность и преимущества методов получения мясных, рыбных и казеиновых гидролизатов, возникла необходимость использования альтернативных источников сырья. Обязательное наличие огромного выборарастительных и дрожжевых гидролизатов (автолизатов) отличается в перечне продуктов всех крупных компаний – изготовителей питательных сред по всему миру. Таким образом, перспективным направлением в области разработки микробиологических питательных сред остается поиск сырьевой базы для получения белковых гидролизатов, не уступающих мясным по биологическим свойствам [46]. Подобная необходимость связана с ограничением в ряде стран использования компонентов животного происхождения при производстве иммунобиологических препаратов и вакцин по причине заражения крупного рогатого скота губчатой энцефалопатией, а также с тем, что в продуктах животноводства могут содержаться антибиотики, нитраты, химикаты, что отрицательно влияет на культивирование микроорганизмов [104].

Лабильность и регулируемость биосинтетических процессов, протекающих в дрожжевой клетке, позволяет целенаправленно контролировать жизнедеятельность дрожжевой культуры, изменять ее рост, развитие и обмен веществ, тем самым управляя ходом ферментационного процесса [83].

Постоянство компонентов дрожжевой клетки способствует возможности применения в питательных средах дрожжевых автолизатов, помимо этого

исключает последствия факторов-антибиотиков, гормонов и прионов, которые часто обнаруживаются в мясном сырье [13].

Экстракты и гидролизаты пивных, пекарских и кормовых дрожжей являются источниками витаминов группы В и азотистых оснований, стимулирующие ростовые качества микробиологических сред. Кроме того, культивирование на дрожжевых средах обеспечивает высокий выход микробной массы, а дешевизна дрожжевых сред позволяет снижать себестоимость медицинских иммунобиологических препаратов.

Аленкина Т.В. с соавторами подтвердили эффективность дрожжевого автолизата в качестве белковой основы для культивирования чумного бактериофага [6]. Chen и соавторы изучили синтез янтарной кислоты культурой *Actinobacillus succinogenes* при росте на средах содержащих гидролизат пивных дрожжей в качестве источника углерода [145].

Таким образом, благодаря высокому содержанию белка, витаминов группы В и минералов, дрожжи, их автолизаты и гидролизаты могут быть использованы в качестве источника питательных веществ для роста требовательных микроорганизмов и синтеза метаболитов. Следовательно, существует экономический интерес к использованию дрожжевых экстрактов в микробиологических средах.

1.4. Дрожжи как кормовой ресурс для использования в животноводстве и аквакультуре

Животноводческая отрасль сельского хозяйства подвержена использованию низкокачественных кормов с дефицитом белка, что негативно сказывается на развитии и продуктивности скота, а также приводит к увеличению стоимости мясных и молочных продуктов [29,32, 60, 100]. Получение белковых кормовых продуктов микробного происхождения на сегодняшний день является важнейшим приоритетным направлением в животноводческой отрасли. Благодаря быстрому росту, устойчивости к инфекциям и способности развиваться на огромном

количестве дешевых субстратов независимо от климатических условий, включая отходы сельского хозяйства и пищевой промышленности, дрожжи популярны в качестве богатых источников белка, минералов, витаминов группы В и других питательных веществ для человека и животных [14, 16, 35, 36, 48, 88].

Кормовые дрожжи – полноценная пищевая добавка, белковый компонент которой усваивается в организме животных на 95%, и, следовательно, оказывает положительное влияние на показатели роста и иммунную систему [45, 51, 97, 107]. Дрожжи не только зарекомендовали себя мощным стимулятором роста, который обогащен необходимыми аминокислотами и микроэлементами незаменимыми в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы, но и в качестве сорбента микотоксинов [7, 50, 99, 117].

Пробиотические добавки на основе дрожжей завоевывают все большую популярность в кормлении жвачных. Среди представителей дрожжевых культур, обладающих пробиотическими свойствами можно выделить *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *R. glutinis*, *Rhodospirium toruloidis*, *S. cerevisiae* [59]. В настоящее время применяют высушенные живые клетки дрожжей из-за их способности сохранения к ферментации [35, 36]. Активные сухие дрожжи оказывают пробиотическое действие, взаимодействуя с аборигенной микрофлорой, блокируют токсины клостридий, стабилизируют рН рубца жвачных животных и стимулируют профилактику ацидоза [56, 79, 86, 144].

В работе Козловского В.Ю. и Логиновой З.В. [60] отмечена эффективность дрожжевых препаратов "Biotal SC" с обогащенными селеном и цинком клетками штамма *S. cerevisiae* I-1077, позволяющими снижать возможную токсичность кормов низкого качества и стимулировать переваривание клетчатки у коров.

Полянской И.С. и др. [85] разработана функциональная кормовая добавка (ФКП «Вологодский»), в составе которой содержатся мезофильные неферментирующие и лактатсбраживающие расы дрожжей, позволяющая стимулировать максимальный уровень надоя у опытных коров. Действие кормовых добавок «Зообикор» и «Рекицен», компонентами которых являются

пшеничные, ржаные отруби и винные дрожжи *S. cerevisiae*, направлено на общее укрепление организма, повышение надоев и количества жира и белка в молоке коров [78].

Логвинова Т.И. и др. [60] использовали сахарный сироп в составе питательной среды для культивирования дрожжей рода *Candida*, изолированных из химуса гибридных животных (архар и овца романовской породы) с целью получения кормового белка. При внесении белковой добавки в рацион эстонских перепелов у птиц опытных групп зарегистрированы более высокие значения фагоцитарной активности лейкоцитов крови (54,20% - 42,40%) в сравнении с контрольными группами (41,28%). Кроме этого, в опыте результаты показателей общего белка сыворотки крови так же превосходили контрольные значения (41,36±1,80 г/л, 52,53±0,78 г/л и 41,36±1,80 г/л соответственно). Ряд авторов показал возможность использования биомассы каротиногенных дрожжей *Phaffia rhodozuma* для коррекции экспериментального дисбактериоза у японских перепелов [34]. Поиск потенциальных микробных пробиотиков позволяет сократить использование антибиотиков, что обеспечивает безопасность продукции [78, 79].

В рыбной отрасли 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 существует острая необходимость повышения устойчивости рыб и гидробионтов к болезням, эффективности кормления и повышения производительности воспроизводства гидробионтов для существенного сокращения производственных затрат [98, 121, 191].

Хорошо известно, что собственная микрофлора рыб способствует процессам усвоения питательных веществ, развитию иммунной системы и функционирования организма в целом [3]. Дрожжи обнаружены в составе микробиоты как искусственно выращенных рыб, так и у диких видов. Среди культур обсеменяющих жабры, чешую, рот и кишечник изолированы рода

Candida, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* и *Trichosporon*. Количество и разнообразие дрожжей в воде рыбоводных прудов варьирует в зависимости от сезона и температурных режимов [103, 213].

Растущая интенсификация и коммерциализация аквакультурного производства влечет нерегулируемое применение гормонов, антибиотиков и стимуляторов роста, что чревато физиологическим дисбалансом, отравлениями и гибелью. Для предотвращения этих последствий и связанных с ними экономическими потерями началось активное внедрение концепции «функциональных добавок» в качестве пробиотиков, фитобиотиков и различных пищевых дополнений путем добавления биомассы микроорганизмов к кормовым рационам [19, 121, 122, 191].

Таким образом, вопрос изучения различных потенциальных источников белка, которые могут использоваться в качестве кормовой составляющей, в настоящее время достаточно актуален. Масличные культуры, в частности соевые и зерновые, часто рассматриваются в качестве альтернативных источников рыбного корма. Соевые бобы богаты белком и представляют собой наиболее часто используемый источник растительного белка на мировом рынке. Однако включение некоторых растительных белков в диету аквакультурантов могут вызывать кишечные расстройства, включая патоморфологические изменения в кишечном эпителии [213].

Клетки дрожжей богаты необходимыми для гидробионтов биоактивными компонентами, включая глюканы и маннаны и незначительное количество нуклеотидов, а в функциональных добавках используются в качестве ростовых факторов и иммуностимуляторов [40]. Полимеры глюкозы β -глюканы являются основными структурными компонентами клеточной стенки дрожжей и относятся к группе физиологически активных соединений, называемых модификаторами биологических реакций иммунного ответа и выживаемости у рыб [213].

Некоторые штаммы дрожжей синтезируют молекулы полиаминов, участвующих в клеточном метаболизме, а именно в синтезе ДНК, РНК и белков [249].

Недавние исследования показали благотворный пробиотический эффект *S. utilis* при кормлении радужной форели [84, 220]. Имеются сведения о том, что пекарские дрожжи *S. cerevisiae* улучшают показатели роста, производительности и устойчивости к аэромонадным инфекциям нильской тилапии и японского окуня [118, 220]. У лососевых, карпа и белуги нуклеиновые кислоты дрожжевых клеток усиливают иммунные реакции [33, 220]. Протекторные функции дрожжей благотворно влияют на морфологию клеток желудочно-кишечного тракта, стимулируют процессы заживления слизистых, блокируют воспалительные реакции и нормализуют желудочно-кишечную микрофлору. Защита от бактериальных инфекций обусловлена присутствием маннанных олигосахаридов в стенке дрожжевых клеток, которые предотвращают рост патогенных микроорганизмов путем увеличения секреции слизистой пищеварительного тракта. Диета, обогащенная дрожжевыми нуклеотидами, обеспечивает повышенную устойчивость к вирусным, бактериальным и паразитарным инфекциям. В то же время влияние дрожжей на иммунитет и выживаемость зависит от концентрации клеток, длительности кормления, возраста, массы и вида рыб [220].

Дальнейшие разработки в производстве функциональных добавок на основе дрожжевого белка могут стать значительным вкладом в обеспечение устойчивости и экономической жизнеспособности будущего аквакультуры.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертация выполнена в научно–исследовательской лаборатории микробиологического мониторинга кафедры «Прикладная биология и микробиология» ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет» и в лабораторно–экспериментальном отделе ФГБУ «Научно–исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России.

Эксперименты по определению титра клеток и наращиванию биомассы выбранных дрожжевых культур в ферментере проводились на базе ФГБНУ ВНИИСХМ (г. Пушкин). В качестве контроля использовали коллекционный промышленный штамм *S. tropicalis* СК-4-1 (ФГБНУ ВНИИСХМ), используемый как продуцент кормового белка на средах содержащих отходы промышленного производства (торф, отруби, меласса, барда).

Исследования по определению безопасности идентифицированных дрожжевых штаммов проводили на базе ФГБУ НИИЛ Минздрава России (г. Астрахань).

2.1. Объекты исследования

Объектами исследований являлись:

- высшие базидиальные грибы флюиота (*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 *S. 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;

- 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.

2.2. Выделение чистых культур дрожжей

Для выделения чистых культур дрожжей использовали метод глубинного посева суспензии смывов с поверхности высших грибов на агаризованную среду Сабуро с серией последовательных пересевов [12]. Чистые культуры дрожжевых микроорганизмов выделяли чашечным методом. Чистоту выросших культур оценивали визуально и посредством микроскопирования препаратов окрашенных фиксированных клеток [91].

При изучении культуральных признаков колоний дрожжей учитывали форму колонии, её профиль, край, поверхность, размеры, оптические свойства, цвет, структуру и консистенцию [91].

Изучение морфологических признаков проводили при помощи микроскопирования фиксированных окрашенных препаратов из выросших на плотной питательной среде колоний [91].

Предварительную идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам, руководствуясь определителями Кудрявцева В.И. «Систематика дрожжей» и Kurtzman et al. «The yeasts: a taxonomic study» [55, 188].

2.3 Молекулярно–генетический и биоинформатический методы идентификации дрожжевых культур

При генетической идентификации ДНК суточных чистых культур исследуемых дрожжей выделяли с помощью стандартного метода (лизис с

использованием СТАВ и SDS с последующей фенол-хлороформной экстракцией). Фрагмент ITS1-ITS4 региона амплифицировали с использованием праймеров: прямого TCCGTAGGTGAACCTGCGG и обратного TCCTCCGCTTATTGATATGC. Соответствующие фрагменты ITS1-ITS4 региона после очистки из геля были секвенированы с использованием праймеров, применяющихся для амплификации, согласно протоколу фирмы “Applied Bioscience” (США) для секвенатора Applied Bioscience XL3500 с использованием коммерческого набора для секвенаторов согласно рекомендациям производителя. Видовую принадлежность дрожжей определяли с помощью программ BLAST GenBank [258].

2.4. Исследование качественных и количественных характеристик дрожжевых культур

2.4. 1 Изучение макро - и микроморфологических признаков

С целью изучения роста дрожжевых культур в жидких средах использовали бульон Сабуро. Посевы инкубировали в течение 4-х недель при температуре 30 °С, отмечали помутнение среды, образование осадка, кольца, наличие и характер пленки [12].

Гигантские колонии высевали на чашки с морфологическим агаром уколом иглы с биомассой микроорганизмов и культивировали 30 суток при температуре 30 °С [65].

С целью изучения формирования истинного и псевдомицелия дрожжевые культуры штрихом высевали на чашки с картофельно-глюкозным агаром, затем накладывали покровное стекло. Для замедления высыхания среды боковую поверхность чашки заклеивали скотчем. Микроскопирование выросшей культуры проводили непосредственно на чашке [65].

Для выявления баллистоспор тестируемые культуры высевали на чашки Петри с модифицированной средой Городковой. В каждую чашку помещали

кусочек стерильной ваты, смоченный стерильной водой. Чашки инкубировали в перевернутом состоянии 7-14 суток при температуре 18-20 °С до прорастания отстреленных баллистоспор на крышке чашки Петри [65].

Выявление аскообразования проводили путем глубинного посева суспензии дрожжей на чашки Петри с модифицированной средой Городковой и последующим культивированием в течение 7 суток при комнатной температуре [65].

2.4.2 Изучение специфических признаков

Для изучения осмотолерантности дрожжевые культуры высевали в пробирки со средой, содержащей 50% и 60% глюкозы, затем инкубировали 7 суток при температуре 21-25 °С [65].

Для выявления роста при повышенных температурах исследуемые изоляты высевали в пробирки с глюкозно-пептонной средой и инкубировали в течение 7 суток при температуре 20 °С, 25 °С, 30 °С, 37 °С, 40 °С [65].

2.4.3. Изучение физиолого-биохимических признаков

Для родовой дифференциации дрожжей использовали различные физиологические признаки, среди которых наиболее важными являются способность к анаэробному сбраживанию сахаров и аэробной ассимиляции различных источников углерода и азота, способность исследуемых культур к уреазной активности и синтезу крахмалоподобных соединений. При сбраживании сахаров использовали глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, раффинозу, отмечали образование газа, осадка и помутнения [65].

Для ассимиляции источников углерода использовали специальную азотную (для тестов на ассимиляцию источников углерода) или углеродную (для источников азота) основу стандартного состава (среда «Difco») [65].

Для выявления ретинола использовали реакцию Друммонда, наличие тиамин и рибофлавина в культуральной жидкости определяли с помощью качественных реакций [42].

Присутствие крахмалоподобных соединений определяли высевом на специальную среду для проверки образования крахмалоподобных соединений (г/л): глюкоза -10; $(\text{NaH}_4)_2\text{SO}_4$ -1; KH_2PO_4 -1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5; агар -25. Перед разливом на чашки рН довели до 4,0 - 4,5 с помощью разбавленной соляной кислоты. Культуры высевали штрихом и культивировали в течение 7 суток. После этого поверхность агара заливали раствором Люголя и выдерживали при дневном освещении 2 часа. Результаты анализировали, поставив чашки на светлый фон [11].

Для выявления уреазной активности использовали среду Христенсена с добавлением 20 % раствора мочевины [65].

Амилолитическую активность определяли с помощью агаризированной среды с водорастворимым крахмалом. Посевы культивировали 5 суток, затем заливали поверхность среды раствором Люголя. Зону гидролиза крахмала измеряли в миллиметрах от края штриха до границы светлой зоны [12].

Для выявления протеолиза казеина тестируемые дрожжевые культуры высевали штрихом по диаметру чашки с молочной средой и культивировали в течение 5 суток. Гидролиз казеина наблюдали по зоне осветления среды вокруг выросших по штрих у колоний дрожжей и измеряли от края штриха до границы светлой зоны [12].

Липолитическую активность дрожжей исследовали с помощью агаризированной среды Селибера с добавлением реактива бромтимолового синего, на которую штрихом высевали культуры дрожжей и термостатировали при +30 °С в течение суток [102]. О присутствие липазы судили по образованию вокруг колоний дрожжей прозрачных зон гидролиза жирных кислот [12].

2.4.4 Изучение кинетики роста исследуемых дрожжей

Для изучения кинетики роста культивирование дрожжевых культур осуществляли высевом на ряд питательных сред (г/л):

1) специфическая среда с глюкозой: глюкоза – 15,0; пептон – 5,0; K_2HPO_4 – 3,0; MgSO_4 – 1,0; H_2O – 1000;

2) питательная среда с мелассой: меласса-20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,5; K_2HPO_4 – 0,85; K_2HPO_4 – 0,15; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,15; NaCl – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; H_2O – 1000, pH = 5,0;

3) стерильная пивная барда. Барду измельчали в фарфоровой ступке, отвешивали 70 г, заливали ее 1 л водопроводной воды, оставляли на сутки, после чего тщательно перемешивали и оставляли еще на несколько часов. Затем жидкость фильтровали до прозрачного раствора, доводили pH до 4,3-4,8 и на 1 л раствора добавляли 4,5 г сульфата аммония.

Среды автоклавировали при 120° в течение 20 мин, в стерильных условиях разливали в пенициллиновые флаконы по 10 мл, в которые вносили по 1мл суспензии клеток дрожжей [74]. Посевы культивировали при 25°C в течение 96 часов. Каждые 6 часов из флаконов отбирали пробы для испытаний. Для построения калибровочной кривой готовили 5-6 суспензий дрожжей разной концентрации. Оптическую плотность каждой суспензии измеряли на спектрофотометре [74].

Концентрацию клеток дрожжей в культуральной среде определяли нефелометрически [74].

2.4.5 Изучение особенностей роста дрожжевых культур при культивировании на средах с различной концентрацией источников питания

В эксперименте использовали следующие среды:

1) меласные (0,5%, 1%, 1,5% и 2%);

2) меласная (0,5%, 1%, 1,5% и 2%)+0,5% кукурузного экстракта.

Среды разливали в пробирки, в которые вносили по 1 мл суспензии дрожжевых клеток и инкубировали при $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 4-х недель. При анализе посевов отмечали помутнение среды, образование осадка, взвеси, наличие и характер пленки [12].

2.4.6 Получение маточных культур дрожжей при жидкофазном глубинном культивировании

Для получения маточных культур дрожжей 40 мл питательной среды (меласса - 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,5г; KH_2PO_4 – 0,85г; K_2HPO_4 – 0,15г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,15г; NaCl – 0,1г; $\text{ClCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,1г; H_2O – 1000, $\text{pH} = 5,0$) засеивали 1 мл суспензии дрожжевых клеток с исходным титром $4,9 \times 10^5$ кл/мл и культивировали на качалке в течение 24 ч при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Титр дрожжевых клеток определяли методом прямого подсчета в камере Горяева [73]. Удельную скорость роста (K_p) определяли по формуле [82]:

$$K_p = 2,303(\lg a_2 - \lg a_1) / (t_2 - t_1), \text{ где}$$

a_1 – количество клеток в начале опыта;

a_2 – количество клеток в конце промежутка времени;

$(t_2 - t_1)$ – промежуток времени от начала опыта, ч;

2,303 – коэффициент перевода натуральных логарифмов в десятичные.

2.4.7 Культивирование маточных культур дрожжей при периодическом культивировании в ферментере

Биомассу маточных культур дрожжей в количестве $4,0 \times 10^6$ кл/мл для *Candida tropicalis* СК-4-1, 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 наращивали в газовой-вихревой биореакторе «Торнадо» («Саяны», Россия) объемом 10 л. Дрожжевые культуры вносили в биореактор с питательной средой того же состава, что и для маточных культур и культивировали в течение суток при постоянной температуре (26°C – 28°C), аэрации ($15 - 25\text{ м}^3/\text{ч}$ на 1 м^3 среды),

pH=5,0. Периодически отбирали пробы культуральной жидкости для подсчета клеток в камере Горяева. Удельную скорость роста (K_p) определяли по формуле [82]:

$$K_p = 2,303(\lg a_2 - \lg a_1) / (t_2 - t_1), \text{ где}$$

a_1 – количество клеток в начале опыта;

a_2 – количество клеток в конце промежутка времени;

$(t_2 - t_1)$ – промежуток времени от начала опыта, ч;

2,303 – коэффициент перевода натуральных логарифмов в десятичные.

Затем культуральную жидкость центрифугировали 15-20 минут при 5000 - 10000 об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, осадок промывали дистиллированной водой и снова центрифугировали при тех же условиях. Далее осадок помещали в фарфоровую чашку с целью высушивания его в сухожаровом шкафу [73].

2.4.8 Определение качественного состава дрожжевой биомассы

Качественный состав дрожжевой биомассы (массовая доля влаги, массовая доля сырого протеина, содержание золы) определяли в соответствии с ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия» [30].

2.5 Определение безопасности дрожжевых культур

2.5.1 Животные, использованные в исследовании

Эксперименты по исследованию острой токсичности, вирулентности, диссиминации и токсигенности тестируемых микроорганизмов выполнены на 428 мышах-самцах линии Balb/c [68]. После перевода из питомника вивария животных распределяли по группам, которые формировались методом случайной выборки с учётом массы тела в качестве ведущего показателя. Вес мышей составлял 18-22 г., разброс по исходной массе не превышал 10%. Животные в новых условиях до начала эксперимента проходили адаптацию не менее 14 дней.

Во время эксперимента животных содержали в контролируемых условиях: при температуре окружающего воздуха 22 ± 2 °С, относительной влажности $65 \pm 5\%$. Для размещения применяли макролоновые клетки, оборудованные стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. В качестве подстилочного материала использовали древесные опилки. Животных содержали на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к воде. Подстил, клетки и аксессуары, поилки меняли не реже одного раза в неделю.

Содержание животных и проведение экспериментов соответствовало Принципам надлежащей лабораторной практики (Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044 -2014) [31].

2.5.2 Исследование острой токсичности

В эксперименте использовали 140 мышей Balb/c (самцы). Животных распределяли по группам по 10 особей в каждой. Взвесь трехсуточных дрожжевых культур в физиологическом растворе, убивали нагреванием в течение 1 часа при $t = 60$ °С, вводили согласно дизайну исследования (табл.1).

Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности составляла 14 суток. В первый день после введения суспензии животные находились под непрерывным наблюдением.

Таблица 1 – Дизайн исследования

Группы	Введение <i>per os</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

2.5.3 Исследование вирулентности и диссеминации

Для исследования вирулентности и диссеминации использовали суспензию трехсуточных дрожжевых культур, смытых с агаризированной среды Сабуро физиологическим раствором. В эксперименте использовали 70 мышей Balb/c, по 10 особей в каждой группе. Контрольные мыши получали однократно внутрибрюшинно 1 мл физиологического раствора, животные опытных групп однократно внутрибрюшинно суспензию соответствующих дрожжей в дозе 1×10^7 КОЕ/мышь (1,0 мл). Продолжительность наблюдения за животными составила 30 суток. Для определения диссеминационного эффекта на 7-е, 14-е и 28-е сутки эксперимента проводили забой двух мышей из каждой группы. Легкие, сердце, почки, селезенку, печень и кровь сеяли на агаризированную среду Сабуро методом отпечатков, выросшие колонии окрашивали по Граму и микроскопировали под световым микроскопом Olympus CX41 (OlympusCorp., Япония).

2.5.4 Исследование токсигенности

Токсигенность исследуемых штаммов определяли путем внутрибрюшинного введения мышам фильтратов экзотоксина, отфильтрованного через бактериальные фильтры 3-х (объем фильтрата 1,0 мл и 1,7 мл) и 7-и – суточных (объем фильтрата 0,8 мл и 1,5 мл) бульонных культур исследуемых дрожжей. В эксперименте использовали 224 особи, распределяли на группы по 8 мышей в каждой. Контролем служили группа животных, получавших в эквивалентах стерильный бульон Сабуро. После введения экзотоксина дрожжевых культур наблюдение за животными продолжали 30 суток. Отмечали особенности внешнего вида, двигательной активности мышей, реакцию на экспериментатора, следили за потреблением воды и корма.

2.6 Исследование возможности использования живых и автолизированных клеток дрожжевых штаммов в качестве добавки для аквариумных кормов

С целью получения биомассы дрожжевые штаммы культивировали глубинным методом в бульоне Сабуро. Для приготовления автолизата дрожжевую суспензию инкубировали в течение двух суток в термостате при температуре 45–50 °С, затем разводили теплой водопроводной водой и стерилизовали при 120 °С 30 мин. После предварительного отстаивания осадок отделяли центрифугированием и высушивали в сушильном шкафу при 80 °С [73].

Полученную сухую биомассу «живых» и автолизированных дрожжей перемешивали с контрольными кормами в соотношении 25%, 50% и 75% к стандартному корму и полученную взвесь распределяли в аквариумной воде.

В эксперименте использовали 84 трехнедельных малька гуппи (*P. reticulata*) средней массой 15,98 - 16,03 мг и длиной 10,93 - 11,12 мм. Аквариумы заполняли предварительно отстоянной водой (t=25-27 °С, естественное освещение), для обогащения кислородом использовали аэраторы. Замену воды осуществляли по необходимости [224]. Рыбок рассаживали в отдельные для каждой группы 20-литровые аквариумы по 6 мальков в каждый, тем самым сформировав 2 контрольные группы (К1 и К2) и 12 опытных групп для исследования каждой из шести культур. Каждая группа получала определенную диету (табл.2).

Таблица 2 – Дизайн эксперимента

Группы	Корма	Группы	Корма
Контроль	«Tetra», Дафния	Контроль	«Tetra», Дафния
1Ж	Tetra + 25% ЖКД	1А	Tetra + 25% АКД
2Ж	Tetra + 50% ЖКД	2А	Tetra + 50% АКД
3Ж	Tetra + 75% ЖКД	3А	Tetra + 75% АКД
4Ж	Дафния + 25% ЖКД	4А	Дафния + 25% АКД
5Ж	Дафния + 50% ЖКД	5А	Дафния + 50% АКД
6Ж	Дафния + 75% ЖКД	6А	Дафния + 75% АКД

Примечание: ЖКД – живые клетки дрожжей, АКД – автолизированные клетки дрожжей. Состав корма «Tetra»: экстракты растительного белка, зерновые культуры, дрожжи, моллюски и раки, масла и жиры, водоросли, сахар, минеральные вещества, пищевая ценность - сырой белок - 45%, сырые масла и жиры - 8%, сырая клетчатка - 4,0%, влага - 8%, добавки - витамины, провитамины и химические вещества с аналогичным воздействием: витамин А 27800 МЕ/кг, витамин Д3 850 МЕ/кг, красители, антиоксиданты.

Кормление осуществляли однократно в первой половине дня в течение 35 суток. Взвешивание рыбок проводили с интервалом 7 суток с помощью лабораторных электронных весов серии Highland («AdamEquipmentCo» Великобритания), длину тела измеряли посредством наложения на миллиметровую бумагу [224]. Определяли увеличение веса и удельную скорость роста рыбок [170, 224]: $C_w = [\ln W_n - \ln W_0 / (t_1 - t_0)] \times 100 \%$, где C_w - удельная скорость роста, W_0 - начальный вес рыбы, мг; W_n - конечный вес рыбы, мг; $(t_1 - t_0)$ – продолжительность опыта, сутки.

2.7 Статистические методы исследования

Полученные данные были обработаны статистически с применением программы ««BioStat-2009» (Analist Soft Ins., США) и пакета программ Microsoft Excel.

Глава 3. СКРИНИНГ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ, СПОСОБНЫХ К НАКОПЛЕНИЮ МАКСИМАЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА БЕЛКОВОЙ БИОМАССЫ

3.1. Культурально-морфологические характеристики чистых культур дрожжей

С поверхности высших грибов фолиота (*P. abstrouse*), шампиньон (*Agaricus* sp.), рядовка (*Tricholoma* sp.), чешуйчатка (*P. aurivellus*), трутовик (*L. sulfareus*), печеночница обыкновенная (*F. hepatica*), навозник мерцающий (*C. micaceus*), произрастающих в северной части территории Астраханской области (с. Садовое, Ахтубинский район) в чистые культуры выделены 16 культур дрожжей, отличающихся по культуральным и морфологическим признакам (табл. 3).

С культуры базидиомицета фолиота (*P. abstrouse*) были выделены две, с шампиньона (*Agaricus* sp.) – две, с рядовки (*Tricholoma* sp.) – один, с чешуйчатки (*P. aurivellus*) – три, с трутовика (*L. sulfareus*) – один, с печеночницы обыкновенной (*Fistulina hepatica*) – один, с навозника мерцающего (*C. micaceus*) – шесть дрожжевых культур. По культуральным признакам дрожжи отличались цветом – окраска штриха варьировала от бежевого до насыщенного морковного; структурой поверхности – гладкая или неоднородная; консистенцией – пастообразная или слизистая; характером роста на среде Сабуро – вырастает или не вырастает в агар.

По морфологическим признакам выделенные культуры отличаются формой (овальные, округлые, удлинённые) и диаметром (от 2 до 5 - 6 мкм) клеток (табл. 3).

Таблица 3 – Морфологические признаки дрожжевых культур, выделенных с поверхности высших грибов

Базидиомицеты	Культура	Описание штриха дрожжевых культур	Морфология и диаметр клеток
чешуйчатка (<i>P. aurivellus</i>)	PhaurI	насыщенный морковный цвет, «пухлый», не стекает, поверхность гладкая, с сильным «мокрым» блеском, консистенция слизисто-пастообразная, в агар не вырастает	крупные клетки округлой формы, 2-4 мкм
	PhaurII	насыщенный розовый цвет, поверхность неоднородная, в основном слабо морщинистая, матовая, местами гладкая со слабым блеском, консистенция пастообразная, не стекает, в агар не вырастает	клетки округлой формы, 3 - 5 мкм
	PhaurIII	бежевый цвет, блестящий, со временем чернеет, ворсинчатый край, сильно вырастает в агар, консистенция пастообразная	крупные клетки удлиненной формы
трутовик (<i>L. sulfareus</i>)	L.sulf	тусклый бежевый цвет, поверхность матовая, складчатая, ворсинчатый край, сильно вырастает в агар с выделением бурого пигмента, консистенция пастообразная	клетки овальной формы, 2,9 – 3,1 мкм
Фолиота (<i>P. abstrouse</i>)	PhabV	тусклый белый цвет, поверхность матовая, складчатая, не вырастает в агар, консистенция пастообразная	крупные клетки округлой формы 8-10 мкм
	PhabII	морковный цвет, поверхность гладкая, сильный блеск, не стекает, консистенция слизистая, не вырастает в агар	клетки овальной формы 3-4 мкм
рядовка (<i>Tricholoma</i> sp.)	Tr.P	серо-кремовый цвет, поверхность матовая, складчатая, в агар не вырастает	клетки овальной и удлиненной формы 3-5 мкм
шампиньон (<i>Agaricus</i> sp.)	AgI	светло-оранжевый цвет, поверхность гладкая, блестящая, консистенция слизистая, в агар не вырастает	клетки удлиненной формы, 5,2 – 5,5 мкм
	AgIV	ярко-морковный цвет, поверхность складчатая, матовая, консистенция пастообразная, в агар не вырастает	клетки овальной формы, 1,5 – 2,3 мкм
печеночница обыкновенная (<i>Fistulina hepatica</i>)	FhI	бежевый цвет, со временем зеленеет, поверхность матовая, складчатая, ворсинчатый край, вырастает в агар, кожистая консистенция	крупные клетки удлиненной формы, 5 -7 мкм
навозник мерцающий (<i>C. micaceus</i>)	CmIII	кремовый цвет с желтым оттенком, слабый блеск, поверхность складчатая, вырастает в агар, пастообразная консистенция	клетки округлой и удлиненной формы 2-3 мкм и 4-6 мкм
	CmV	молочно-белый цвет, поверхность гладкая, слабый блеск, не вырастает в агар, консистенция пастообразная	клетки округлой формы около 2-2,5 мкм

Продолжение таблицы 3

Базидиомицеты	Культура	Описание штриха дрожжевых культур	Морфология и диаметр клеток
навозник мерцающий (<i>Coprinus micaceus</i>)	СmVI	бежевый цвет, гладкая поверхность, пастообразная консистенция, не вырастает в агар, слабый блеск	клетки овальной формы 2-3 мкм
	СmVII	бежевый цвет, матовая поверхность, пастообразная консистенция, вырастает в агар	клетки округлой формы 2 -2,5 мкм
	СmVIII	насыщенный персиковый цвет, поверхность неоднородная, слабый блеск, консистенция пастообразная	крупные клетки удлиненной формы 5 -6 мкм
	СmXIX	морковный цвет, «пухлый», не стекает, поверхность гладкая с сильным мокрым блеском, консистенция пастообразная, в агар не вырастает	клетки овальной формы 2 – 3 мкм

3.2. Изучение макроморфологических признаков выделенных дрожжевых культур

3.2.1 Особенности роста в жидких средах

При изучении особенности роста дрожжей в жидких средах отмечали степень помутнения среды, образование осадка, характер и наличие пленки и взвеси (рис.1).

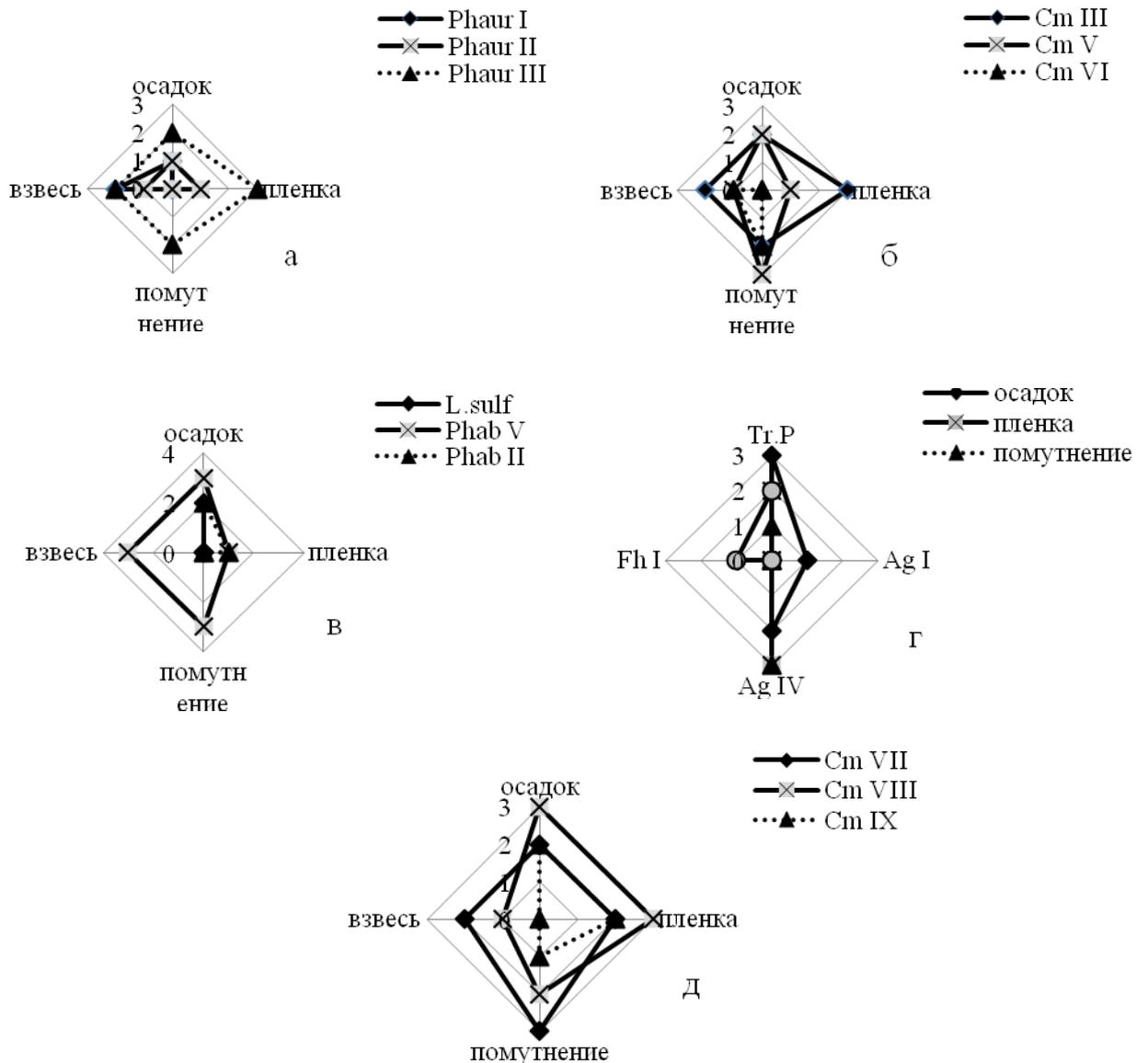


Рисунок 1– Характер роста дрожжевых культур на бульоне Сабуро

Рост дрожжей на бульоне Сабуро характеризовался выпадением обильного осадка в посевах культур L.sulf, PhabV, PhabII, CmVII, CmVIII, CmIX (рис.1 в, д). Наличие плотной пленки и сильную мутность среды

отмечали у CmIII, CmV, CmVI, CmVII, CmVIII, CmIX (рис. 1 б, д). Присутствие взвеси особенно ярко выражено в пробирках с посевами культур PhaurI, PhaurII, PhaurIII, CmIII, CmV, CmVI (рис.1 а, б).

Таким образом, все исследуемые культуры дрожжей активно растут в бульоне Сабуро.

3.2.2 Культивирование гигантских колоний

При изучении образования гигантских колоний на морфологическом агаре отмечали форму, цвет, характер поверхности, консистенцию и их диаметр. Все исследуемые дрожжевые культуры интенсивно росли на морфологическом агаре. Большинство дрожжей формировали округлые гладкие колонии пастообразной консистенции. Культуры PhaurIII и FhI росли в виде расползающихся колоний неправильной формы и слизистой консистенции. Наибольший диаметр колоний отмечен у дрожжевой культуры PhaurIII ($5,5 \pm 1,5$ см) (табл.4).

Таблица 4 – Особенности роста гигантских колоний исследуемых дрожжей

Культуры	Культурально-морфологические признаки колоний				Диаметр, см
	Форма	Цвет	Поверхность	Консистенция	
Phaur I	Округлая	насыщенно розовая	гладкая, блестящая, выпуклая, не вырастает в агар	Слизистая	2,4 ± 1
PhaurII	Округлая	бледно-оранжевая	выпуклая, складчатая, не вырастает в агар	Пастообразная	1,2 ± 0,5
PhaurIII	Расползающаяся	Бежевая	складчатая, гладкая в центре, неровный край, вырастает в агар	Слизистая	5,5 ± 1,5
Lsulf	Округлая	светло-серая	матовая, вырастает в агар	Пастообразная	0,5 ± 0,2
PhabV	Округлая	грязно-белая	матовая, складчатая, не вырастает в агар	Пастообразная	0,7 ± 0,2
PhabII	Круглая	Морковная	выпуклая, гладкая, блестящая, не вырастает в агар	Слизистая	1,5 ± 1
TrP	Округлая	грязно-кремовая	матовая, складчатая, не вырастает в агар	Пастообразная	1,4 ± 0,5
AgI	Округлая	грязно – желтая	гладкая, блестящая	Слизистая	0,6 ± 0,2
AgIV	Округлая	насыщенно морковная	матовая, складчатая, выпуклая, не вырастает в агар	Пастообразная	2,3 ± 2
FhI	Расползающаяся	грязно-бежевая	матовая, неровный край, вырастает в агар	Кожистая	0,5 ± 0,2
CmIII	Округлая	Бежевая	матовая, складчатая, не вырастает в агар	Пастообразная	1,5 ± 0,5
CmV	Округлая	грязно-белая	гладкая, матовая, слабый блеск, не вырастает в агар	Пастообразная	2,2 ± 1,5
CmVI	Круглая	Бежевая	складчатая, гладкая в центре, вырастает в агар	Пастообразная	1,9 ± 1,5
CmVII	Округлая	светло-серая	матовая, вырастает в агар	Пастообразная	0,7 ± 0,2
CmVIII	Округлая	Персиковая	матовая, гладкая в центре, не вырастает в агар	Пастообразная	1,2 ± 1
CmIX	Круглая	Морковная	выпуклая, гладкая, блестящая, не вырастает в агар	Пастообразная	1,4 ± 0,5

3.3 Изучение микроморфологических признаков дрожжевых культур

Из микроморфологических признаков изучали образование псевдомицелия, баллистоспор, аскообразование.

Дрожжевые культуры PhaurIII, L.sulf, PhabV, TrP, FhI образовывали псевдомицелий. При этом псевдомицелий дрожжей PhaurIII и TrP представлял собой звездообразную структуру, у PhabV был в виде колосков, для псевдомицелия L.sulf и FhI были характерны ветвистые структуры (табл. 5).

Учитывая, что изучаемые культуры не образуют баллистоспоры, их можно отнести к аскомицетовым дрожжам.

Таблица 5 – Микроморфологические признаки выделенных дрожжевых культур

Культуры	Псевдомицелий	Баллистоспоры	Аскоспоры
PhaurI	н/о	н/о	1 спора
PhaurII	н/о	н/о	н/о
PhaurIII	Звездообразные структуры	н/о	2 споры
Lsulf	Ветвистые структуры	н/о	2 споры
PhabV	«Колоски»	н/о	н/о
PhabII	н/о	н/о	н/о
TrP	Звездообразные структуры	н/о	1 спора
AgI	н/о	н/о	н/о
AgIV	н/о	н/о	н/о
FhI	Ветвистые структуры	н/о	2 споры
CmIII	н/о	н/о	н/о
CmV	н/о	н/о	н/о
CmVI	н/о	н/о	н/о
CmVII	н/о	н/о	н/о
CmVIII	н/о	н/о	н/о
CmIX	н/о	н/о	н/о

Примечание: «н/о» - исследуемые признаки не обнаружены.

3.4 Изучение специфических свойств выделенных дрожжевых культур

3.4.1 Изучение роста на средах с повышенным осмотическим давлением

Содержание в составе питательной среды 50% и 60% глюкозы оказывало незначительное угнетающее действие на скорость роста культур PhabV, PhaurI, AgIV, FhI, CmVI (рис.2).

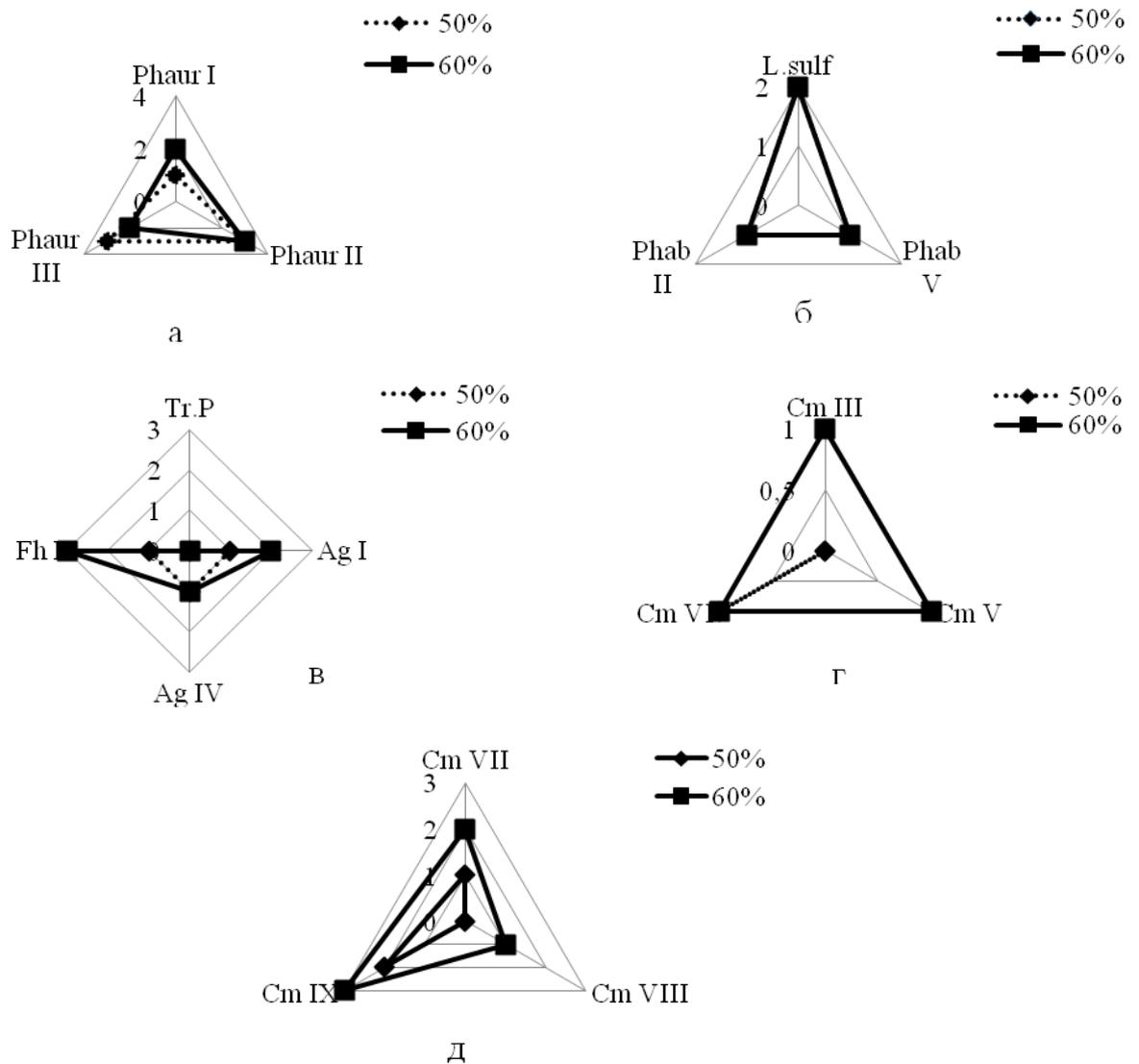


Рисунок 2 – Особенности роста изучаемых дрожжей на средах с высоким осмотическим давлением

Более выраженное угнетающее действие при 50% присутствии глюкозы в питательной среде выявлено при исследовании роста культур L.sulf., AgI, PhaurIII, а при содержании 60 % глюкозы их рост полностью подавляется. Скорость роста дрожжей TrP и CmVIII в присутствии углевода

не изменялось. Идентичное влияние наблюдали в отношении CmIII, CmV. Добавление 50% и 60% раствора глюкозы скорость стимулировало скорость роста PhabII. Добавление глюкозы (50% и 60%) оказывало выраженное угнетающее действие на рост культур Phaur II, CmVII, PhaurIII и CmIX. Присутствие 50% раствора глюкозы ингибирует рост культур PhaurIII и CmIX, а добавление 60% раствора глюкозы в среду значительно замедляет их рост.

3.4.2 Особенности роста при повышенных температурах

При анализе полученных данных выявлено, что способность к росту сохраняется у большинства культур (рис. 3)

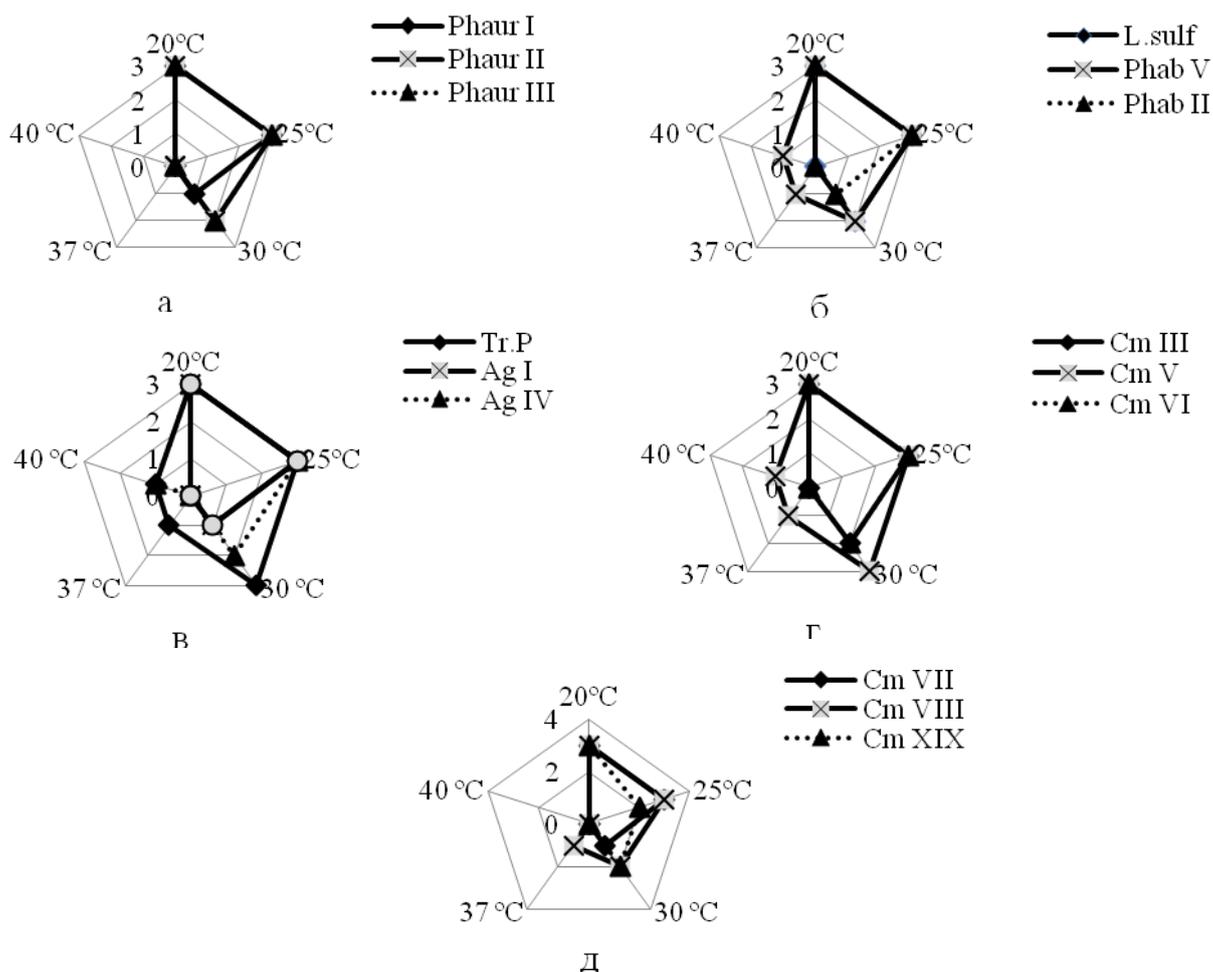


Рисунок 3 – Рост изучаемых культур дрожжей при повышенных температурах

При 30° С скорость роста культур PhaurI, PhabII, AgI, FhI, CmVII значительно понижалась, на остальные культуры данная температура оказывала меньшее влияние. При повышении температуры до 37 °С рост наблюдали у культур PhabV, TrP, CmV, CmVIII, но скорость его значительно замедлялась, а при 40 °С слабый рост отмечали только у культур PhabV, TrP, Ag IV, CmV. Рост остальных дрожжей подавлялся полностью (рис. 3).

Таким образом, наиболее оптимальной для роста всех культур является температура 20 - 25 °С.

3.5 Изучение физиолого - биохимических признаков дрожжевых культур

3.5.1 Способность исследуемых дрожжевых культур к сбраживанию сахаров

В результате исследований установлено, что культура PhaurI наиболее активно сбраживает глюкозу, сахарозу и раффинозу, PhaurII, PhabV – сахарозу, PhaurIII, FhI - раффинозу. Культура L.sulf – мальтозу, галактозу, глюкозу и сахарозу, PhabII – галактозу, глюкозу, сахарозу, AgI - лактозу, галактозу, сахарозу, AgIV – глюкозу, сахарозу. CmV, Cm VIII – мальтозу, галактозу, глюкозу, сахарозу, CmVI - галактозу, глюкозу, сахарозу, CmVII – глюкозу, раффинозу (рис. 4 - 6).

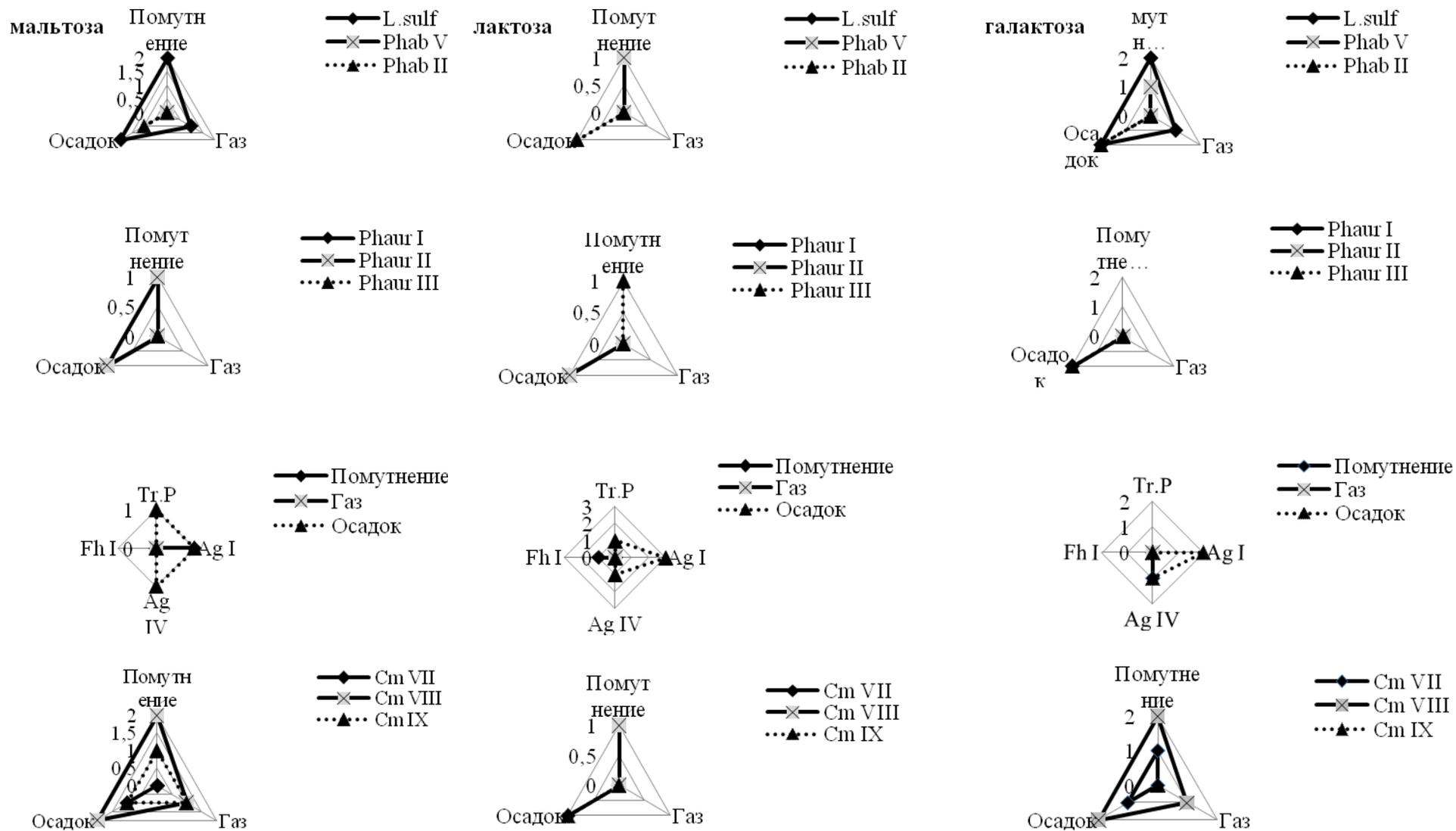


Рисунок 4 – Сбраживание мальтозы, лактозы, галактозы дрожжевыми культурами

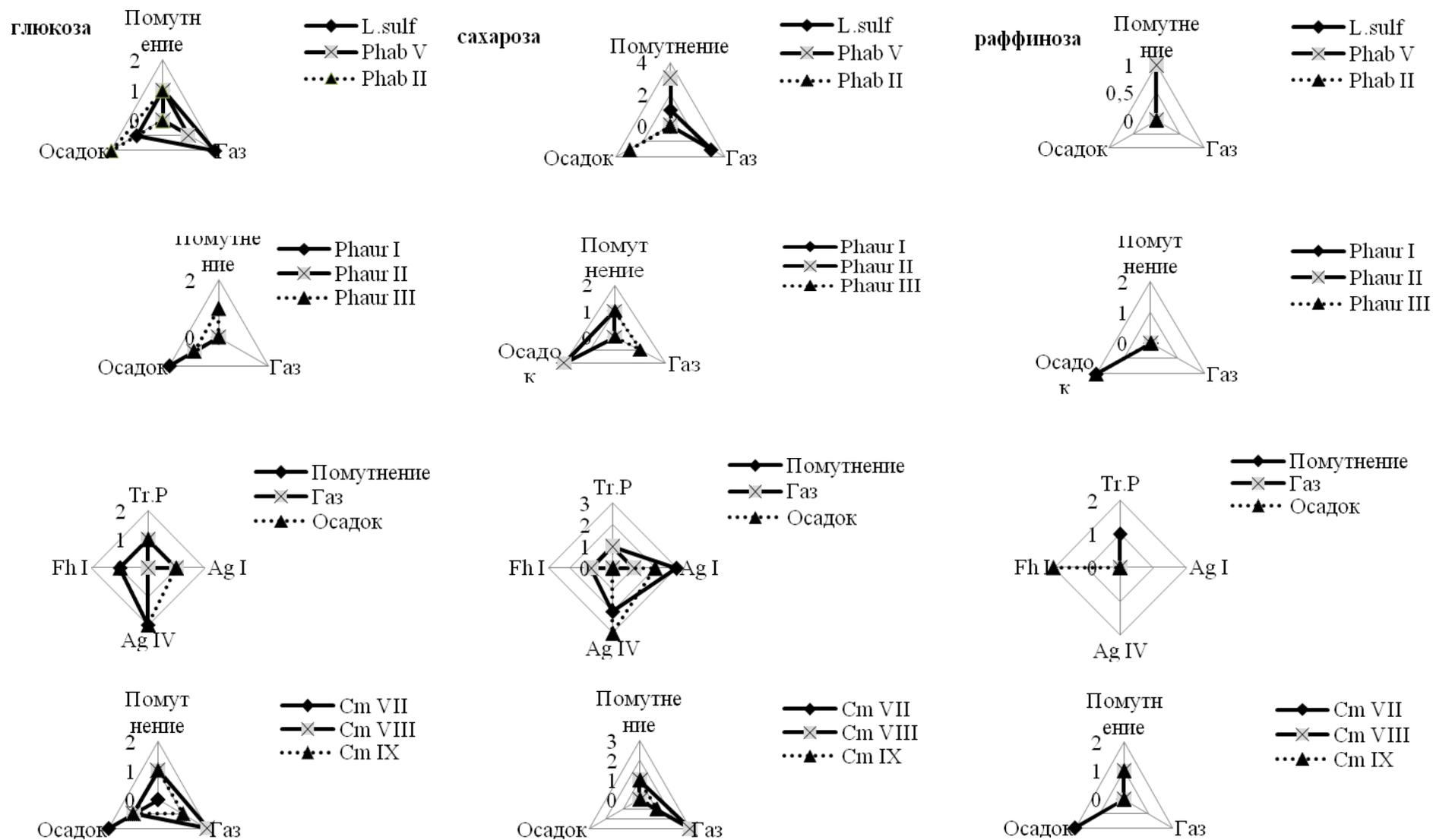


Рисунок 5 – Сбраживание глюкозы, сахарозы, раффинозы дрожжевыми культурами

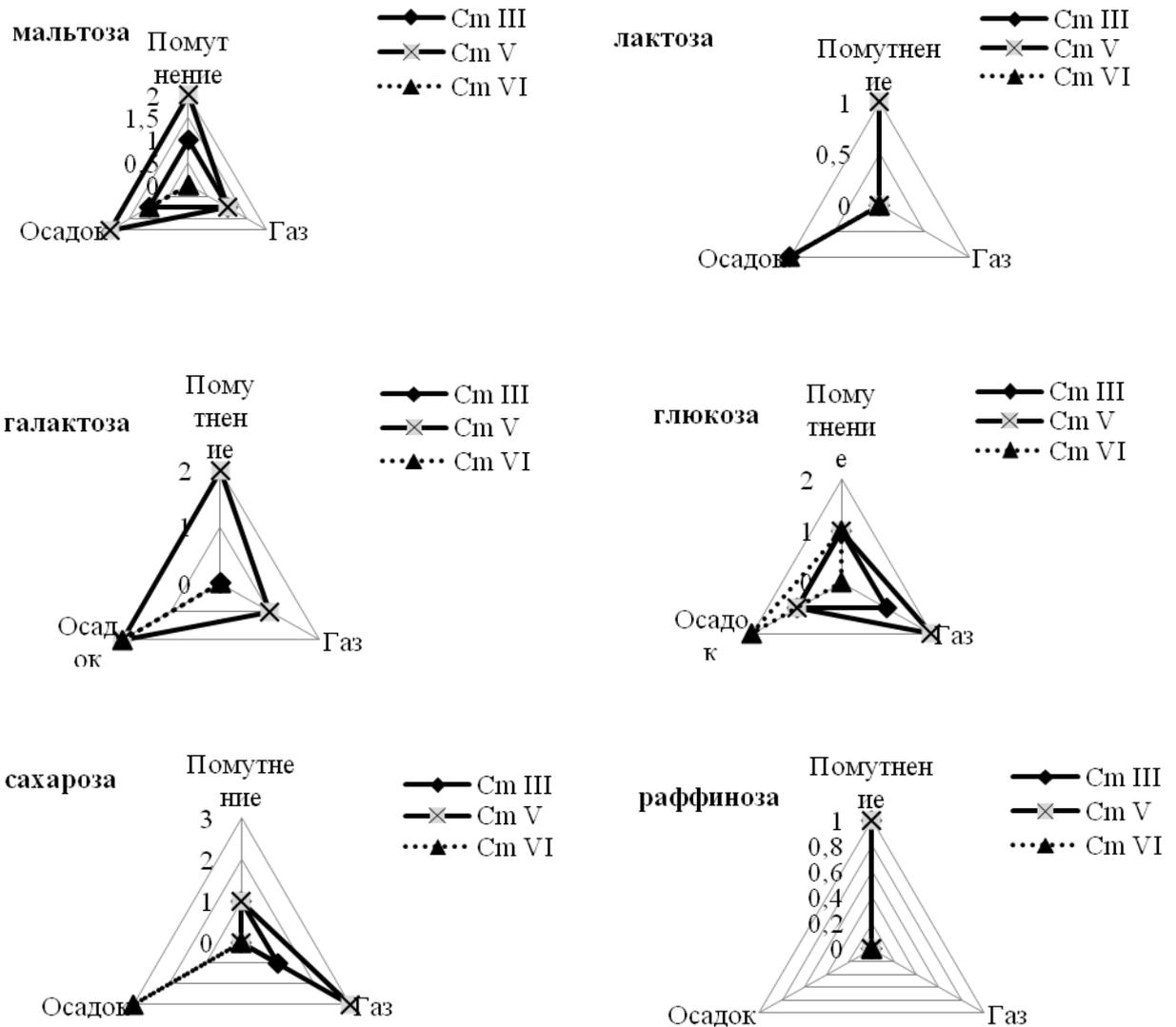


Рисунок 6 – Сбраживание сахаров дрожжевыми культурами

Таким образом, изучаемые культуры дрожжей сбраживают практически все использованные в эксперименте сахара за исключением раффинозы для культур PhaurIII, PhabII, Ag I, CmVI.

3.5.2 Изучение аэробной ассимиляции углерода и азота

При исследовании аэробной ассимиляции дрожжевыми культурами источников азота установлено, что на специальной среде «Difco» с добавлением в качестве источника азота KNO_3 не способны расти культуры PhaurI, L.sulf, AgI, CmIX. На среде с добавлением в качестве источника азота

NH_4^+ способны расти все культуры. На среде с добавлением в качестве источника азота пептона не растет культура *L.sulf* (рис. 7).

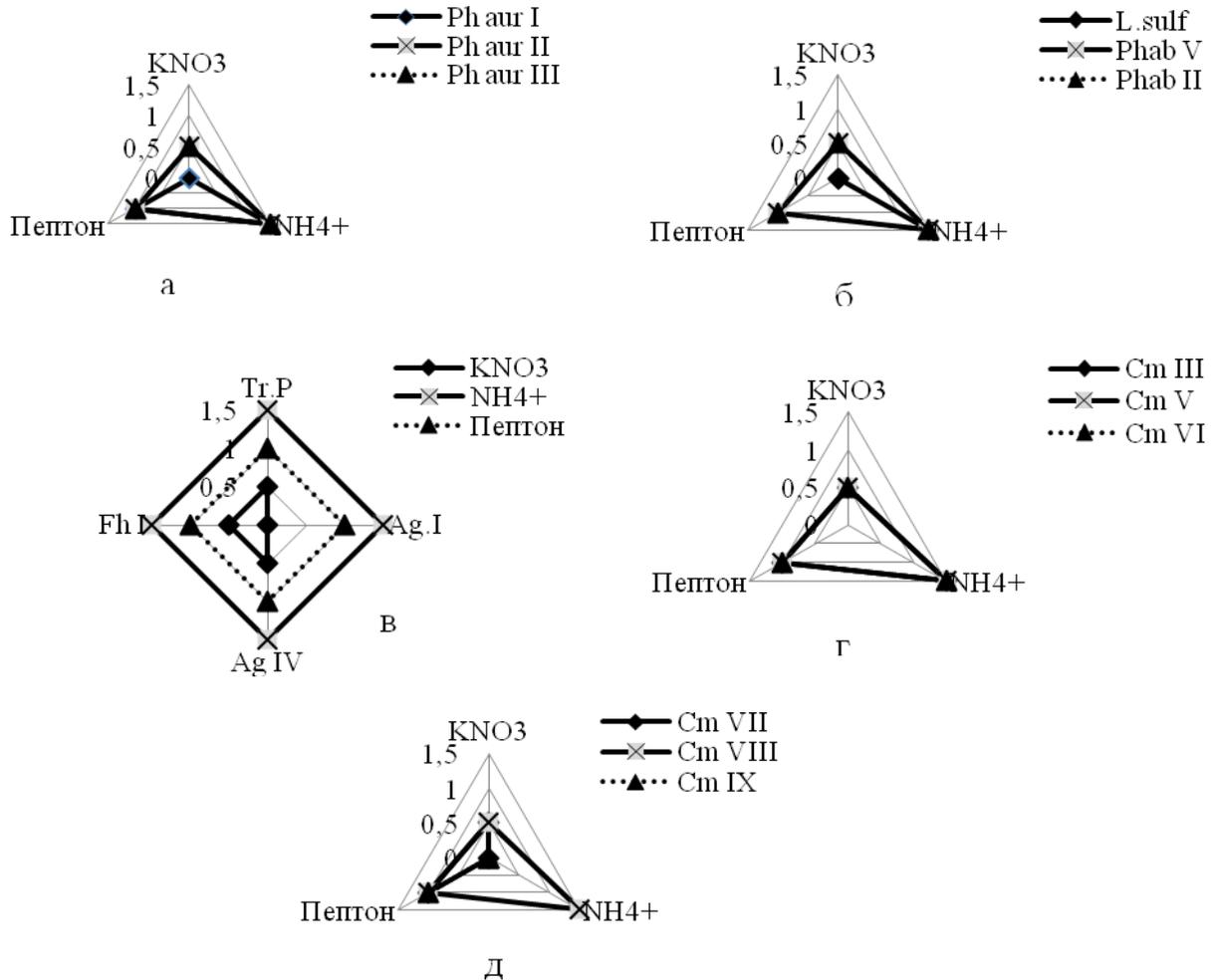


Рисунок 7– Способность дрожжевых культур ассимилировать источники азота

Способность к аэробной ассимиляции углерода и азота является одним из наиболее важных физиологических признаков для определения видовой дифференциации дрожжей. При исследовании аэробной ассимиляции источников углерода и азота нами установлено, что основным и главным источником питания является углерод. Колонии тестируемых дрожжей на специальной азотной среде, содержащей источники углерода, развивались интенсивно, в отличие от среды, где основным источником питания являлся азот: колонии наблюдали мелкие и медленно растущие. Это еще раз доказывает, что выделенные культуры являются дрожжами, так как

используют в качестве источника питания углеводы и активно их потребляют в процессе метаболизма [11].

3.5.3 Изучение способности к росту на безвитаминой среде

В результате исследований установлено, что все исследуемые культуры дрожжей растут на безвитаминой среде (рис. 8).

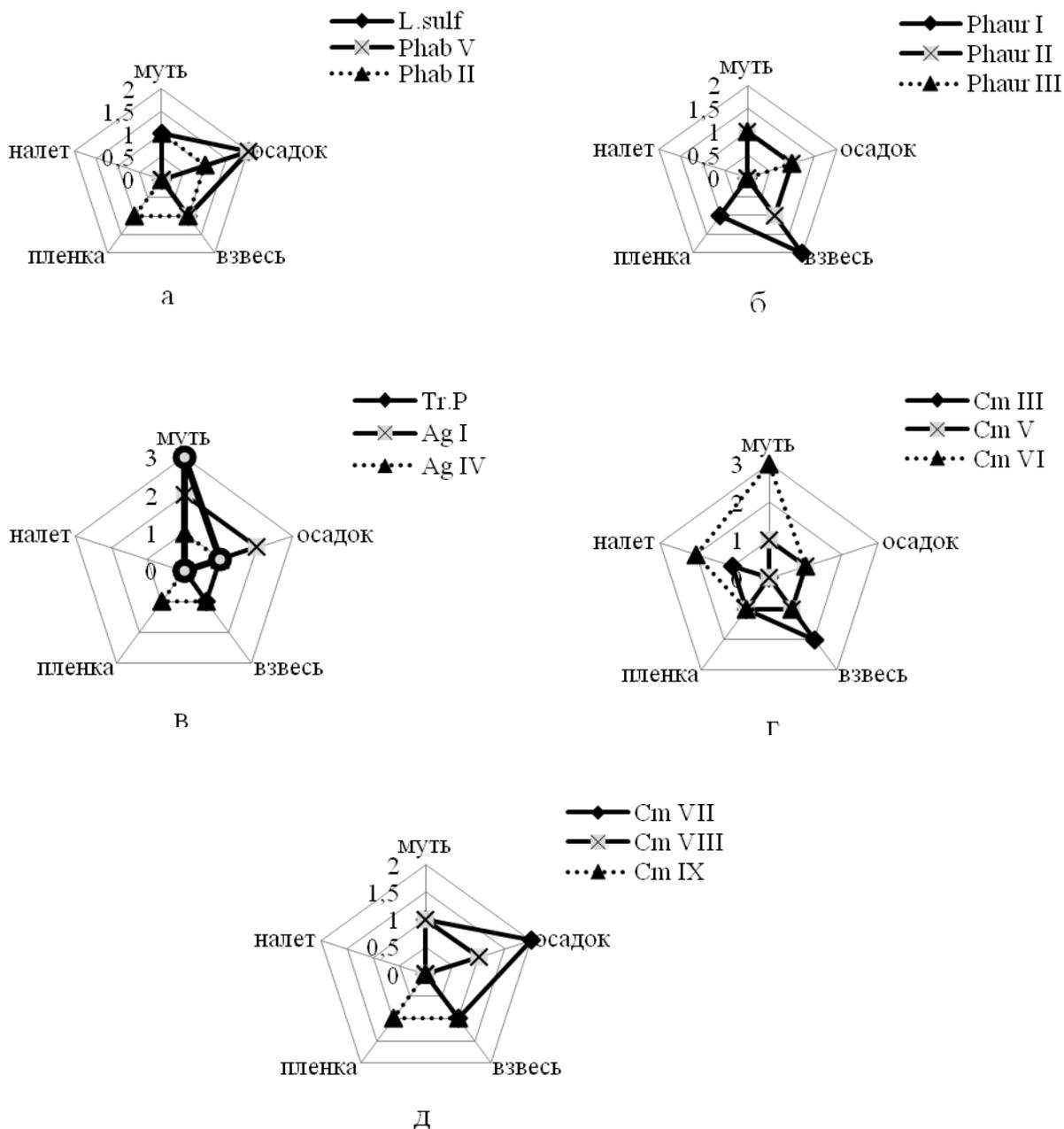


Рисунок 8 – Особенности роста дрожжевых культур на безвитаминой среде

При этом наиболее активный рост, проявляющийся в наличии 3-х признаков (муть, осадок, взвесь), отмечен у культур PhaurII, L.sulf, AgIV, CmV, CmVI.

Все исследуемые культуры способны к синтезу витаминов (рис. 9)

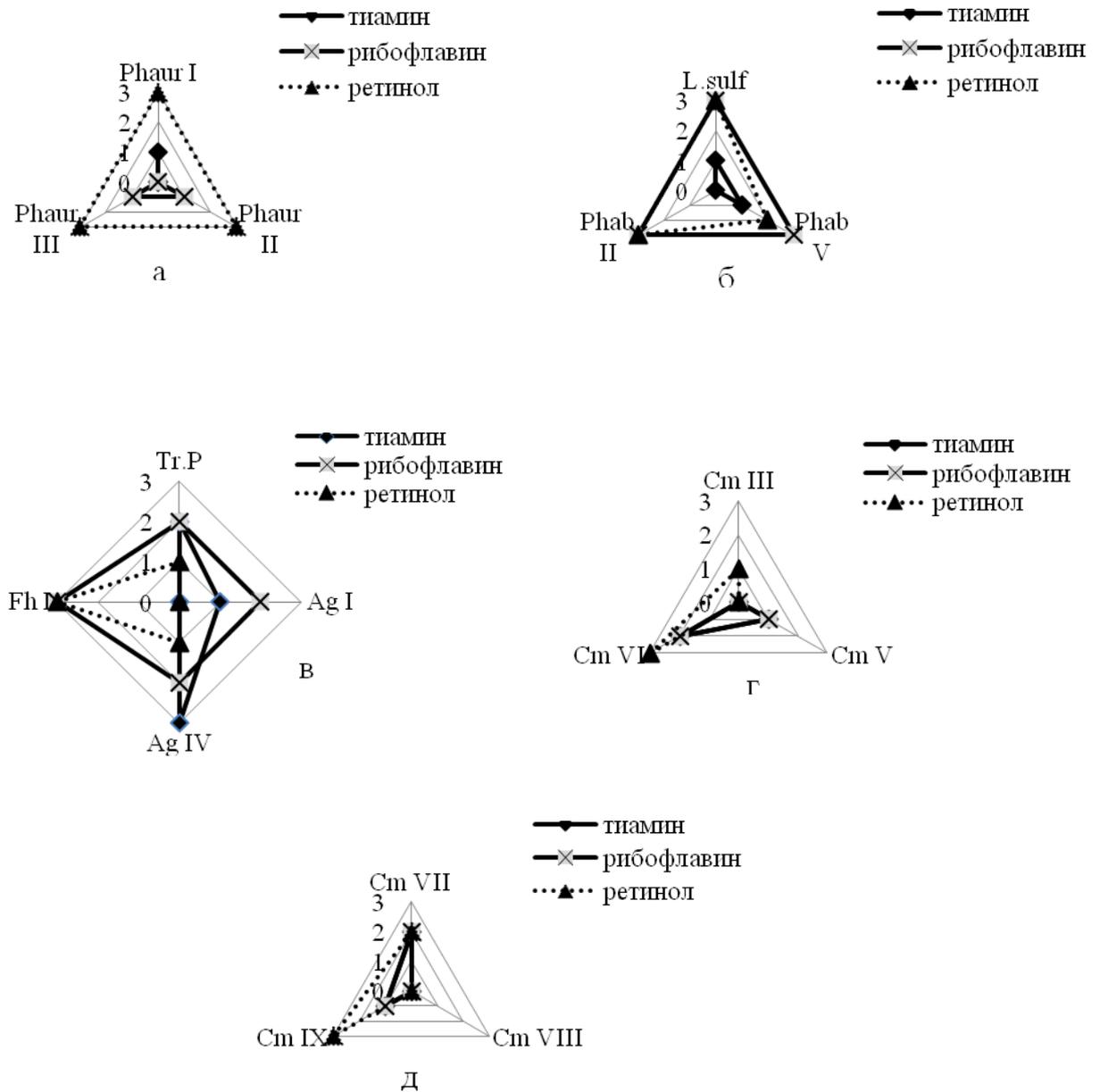


Рисунок 9 – Особенности синтеза витаминов дрожжевыми культурами

На основании проведенных качественных реакций на витамины установили, что положительную реакцию на тиамин проявляют культуры PhaurI, L.sulf, PhabV, TrP, AgI, AgIV, CmV, CmVI, CmVII, CmIX.

Положительную реакцию на рибофлавин – PhaurII, PhaurIII, L. sulf, PhabV, PhabII, TrP, AgI, AgIV, FhI, CmV, CmVI, CmVII, CmIX. Положительную реакцию на фолиевую кислоту проявляли все дрожжи, кроме AgI, CmV и CmVIII, CmVII.

3.5.4 Выявление способности к образованию крахмалоподобных соединений

При выявлении способности изучаемых дрожжевых культур к образованию крахмалоподобных соединений зону просветления наблюдали только у дрожжей PhaurIII и CmVI (рис. 10).

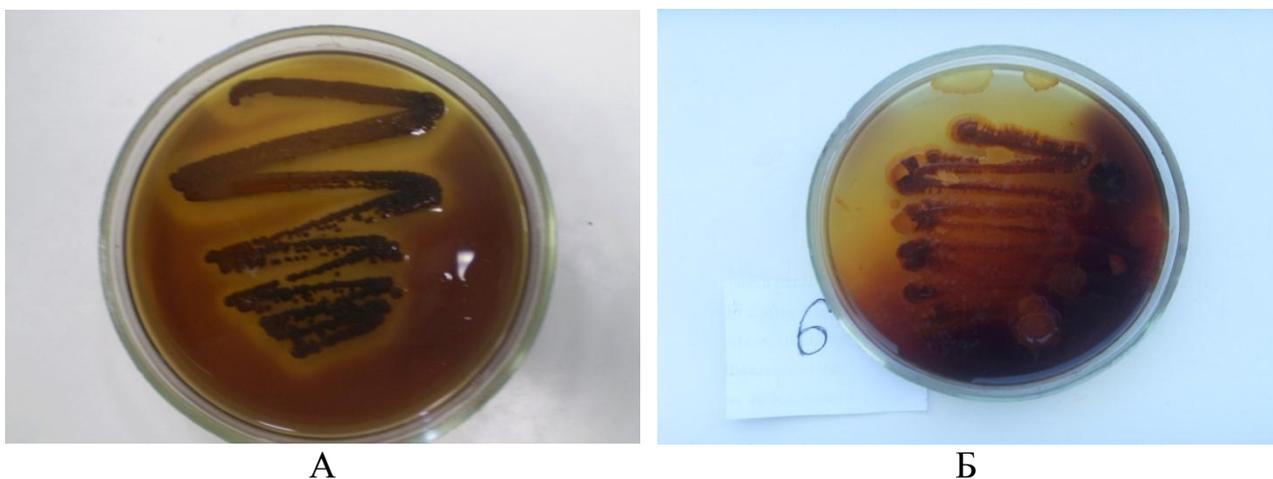


Рисунок 10 – Образование крахмалоподобных соединений у культур PhaurIII (А) и CmVI (Б)

3.5.5 Изучение ферментативной активности дрожжевых культур

При исследовании ферментативной активности у дрожжевых культур изучали уреазную, амилолитическую, протеолитическую и липолитическую активность (рис. 11 - 13).

Амилолитическую активность наблюдали у культур AgI, PhabV, PhabII, Tr.P, CmV, о чем свидетельствовало наличие зон просветления по краю роста колонии. При культивировании культуры PhaurIII наблюдали зону обесцвечивания по всей поверхности агаризованной среды, что

подтверждало активный гидролиз крахмала (рис.11). Остальные культуры дрожжей не проявляли амилолитической активности.

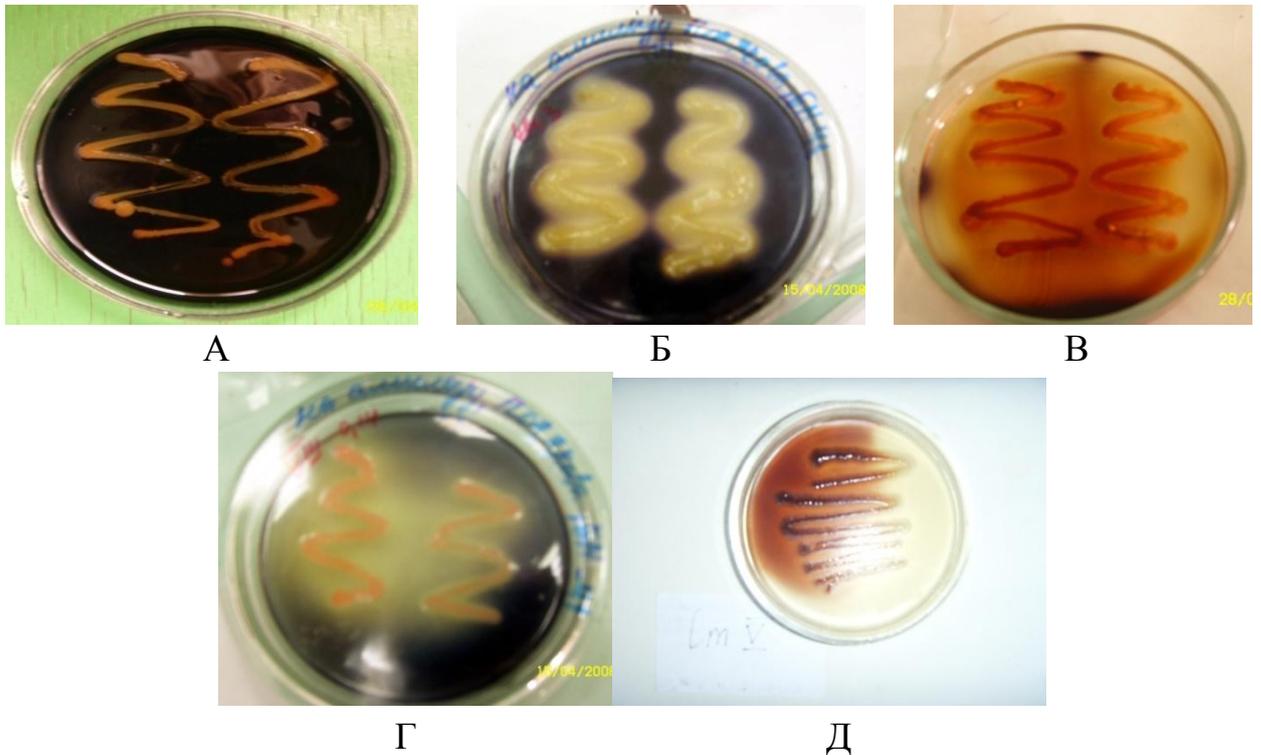
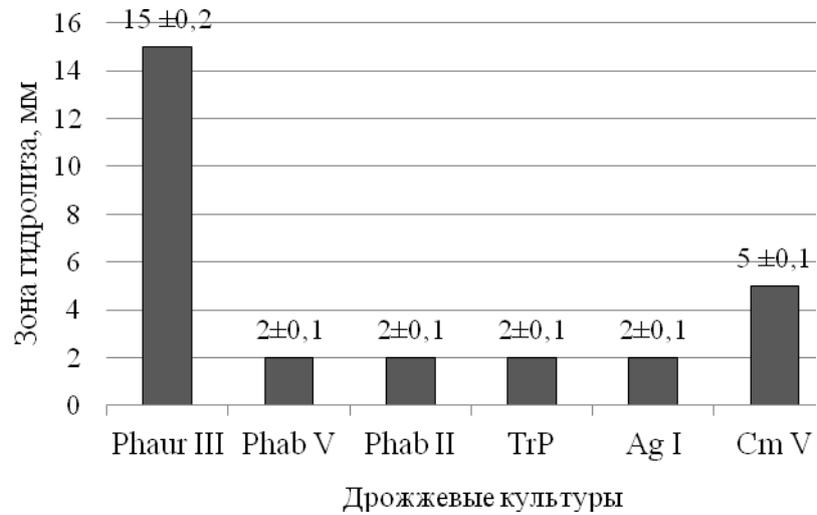
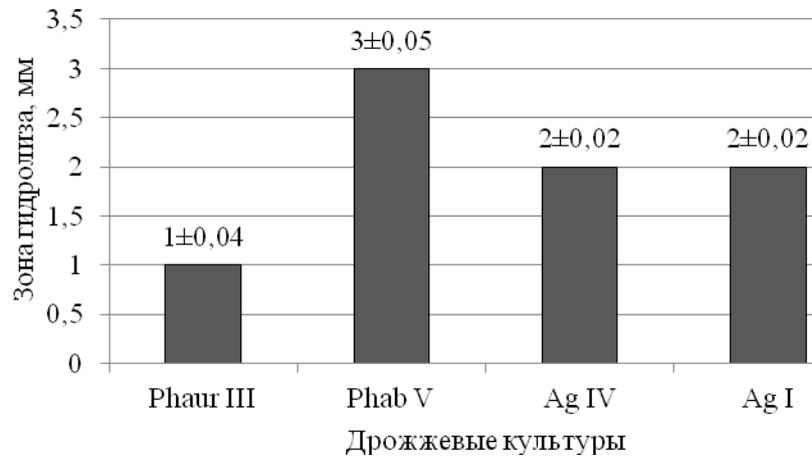


Рисунок 11 – Амилолитическая активность дрожжевых культур PhaurIII (А), TrP (Б), PhabII (В), AgI (Г), CmV (Д)

Протеолитическую активность дрожжей наблюдали у культур: 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 (рис.12). Об этом свидетельствовало наличие участков

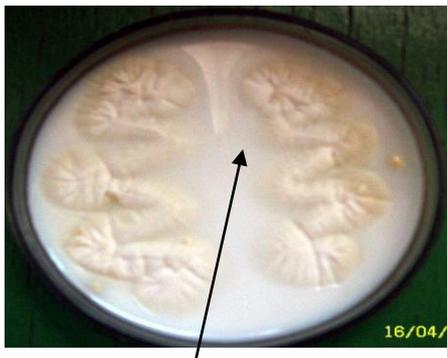
просветления по краю растущей культуры. У других культур протеолитическая активность не выявлена.



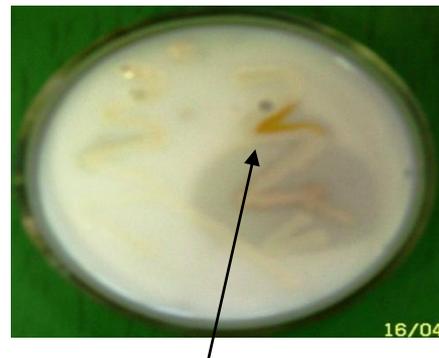
Зона гидролиза
А



Зона гидролиза
Б



Зона гидролиза
Г



Зона гидролиза
Д

Рисунок 12 – Протеолитическая активность дрожжевых культур PhabV (А), AgI (Б), L.sulf (В), AgI (Г), AgIV (Д)

Липолитическую активность проявляли культуры AgI, PhaurI, CmI, CmV, CmVI (рис. 13). У остальных культур липолитическая активность не выявлена.

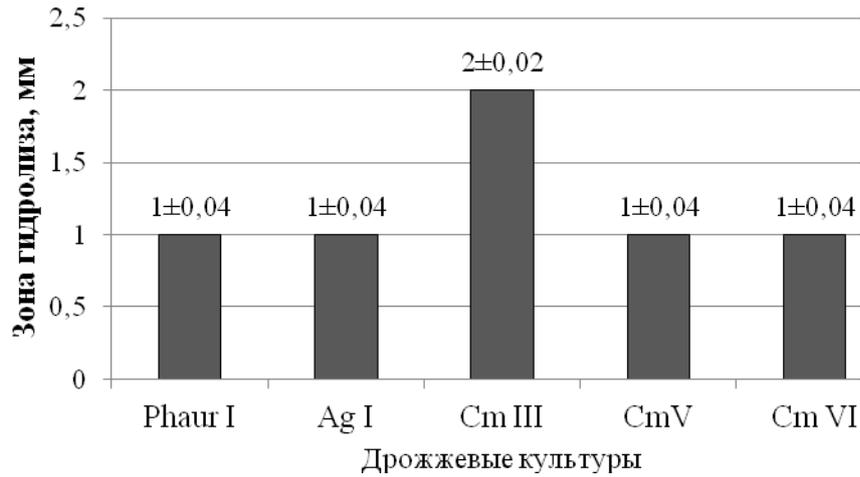


Рисунок 13 – Липолитическая активность дрожжевых культур PhaurI, AgI, CmIII, CmV, CmVI

Все исследуемые дрожжи не проявляли уреазной активности, кроме AgIV, что говорит об их принадлежности к аскомицетам.

3.5.6 Изучение особенностей роста дрожжевых культур при культивировании на средах с различной концентрацией источников питания

При культивировании дрожжевых культур на мелассной среде (0,5 % мелассы) наблюдали выпадение обильного осадка в посевах всех исследуемых дрожжей, кроме Fh I и Cm VI. Наличие пленки отмечали только у PhaurII, Lsulf, PhabV, CmV, CmVIII. Помутнение питательной среды наблюдали у всех культур, кроме PhabII, CmVI. Присутствие взвеси выявлено в пробирках с посевами культур PhaurI, PhaurII, Lsulf, PhabV, TrP, AgIV, FhI, CmIII, CmV, CmVII, CmVIII (рис.14).

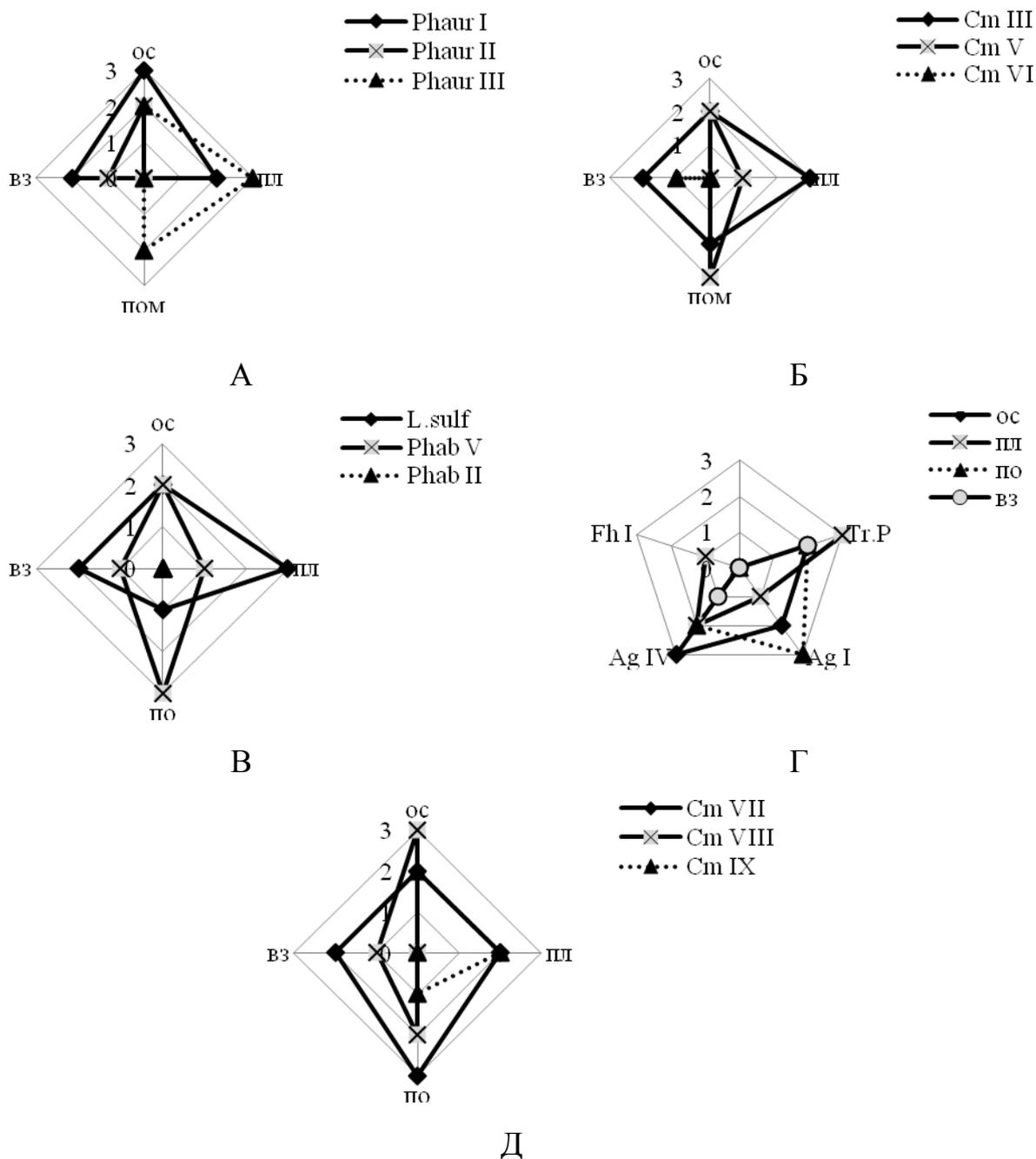


Рисунок 14 – Признаки роста дрожжевых культур на 0,5 % мелассной среде:

ос – осадок, пл – пленка, пом – помутнение, вз – взвесь

Рост дрожжей на мелассной среде (1% мелассы) характеризовался выпадением обильного осадка в посевах всех исследуемых дрожжей, кроме PhaurI, FhI, CmVI, CmVII, CmIX. Наличие пленки отметили у PhaurII, Lsulf, Phab II, PhabV, TrP, Ag IV, CmV, CmVI, CmVIII. Помутнение питательной среды наблюдали у всех объектов, кроме PhaurI, PhaurII, PhaurIII, Lsulf, FhI, CmVI, CmIX. Присутствие взвеси наблюдали в пробирках с посевами культур PhaurI, PhaurII, TrP, AgIV, FhI, CmIII, CmV, CmVII, CmVIII (рис. 15).

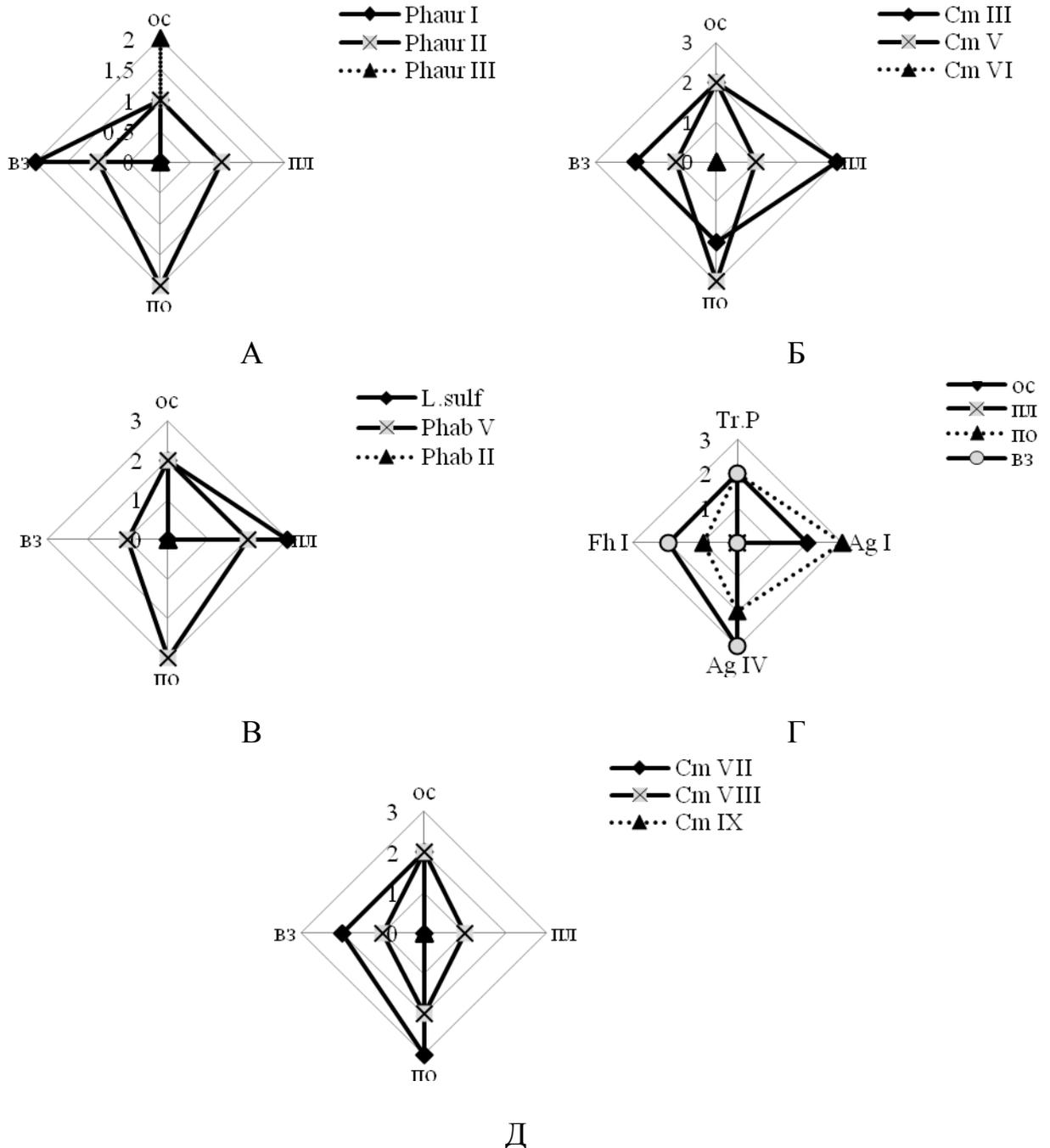
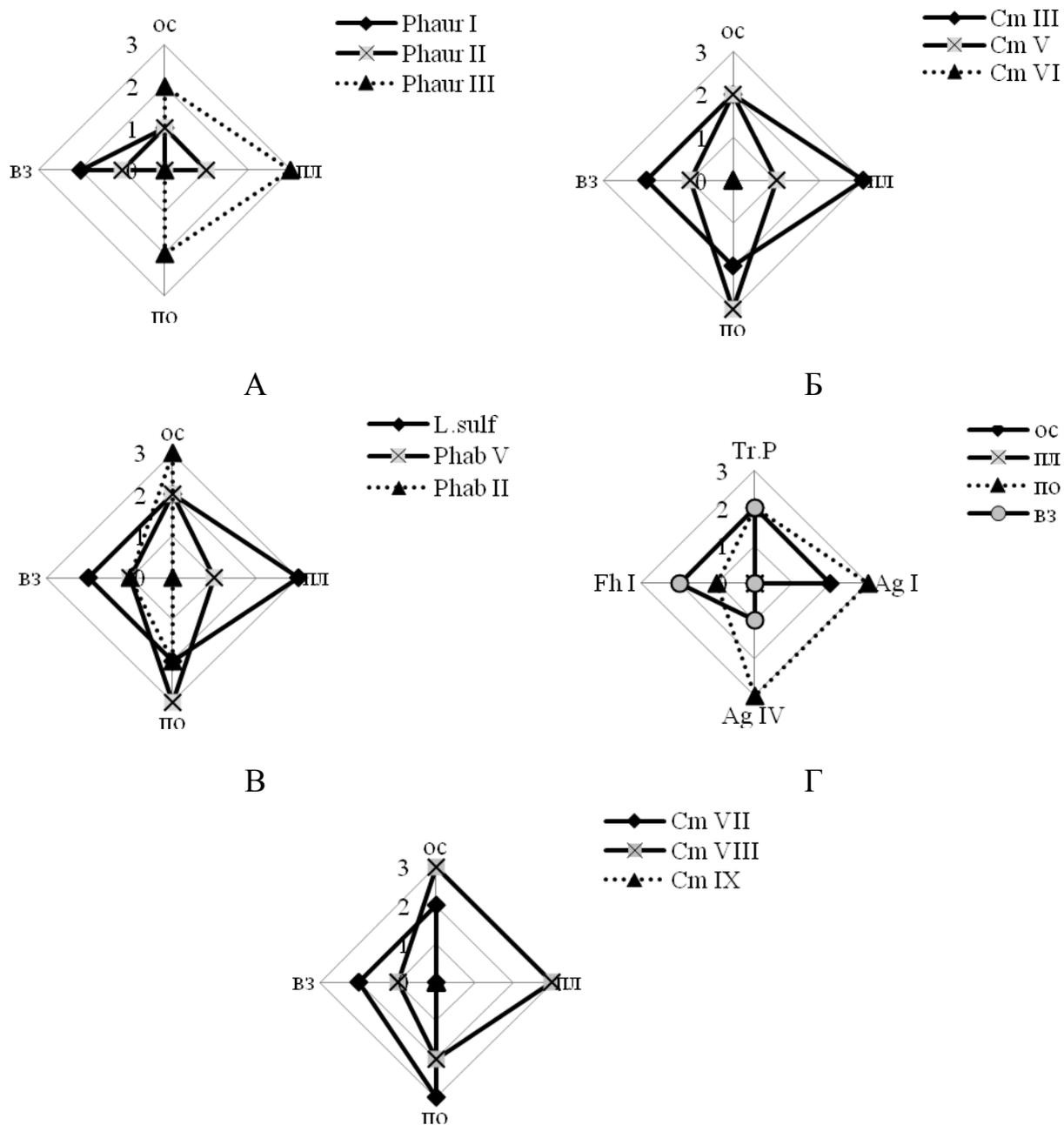


Рисунок 15 – Признаки роста дрожжевых культур на 1 % меласной среде: ос – осадок, пл – пленка, по – помутнение, вз – взвесь

Рост дрожжей на меласной среде (1,5% мелассы) сопровождался выпадением обильного осадка во всех пробирках с посевами, кроме FhI, CmVI, CmIX. Наличие пленки отмечали только культур PhaurII, Lsulf, PhabV, CmVIII. Помутнение питательной среды наблюдали у всех культур, кроме PhaurI, PhaurIII, Lsulf, PhabII, CmVI, CmIX. Присутствие взвеси выявлено в

пробирках с посевами PhaurI, PhaurII, PhabV, TrP, AgIV, FhI, CmIII, CmV, CmVII, CmVIII (рис.16).



Д

Рисунок 16 – Признаки роста дрожжевых культур на 1,5 % мелассной среде:

ос – осадок, пл – пленка, по – помутнение, вз – взвесь

Рост дрожжей на мелассной среде (2% мелассы) характеризовался выпадением обильного осадка в посевах всех исследуемых дрожжей, кроме FhI и CmVI. Наличие пленки отмечали только у культур PhaurI, PhaurII, Lsulf, PhabV, CmVI, CmVIII; помутнение питательной среды отсутствовало

лишь у PhaurI, PhaurIII, Lsulf, PhabII, FhI, CmVI. Присутствие взвеси отмечали в процессе роста PhaurI, PhaurII, PhabV, TrP, AgIV, FhI, CmIII, CmV, CmVI, CmVII, CmVIII (рис. 17).

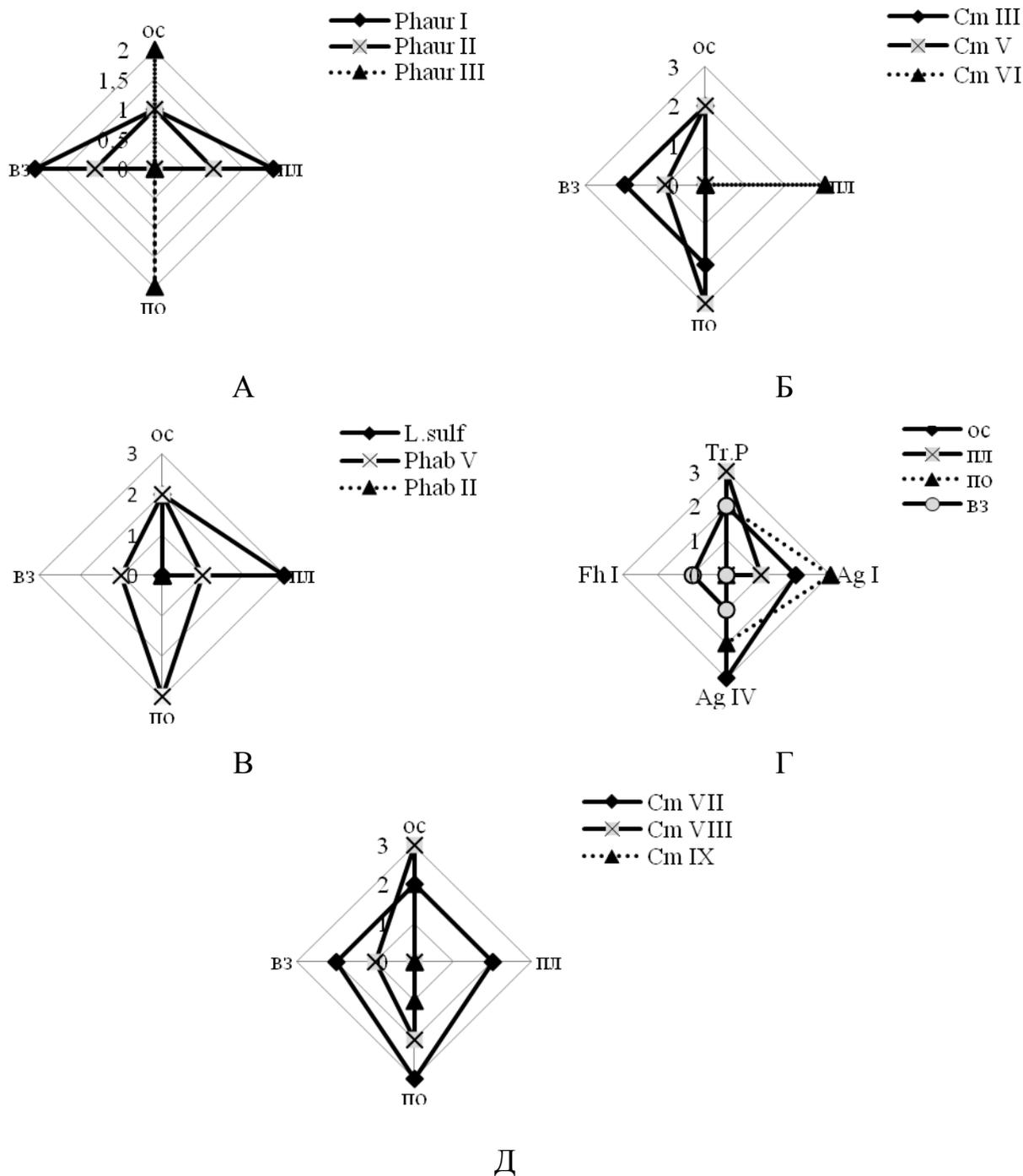


Рисунок 17 – Признаки роста дрожжевых культур на 2 % мелассной среде: ос – осадок, пл – пленка, помутнение, вз – взвесь

Рост дрожжей на мелассно-кукурузной среде (0,5% М+0,5% КЭ) характеризовался выпадением обильного осадка в посевах всех исследуемых дрожжей, кроме PhaurI, PhaurII, PhabII, PhabV, AgI, AgIV, Cm VI, CmVIII,

CmIX. Наличие пленки отмечали только у культур TrP, AgI, FhI, CmIII, CmV, CmVI. Помутнение питательной среды выявлено в процессе роста у большинства культур. Исключение составили PhaurI, PhaurIII, Lsulf, FhI, CmIII, CmV, CmVII, CmIX. Присутствие взвеси в пробирках с посевами было характерно для PhaurI, PhaurII, Lsulf, PhabV, TrP, CmIII, CmV, CmVII, CmVIII, CmIX (рис.18).

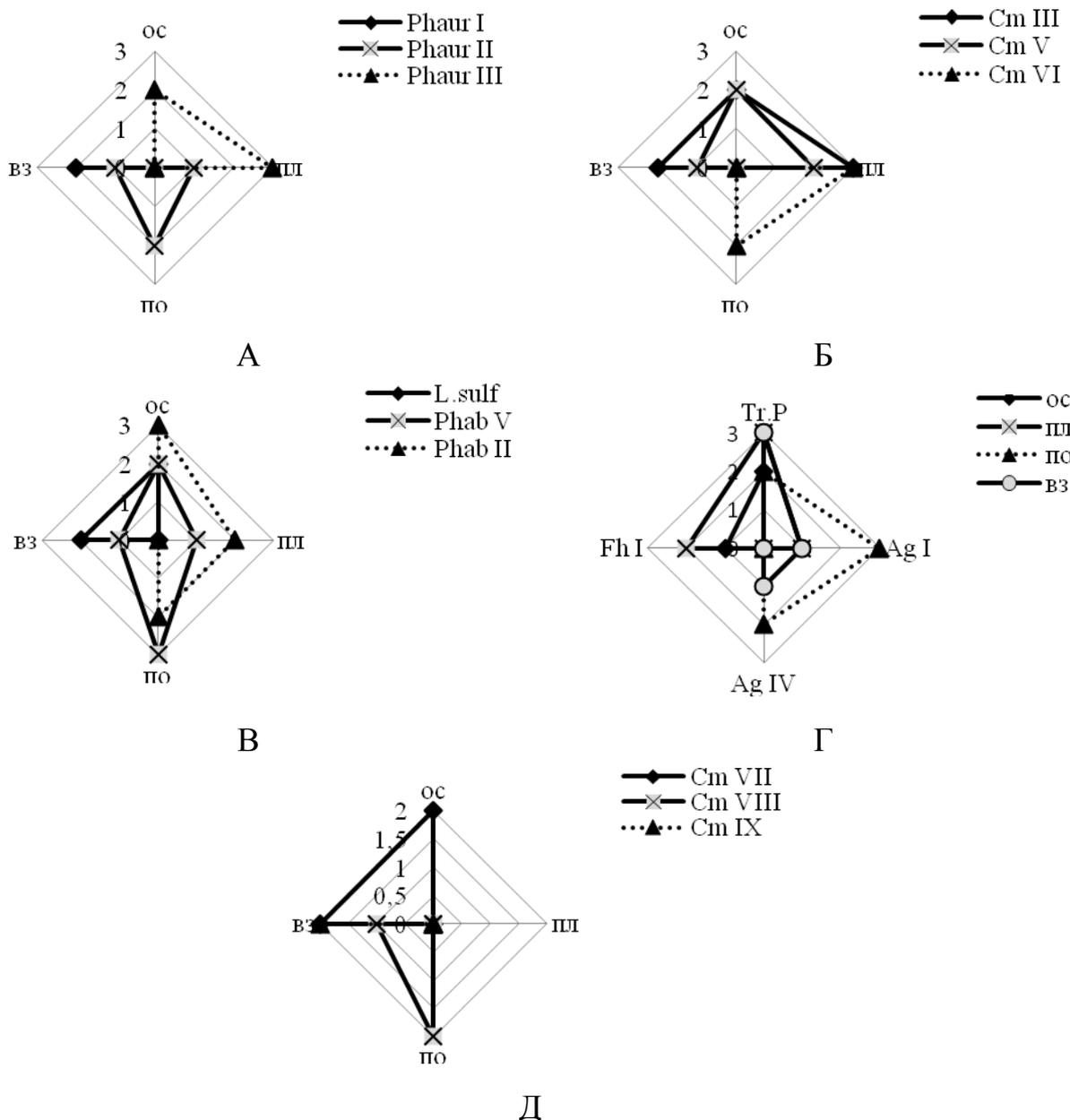


Рисунок 18 – Признаки роста дрожжевых культур на меласно - кукурузной среде (0,5 % М +0,5 % КЭ): ос – осадок, пл – пленка, по – помутнение, вз –

ВЗВЕСЬ

Рост дрожжей на меласно–кукурузной среде (1% М+0,5% КЭ) характеризовался выпадением обильного осадка в посевах всех исследуемых культур, кроме Lsulf, PhabV, TrP, AgI, AgIV, FhI, CmVII. Наличие пленки отмечали только у дрожжей PhaurI, PhaurII, PhabII, TrP, FhI, CmIII, CmV, CmVI. Помутнение питательной среды в процессе роста у большинства культур отсутствовало. Присутствие взвеси выявлено в пробирках с посевами культур PhabII, PhabV, TrP, CmIII, CmV, CmVI, CmVII, CmVIII, CmIX (рис.19).

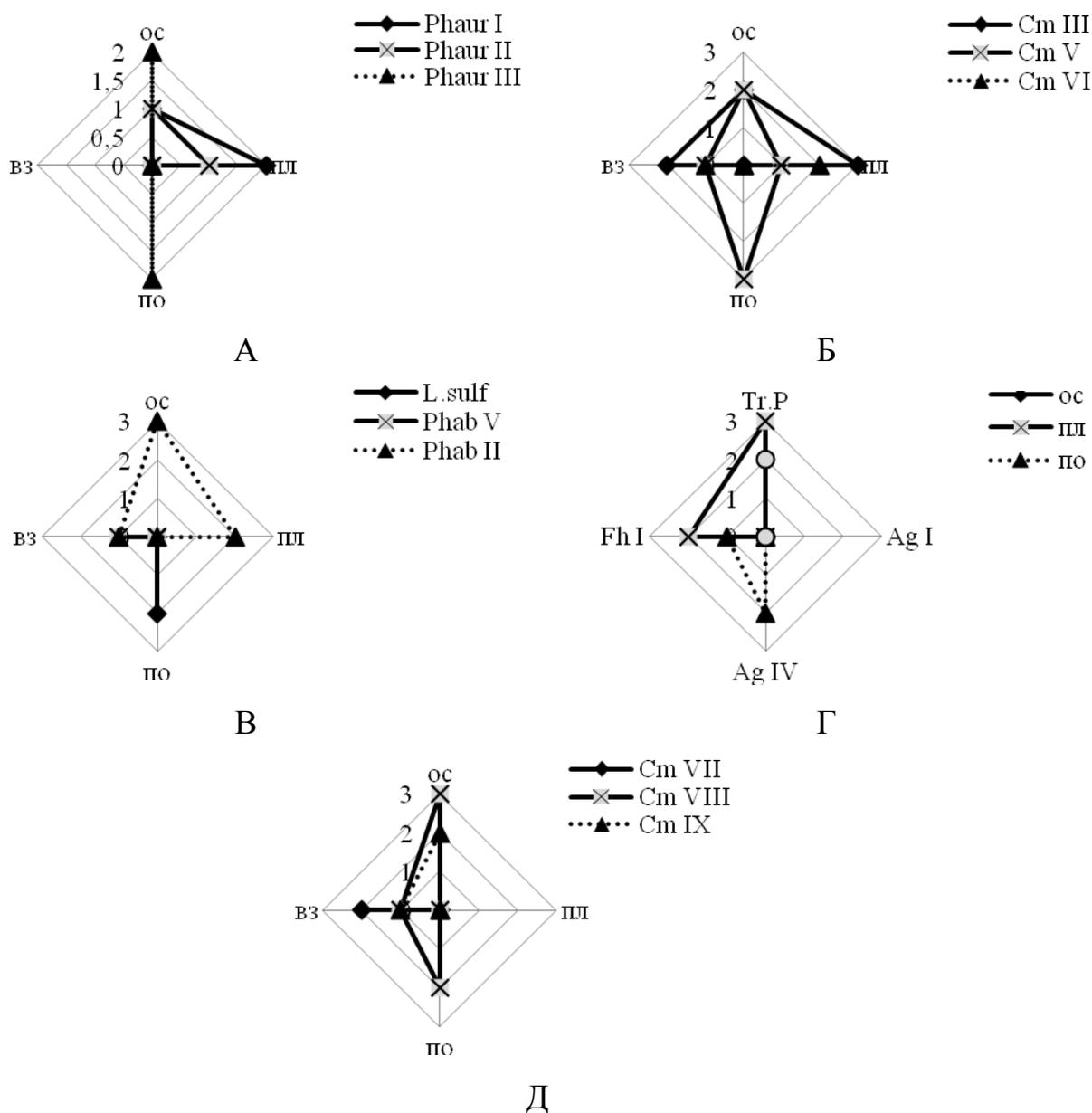


Рисунок 19 – Признаки роста дрожжевых культур на меласно - кукурузной среде (1% М+0,5 % КЭ): ос – осадок, пл – пленка, по – помутнение, вз – взвесь

При культивировании дрожжей на меласно–кукурузной среде (1,5% +0,5% КЭ) также наблюдали выпадение обильного осадка в посевах у большинства исследуемых дрожжей. Для культур PhaurII, PhabII, TrP, AgI, CmIII, CmV, CmVII, CmIX это нехарактерно. Наличие пленки в посевах отмечали практически у всех культур PhaurIII, Lsulf, PhabII, PhabV, TrP, AgI, AgIV, FhI, CmIII, CmV, CmVI, CmVII, CmVIII. Помутнение питательной среды выявлено у шести культур. Для роста PhaurI, PhaurIII, Lsulf, PhabII, TrP, AgI, AgIV, CmIII, CmV, CmVII это было нехарактерно. При культивировании большинства образцов в питательной среде отмечали появление взвеси (рис.20).

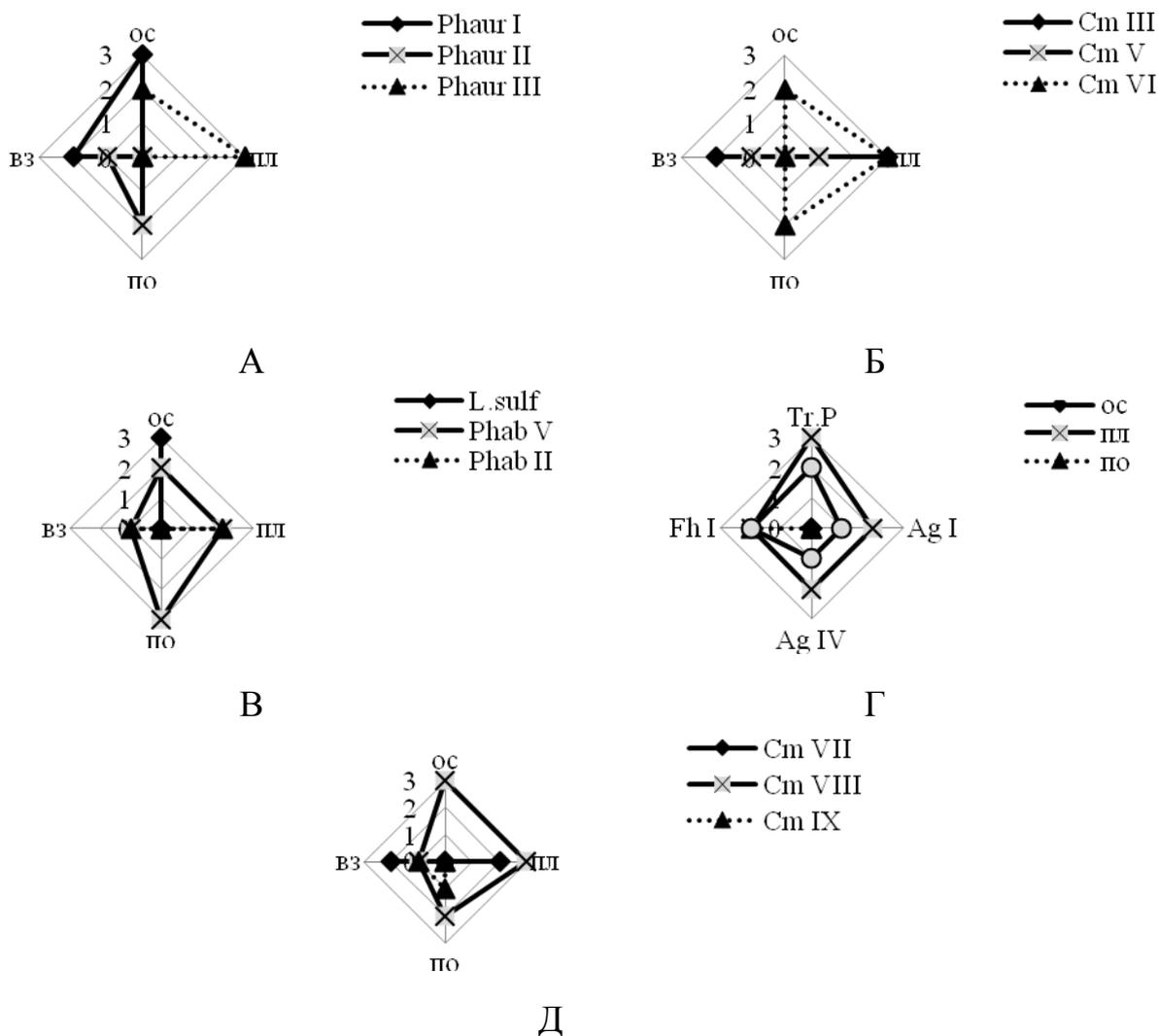


Рисунок 20 – Признаки роста дрожжевых культур на меласно - кукурузной среде (1,5% М+0,5% КЭ): ос – осадок, пл – пленка, пом – помутнение, вз –

взвесь

Рост дрожжей на меласно-кукурузной среде (2% М+0,5% КЭ) у шести культур характеризовался выпадением обильного осадка в посевах. Для большинства этот фактор не характерен. Наличие пленки, напротив, отмечали у большинства образцов. Помутнение питательной среды наблюдали у половины из тестируемых культур. Для двенадцати культур в процессе роста было характерно появление взвеси в питательной среде (рис.21).

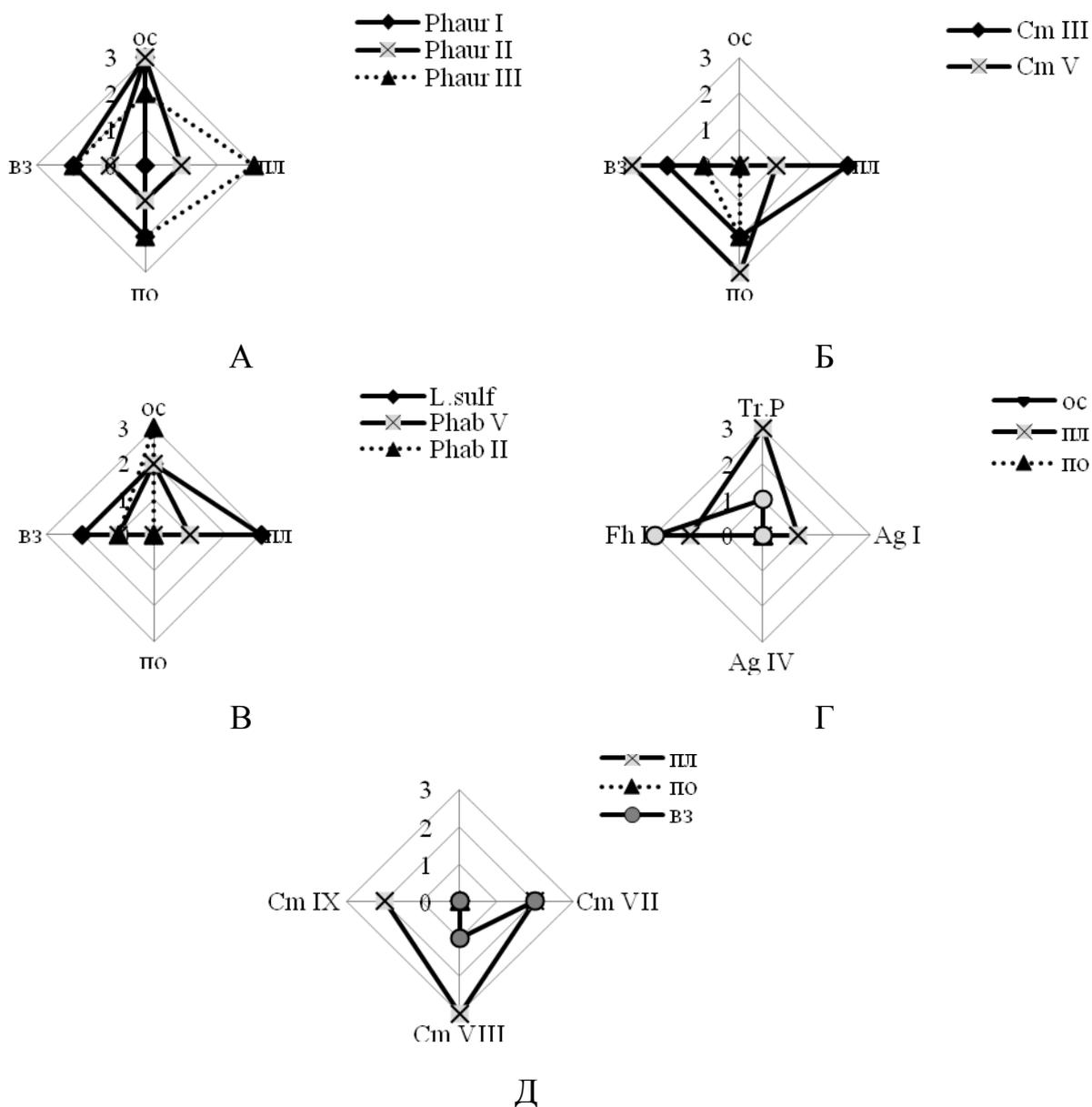


Рисунок 21 – Признаки роста дрожжевых культур на меласно - кукурузной среде (2% М+0,5% КЭ): ос – осадок, пл – пленка, пом – помутнение, вз – взвесь

3.6 Изучение кинетики роста исследуемых дрожжей

Для установления основных закономерностей роста исследуемых культур строили калибровочные кривые, представляющие собой графическую зависимость оптической плотности от численности клеток в суспензии. Для того чтобы избежать трудоемкой операции подсчета численности клеток в 1 мл суспензии при экспериментальном исследовании параметров роста культур на используемых жидких питательных средах проводили измерение оптической плотности суспензий в контрольных точках и по калибровочным кривым определяли численность клеток в суспензиях (Приложение А, рисунок А.1 –А.4).

Изучение кинетики роста позволяет выявить особенности адаптации дрожжей к составу среды, влияние условий и продолжительности культивирования на накопление биомассы.

Кинетику роста исследуемых дрожжей изучали на средах с добавлением глюкозы, мелассы и пивной барде. Проведено по пять серий посевов каждой культуры на каждой из сред.

Рост культуры PhaurI на синтетической среде с глюкозой характеризовался умеренно выраженными фазами роста. Лаг-фаза длилась 48 ч, после чего культура находится в фазе экспоненциального роста, а к 51 ч достигает пика, после чего запас питательных веществ истощается, и количество клеток снижается за счет автолиза, начинается фаза отмирания. На среде с мелассой и стерильной пивной бардой стационарная фаза роста фактически отсутствовала, максимальный прирост клеток наблюдали так же, как и на среде с глюкозой к 51 часу, далее количество клеток снижалось (рис. 22). Следует отметить, что абсолютное количество выросших клеток пивной барде и среде с мелассой, было статистически достоверно большим, чем на среде с глюкозой.

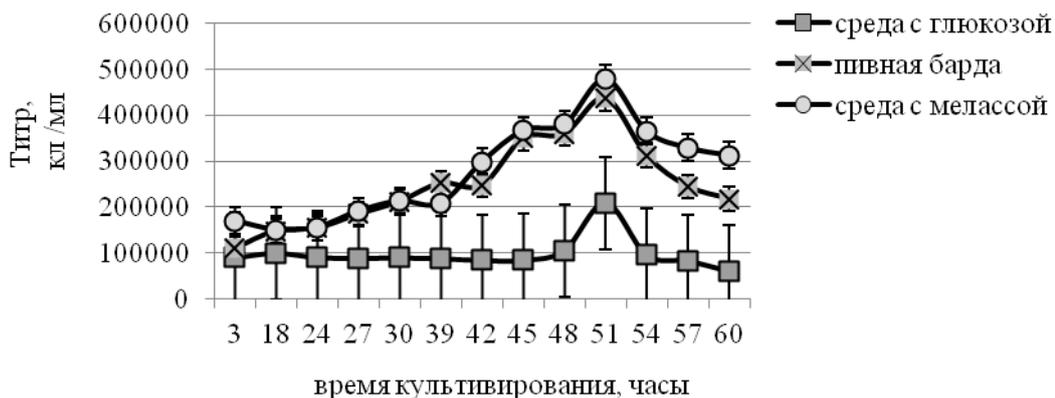


Рисунок 22 – Динамика роста клеток культуры PhaurI

Рост культуры PhaurII на синтетической среде с глюкозой характеризовался отсутствием фазы экспоненциального роста клеток, короткой лаг-фазой (3 часа) и продолжительной стационарной фазой. При росте дрожжевой культуры на среде с мелассой и пивной бардой лаг-фаза была также слабо выражена, однако кривая роста имела вид экспоненты с пиком к 45 ч. К 54 ч. запас питательных веществ истощался, и количество клеток снижалось за счет автолиза - начиналась фаза отмирания (рис. 23), количество выросших КОЕ значительно выше, чем при культивировании на среде с глюкозой.

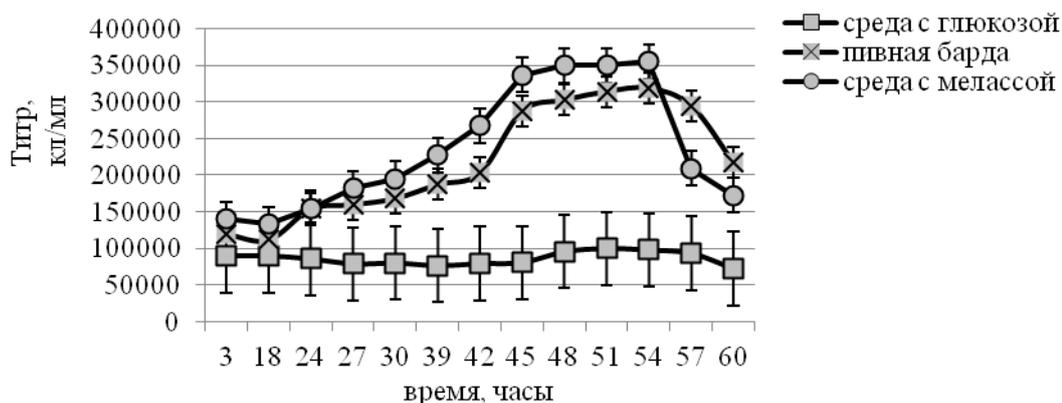


Рисунок 23 – Динамика роста клеток культуры PhaurII

Рост культуры PhaurIII на среде с глюкозой отличается короткой лаг - фазой и отсутствием экспоненциального характера роста. На пивной барде и среде с мелассой лаг-фаза была также непродолжительной, максимальное количество выросших клеток дрожжей фиксировали через 45 и 51 час соответственно (рис. 24).

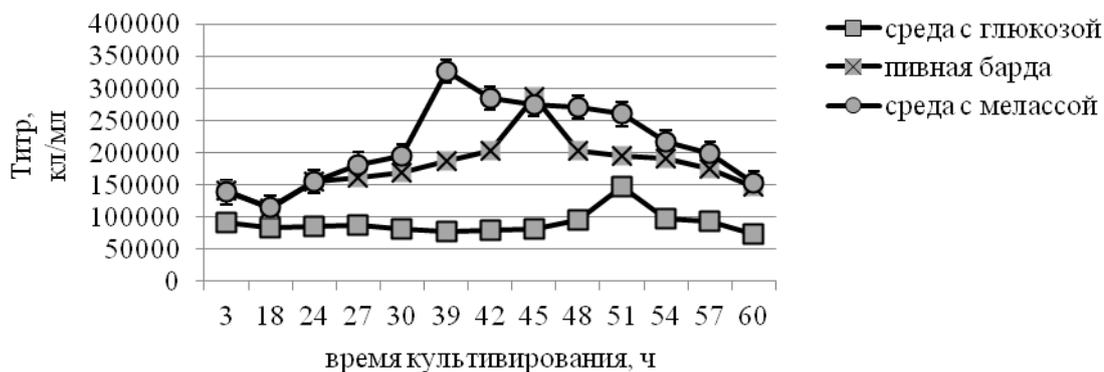
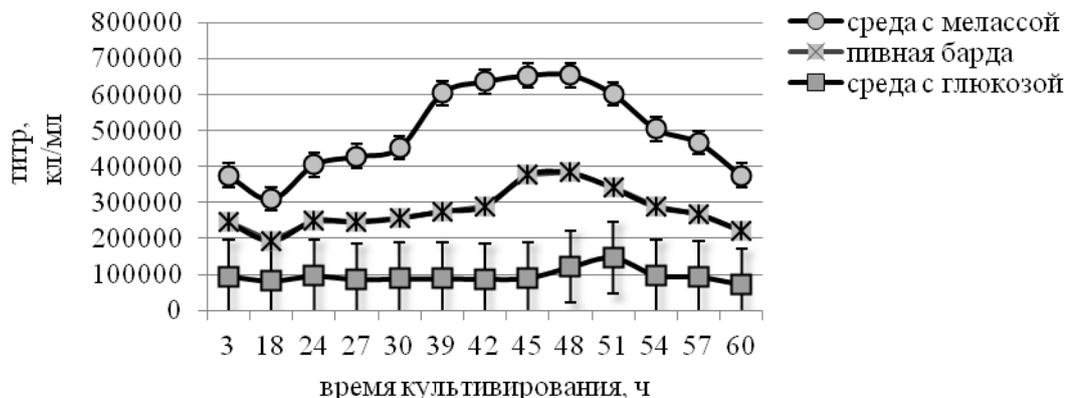


Рисунок 24 – Динамика роста клеток культуры PhaurIII

Рост культуры *L.sulf* на всех средах характеризовался короткой лаг-фазой. На среде с глюкозой отсутствовала экспоненциальная фаза роста клеток. На среде с пивной бардой наблюдали максимальный прирост клеток к 48-51 час, после чего наступала фаза отмирания. На среде с мелассой фиксировали хорошо выраженный экспоненциальный характер роста клеток, значительно превосходящий по интенсивности рост на среде с глюкозой и пивной барде (рис. 25).

Рисунок 25– Динамика роста клеток культуры *L.sulf*

Культура *PhabII* обладал достаточно ярко выраженной фазой экспоненциального роста при культивировании на среде с мелассой и пивной барде. На среде с глюкозой отмечена более различимая фаза стационарного роста клеток. В целом, продуктивность роста на среде с мелассой и пивной барде была выше (рис. 26).

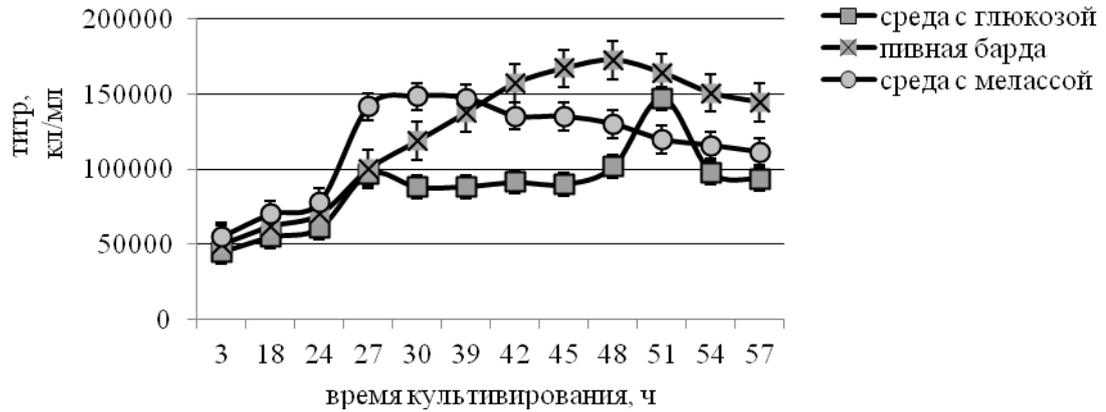


Рисунок 26 – Динамика роста клеток культуры PhabII

Рост культуры PhabV характеризовался непродолжительной лаг-фазой на всех опытных питательных средах. Фаза экспоненциального роста клеток достаточно ярко выражена. В стационарной фазе культура находилась до 57 час, затем наступает фаза отмирания клеток (рис. 27).

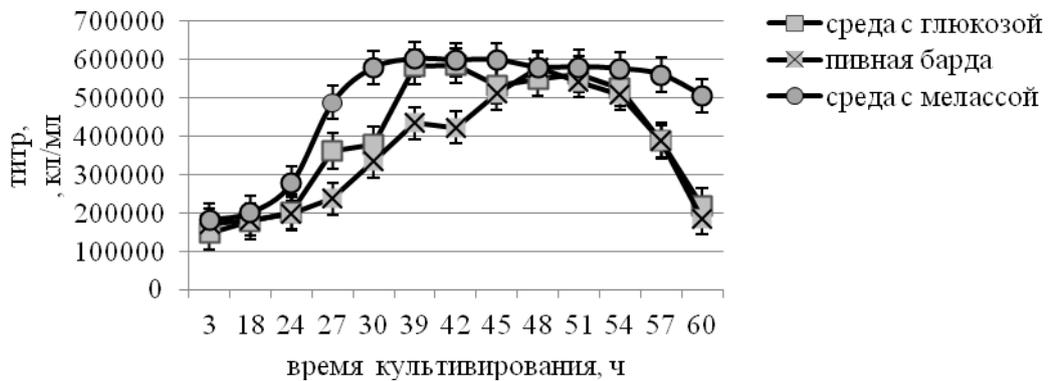


Рисунок 27– Динамика роста клеток культуры PhabV

Рост культуры TrP характеризовался короткой лаг-фазой на всех опытных питательных средах. Достаточно ярко выражена была экспоненциальная фаза и фаза стационарного роста клеток на среде с пивной барде, после чего количество клеток снижалось. Рост на среде с мелассой характеризуется продолжительной стационарной фазой. На среде с глюкозой рост культуры имел экспоненциальный характер (рис. 28).

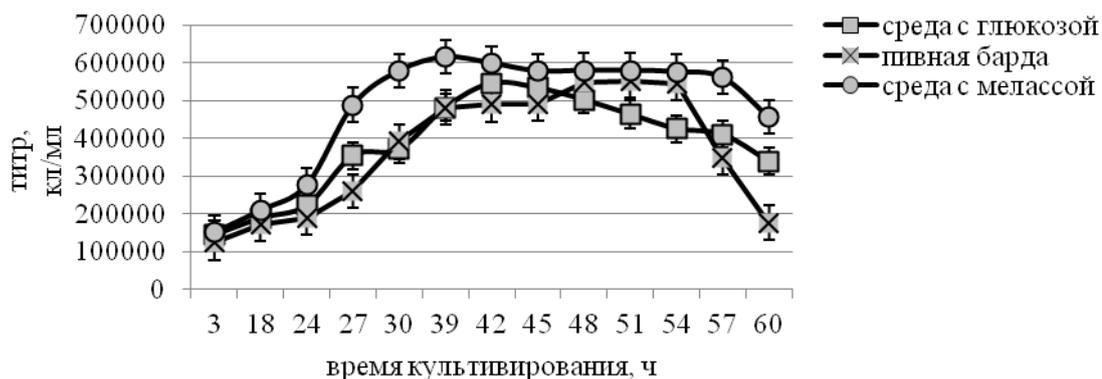


Рисунок 28 – Динамика роста клеток культуры TrP

Для культивирования культуры AgI характерна короткая лаг- фаза на всех опытных питательных средах. На среде с мелассой далее наблюдается интенсивное размножение клеток, достигающее максимума к 48-51 часу культивирования, далее наблюдается незначительное плавное снижение. На среде с пивной бардой характер роста идентичен, однако менее продуктивен (рис. 29).

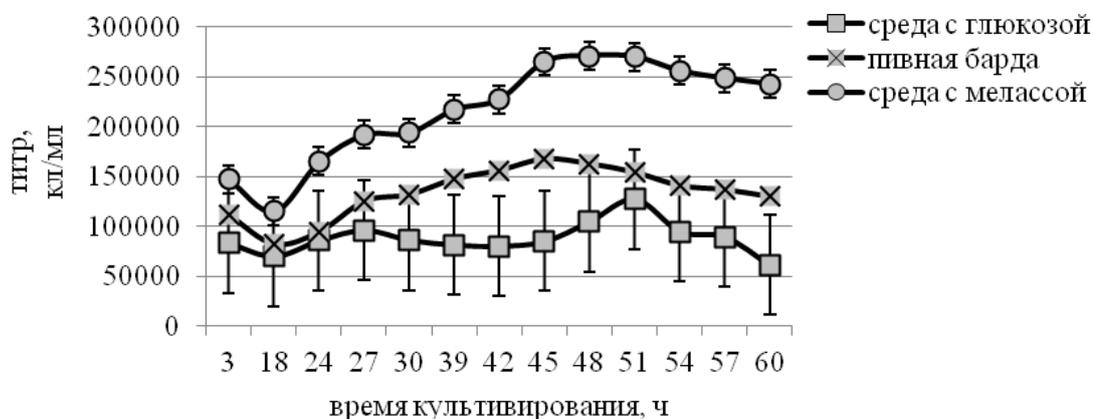


Рисунок 29 – Динамика численности клеток культуры AgI

Рост клеток культуры AgIV на среде с мелассой характеризуется экспоненциальной динамикой, причем четко прослеживается фаза ускорения роста, затем культура вступает в стационарную фазу. На пивной барде экспоненциальная фаза более сглажена, стационарная фаза роста непродолжительна, далее следует фаза отмирания клеток. На среде с

глюкозой характер роста сопоставим с показателями на среде с мелассой, однако продуктивность значительно ниже (рис. 30).

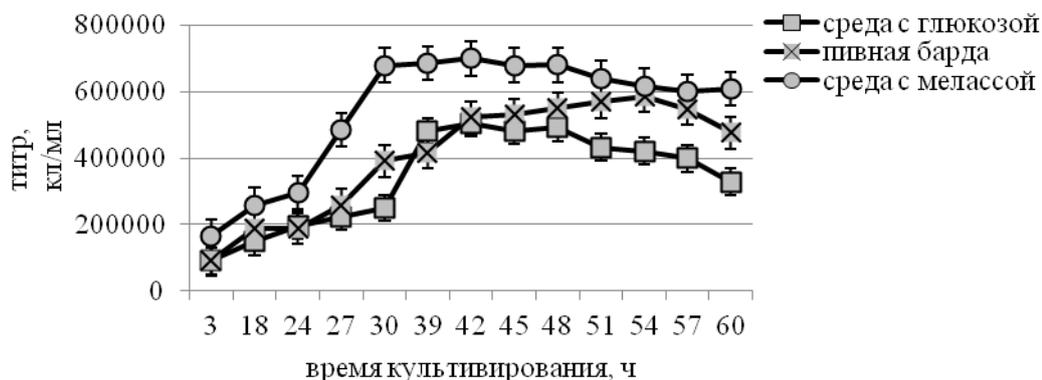


Рисунок 31 – Динамика роста клеток культуры AgIV

Рост культуры FhI на пивной барде и среде с мелассой характеризуется короткой лаг-фазой и фазой экспоненциального роста, за которой следует продолжительная стационарная фаза. На среде с глюкозой культура не имеет четко выраженных фаз роста, за исключением лаг-фазы. Самая высокая интенсивность размножения дрожжей зафиксирована на среде с добавлением мелассы (рис. 32).

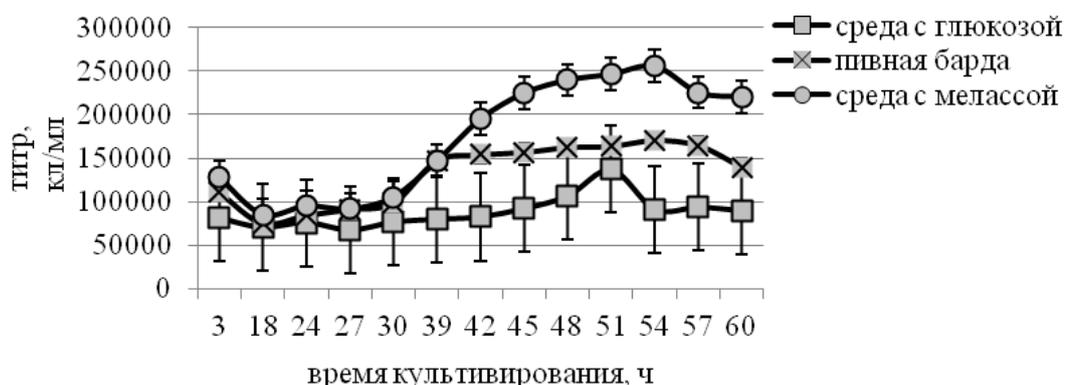


Рисунок 32 – Динамика роста клеток культуры FhI

На всех использованных средах после завершения лаг-фазы, культура CmIII вступала в экспоненциальную фазу. Характер роста культуры был на всех средах сопоставимым, однако на среде с мелассой фазы отмирания за период наблюдения не наблюдали (рис. 33).

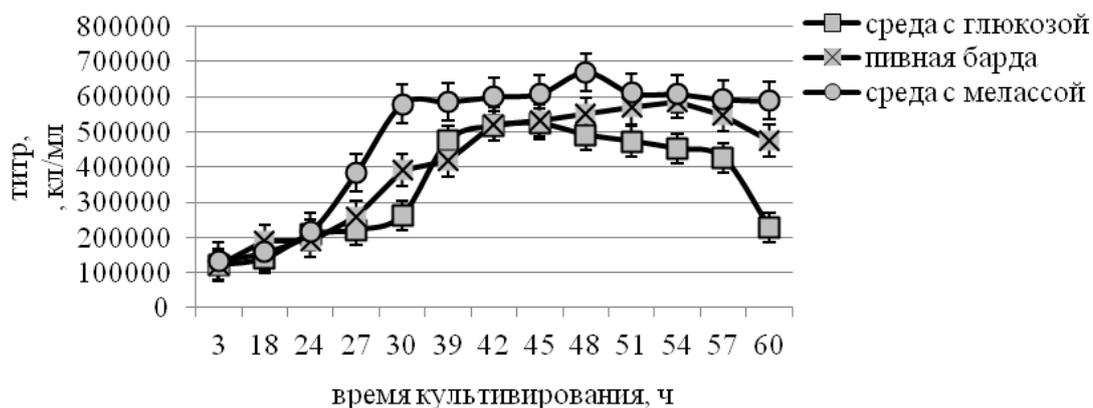


Рисунок 33 – Динамика роста клеток культуры CmIII

При культивировании культуры CmV на всех средах характер роста был идентичным, но на среде с добавлением мелассы продуктивность была несколько выше (рис. 34).

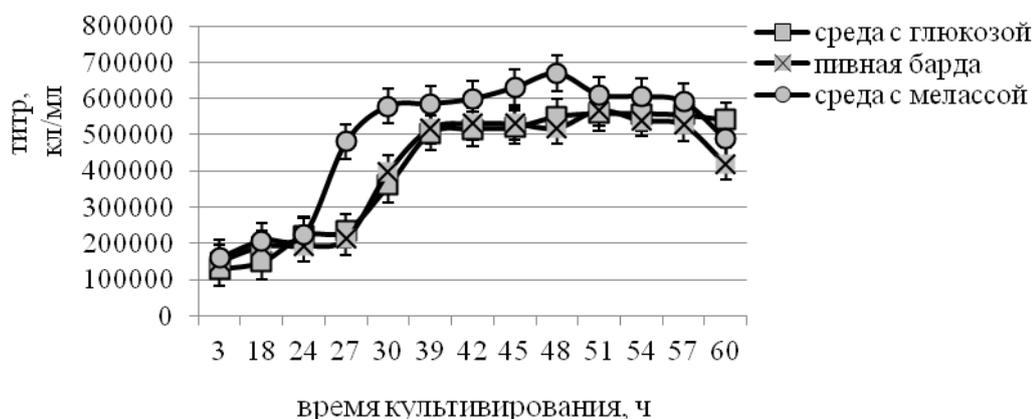


Рисунок 34 – Динамика роста клеток культуры CmV

При культивировании культуры CmVI на среде с глюкозой хорошо выражена стационарная фаза, затем следовал кратковременный подъем, переходящий в фазу отмирания. На других средах рост имел характер экспоненты. При культивировании на пивной барде после достижения пика выявлен интенсивный автолиз, при культивировании на среде с мелассой четко выраженной фазы отмирания не наблюдали (рис.35).

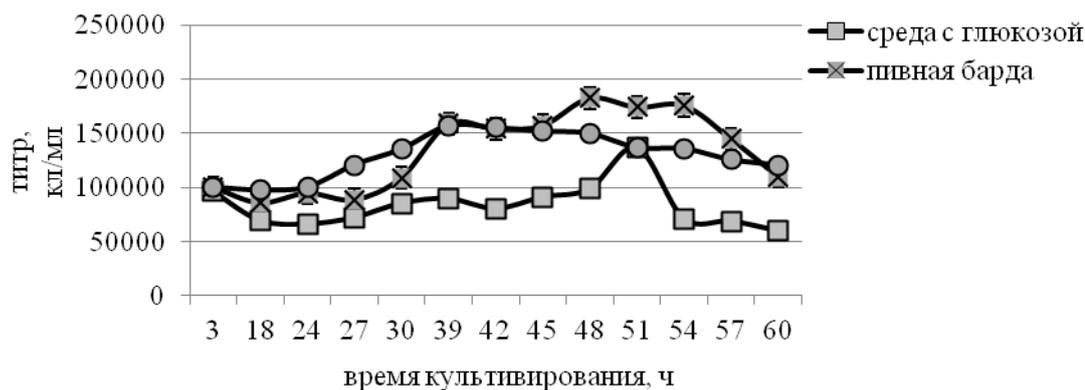


Рисунок 35 – Динамика роста клеток культуры CmVI

Характер роста культуры CmVII был сопоставим на всех опытных средах, однако продуктивность была статистически достоверно выше на среде с мелассой (рис. 36).

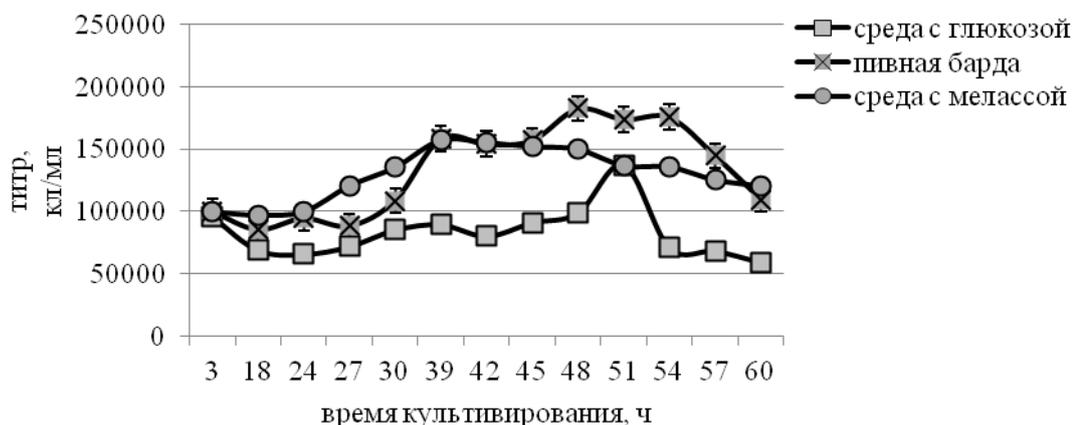


Рисунок 36 – Динамика роста клеток культуры CmVII

Лag-фаза и фаза замедленного роста культуры CmVIII четко выражена при культивировании на всех опытных средах. Экспоненциальная фаза на среде с мелассой более продолжительна. Самая длинная стационарная фаза характерна для пивной барды, на среде с глюкозой максимум переходит в фазу плавного отмирания клеток (рис. 37).

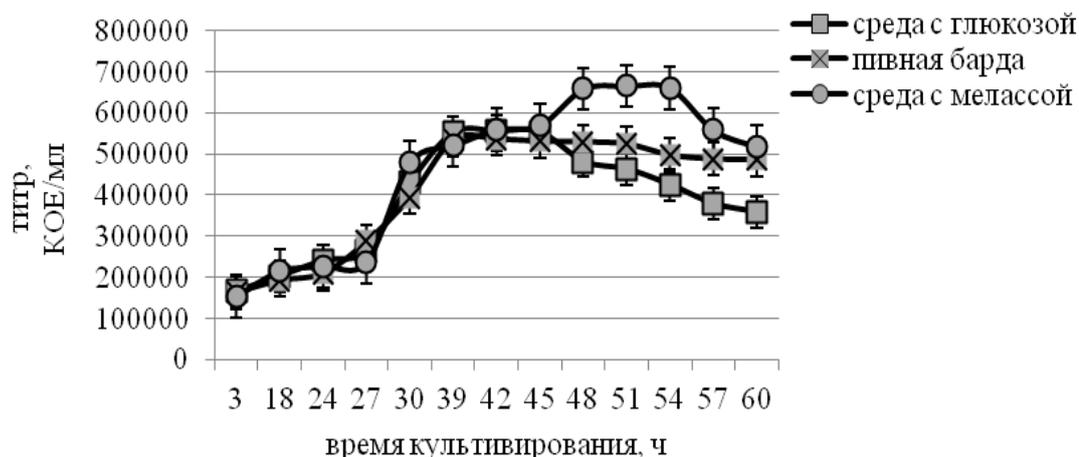


Рисунок 37 – Динамика роста клеток культуры CmVIII

Культура CmIX характеризовалась выраженной экспоненциальной фазой роста на всех опытных средах. Стационарная фаза была более продолжительной на среде с мелассой, на среде с глюкозой и пивной барде она практически отсутствовала. На пивной барде стационарная фаза роста клеток отсутствовала (рис.38).

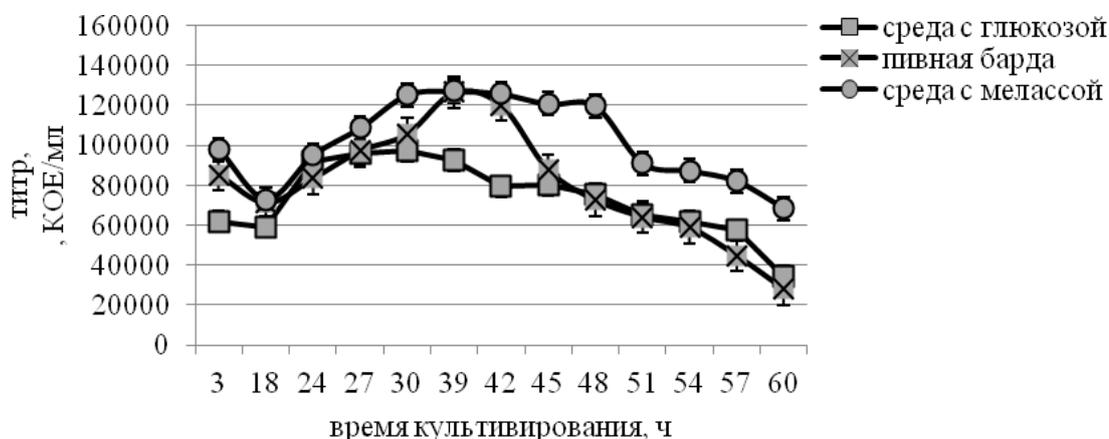


Рисунок 38 – Динамика роста клеток культуры CmIX

Таким образом, исследования показали, что интенсивность роста подавляющего большинства дрожжевых культур выше на среде с мелассой. На данной среде стабильность стационарной фазы обуславливает быстрое наращивание биомассы у культур PhabV, TrP, AgIV, CmIII, CmV, CmVIII. Менее продуктивный рост отмечается на среде с добавлением глюкозы.

3.6.1 Получение маточных культур дрожжей при жидкофазном глубинном культивировании

Для получения маточных культур были выбраны культуры с наибольшим титром клеток: AgIV, TrP, PhabV, CmIII, CmV, CmVIII, их титр превышал концентрацию биомассы контрольного штамма *Candida tropicalis* СК-4-1 (рис. 39).

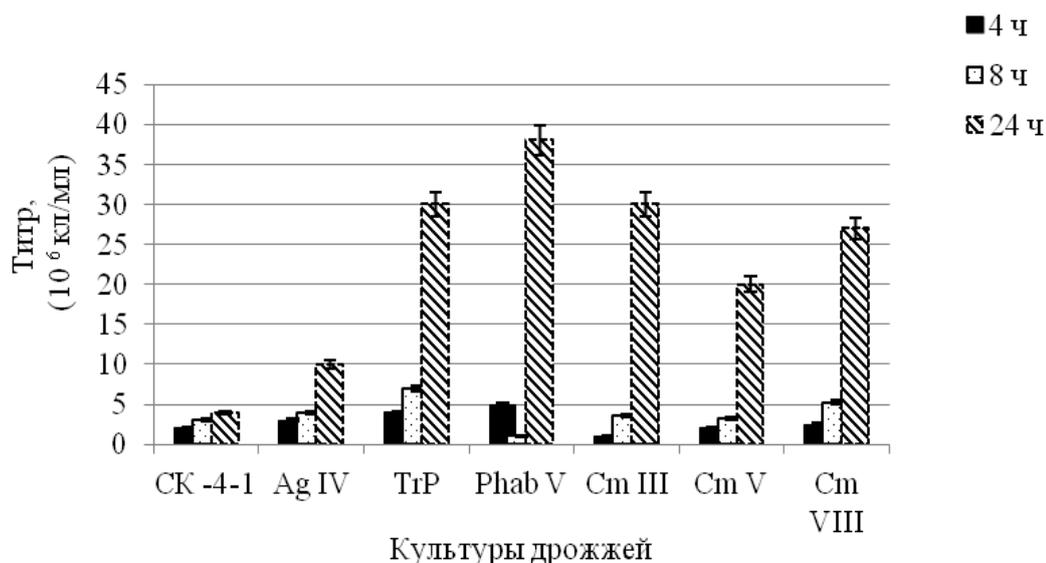


Рисунок 39 – Динамика титра клеток исследуемых дрожжей при получении маточных культур при жидкофазном глубинном культивировании в колбах (10^6 кл/мл).

Установлено, что количество клеток тестируемых культур значительно увеличивается уже через сутки культивирования по сравнению с контрольным штаммом. 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), что соответствует значениям удельной скорости (табл.6).

Таблица 6 – Удельная скорость дрожжевых культур при жидкофазном глубинном культивировании в колбах

Дрожжевые культуры	Удельная скорость, K_p , 1/ч
<i>C. tropicalis</i> СК - 4- 1	0,09
AgIV	0,12
TrP	0,17
PhabV	0,18
CmIII	0,17
CmV	0,15
CmVIII	0,16

3.6.2 Культивирование маточных культур дрожжей при периодическом культивировании в ферментере

Начальная концентрация маточных культур дрожжей перед культивированием биомассы в ферментере составляла для *C. tropicalis* СК - 4-1 - $4,0 \times 10^6$ кл/мл, 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.

Результаты исследований (рис. 40), свидетельствуют, что все культуры дрожжей, за исключением CmIII, способны накапливать биомассу значительно быстрее, чем контрольный штамм. При периодическом культивировании наибольшей накоплением биомассы по сравнению с контрольным штаммом *C. tropicalis* СК -4-1 отличаются PhabV и TrP: уже через 4 часа культивирования количество клеток данных культур более чем на порядок превышало контрольные показатели. Удельная скорость роста исследуемых дрожжевых культур так же превышала значения котрольного штамма, за исключением культур Cm V и Cm VIII, что вероятно связано с более длительным периодом адаптации тестируемых дрожжей в условиях периодического культивирования (табл. 7).

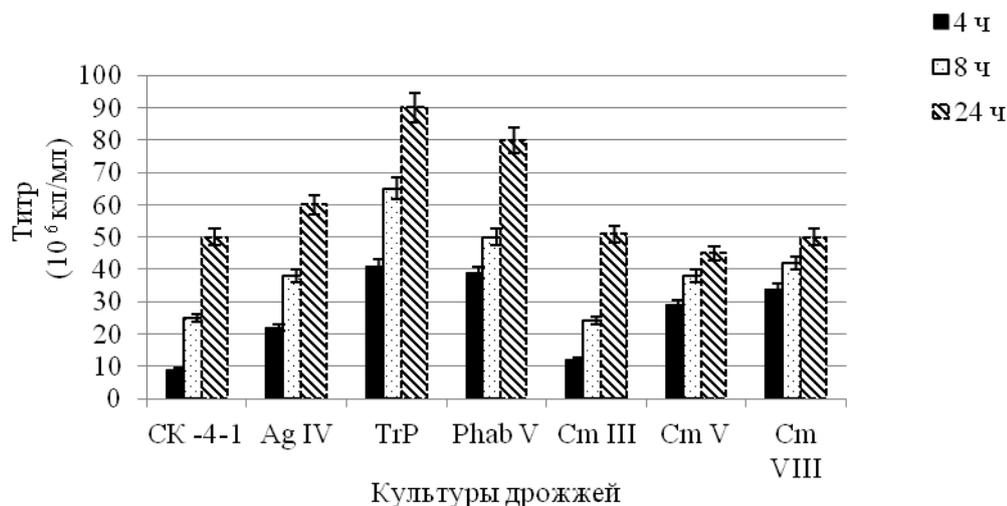


Рисунок 40 – Динамика титра клеток дрожжей при периодическом культивировании в ферментере (10^6 кл/мл).

Таблица 7 – Удельная скорость дрожжевых культур при периодическом культивировании в ферментере

Дрожжевые культуры	Удельная скорость, K_p , 1/ч
<i>C. tropicalis</i> CK-4-1	0,55
AgIV	0,85
TrP	0,96
PhabV	0,98
CmIII	0,68
CmV	0,45
CmVIII	0,15

Таким образом, нами установлено, что при жидкофазном глубинном и периодическом культивировании в ферментере удельная скорость роста большинства исследуемых культур превышает значения контрольного штамма, за исключением штаммов Cm V и Cm VIII.

3.7 Определение показателей качества дрожжевой биомассы

Влажность выпускаемых предприятиями кормовых дрожжей первой, второй, третьей групп должна составлять не более 12,0% (при условии использования их в течение 3 месяцев со дня изготовления) (ГОСТ 20083–74). Нами установлено, что влажность контрольного промышленного штамма

Candida tropicalis CK-4-1 составляет 11,8%; TrP – 8,0%; AgIV – 11,5%; PhabV – 12,4%; CmIII – 9,1%; CmV – 10,2%; CmVIII – 11,4% (рис. 41).

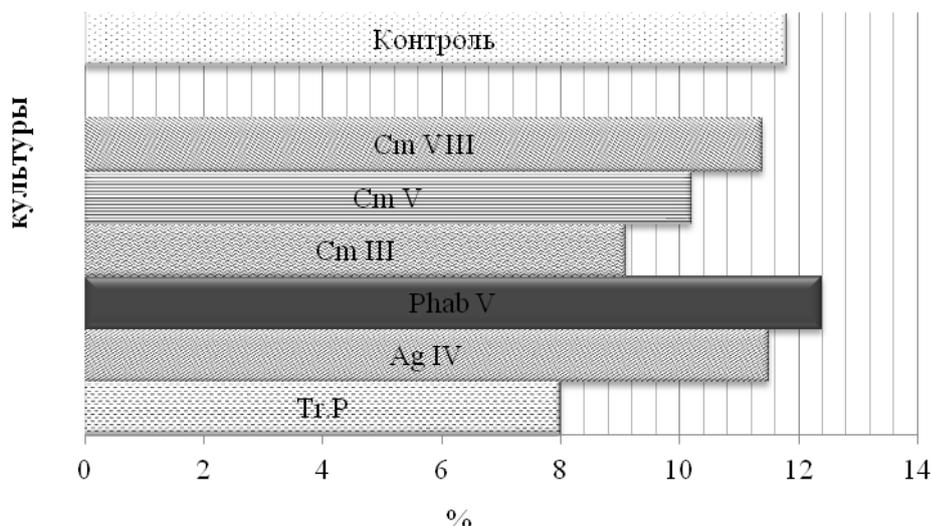


Рисунок 41– Массовая доля влажности

Определение содержания массовой доли золы в образцах сухой биомассы показало, что все исследуемые дрожжевые культуры соответствуют требованиям ГОСТ 20083–74 по данному показателю (не более 10%): *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% (рис. 42).

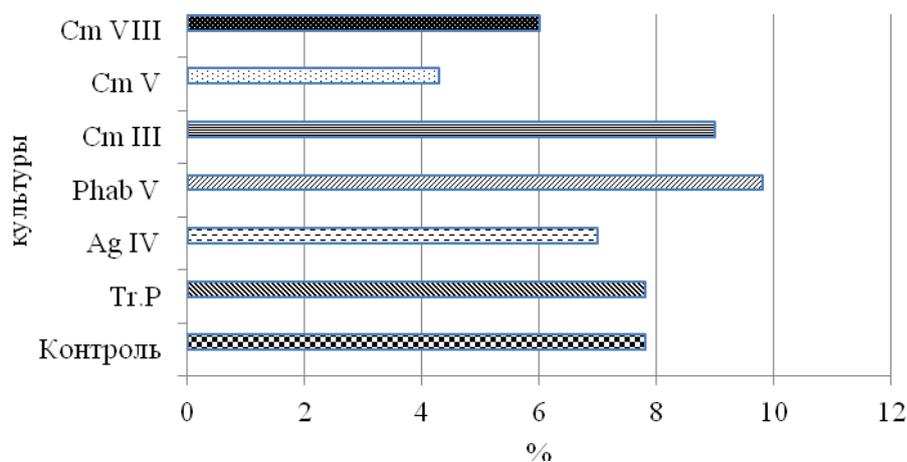


Рисунок 42 – Массовая доля золы (в пересчете на абсолютно сухое вещество)

По содержанию сырого протеина тестируемые культуры, за исключением CmIII – 28,0%, не только превосходили контрольный производственный штамм *C. tropicalis* CK-4-1, но и превышали показатели, устанавливаемые НТД: TrP – 64,9%; AgIV – 67,0 %; PhabV – 73,5%; CmIII – 28,0%; CmV – 89,4%; CmVII – 93,9% (рис. 43).

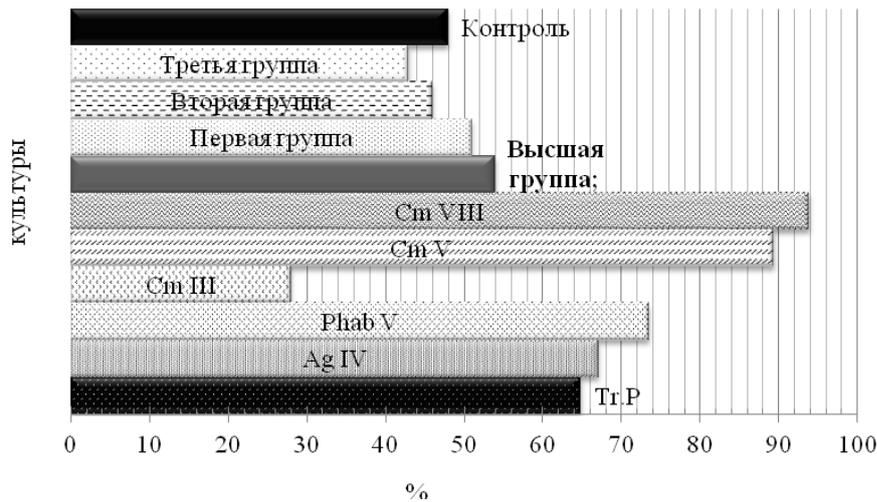


Рисунок 43– Массовая доля сырого протеина (в пересчете на абсолютно сухое вещество)

Таким образом, по результатам исследований микро- и макроморфологических, физиолого-биохимических признаков, кинетики роста и определения показателей дрожжевой биомассы для дальнейших исследований отобраны шесть культур: AgIV, CmVIII, TrP, CmIII, CmV, PhabV.

3.8 Идентификация дрожжевых культур – лидеров

При секвенировании участков 18S ITS–региона рДНК для культуры AgIV получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

```
GAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAATATAGGACGTCCAACSTTAACSTTGGAG
TCCGAACSTCTCACTTTCTAACCCGTGTGCACTTGTTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGA
GAGCGAACSTCSTATTCACTTATAAACACAAAGTSTATGAATGTATTAATTTTATAA
CAAAATAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACSTTGCCTCCATGGTATCCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATGAATACT
```

TCAACCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCC
 TTTACGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGAC
 TTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGACTAGAGCCGGGTTGG
 GTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTAAGATTAGATCTCNAAATCAG
 GTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемая культура принадлежит к следующей систематической группе: *Fungi; Basidiomycota; Rhodotorula; R. mucilaginosa*, причем степень сходства с другими видами составляет 99%.

При секвенировании участков 18S ITS–региона рДНК для культуры CmVIII получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

AAAGTTTTATTTTGTATAAAATTTAATACATTCATAGACTTTGTGTTTATAAG
 TGAATAGGAGTTCGCTCTCTTGCAGAGTACTATCCCAAACAAGTGCACAGGGTTA
 GAAAGTGAGAGTTCGGACTCCAAGTTAAGTTGGACGTCSTATATTCACATAATGATCC
 TTCCGCAGGTTNCCTACGGAA

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемая культура принадлежит к следующей систематической группе: *Fungi; Basidiomycota; Rhodotorula; R. mucilaginosa*, причем степень сходства с другими видами составляет 99%.

При секвенировании участков 18S ITS–региона рДНК для культуры TrP получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTTATAGAAAAAATACTACCAGTA
 TGATTACTTACTTTGCGGCTCGCCGCAAAGTCAAAACTACAAAAATAAAATGTCTAC
 AACCAAAAAATTAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAA
 CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGCCCTTGTGAATCATCGAATCTTT
 GAACGCACATTGCGCCTTGGGGTATTCCCAAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCAGCCC
 CCTCACTCTGTGAAGTGGCTGCTCGCCAGACCAGCCGAAAATATTAGTNTGCATGT
 CTAGGACTACCCATCATGCTCCCTATTTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGC
 TGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемая культура принадлежит к следующей систематической группе: *Fungi; Ascomycota; Saccharomycetales; Candida tanzawaensis*, причем степень сходства с другими видами составляет 99%.

При секвенировании участков 18S ITS–региона рДНК для культуры Cm III получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

GGAAGGATCATTTAAAAATACATTCACATTTGTTTTGCGAACAATAAAATTT
 TTTTATTCGAATTTCTTAATATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATG
 AAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAA

CGCACATTGCGCCTCGAGGCATTCCTCGAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGCATCCCCTCTAA
 CCCCCGGTTAGGCGTTGCTCCGAAATATCAACCGCGCTGTCAAACACGTTTACAGCACGACA
 TTTCGCCCTCNANAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
 AA

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемая культура принадлежит к следующей систематической группе: *Fungi; Metschnikowiaceae; C. lusitaniae*, причем степень сходства с другими видами составляет 99%.

При секвенировании участков 18S ITS–региона рДНК для культуры CmV получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

AGGTCTAAACACATTTTTTTAATGTTAAAACSTTTAACCAATAGTCATGAAAA
 TTTTTAACAAAAATTTAAATCTTCMAAACTTTCAACAACSGATCTCTTGGTTCTCSCA
 ACSATGAAGAACGCAGCGAAATGCSATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAAT
 CATCGAATCTTTGAACSCACATTTGNCMCCCTCTGGTATTCCNGAGGGTATGCCTGTT
 TGAGCGTCATTTNCTNCTCTCAAACSTTCSGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAA
 GGGTTAACTTGAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACYANMTAAGCNAGYCTTTCCN
 AAATAATGTATTANGGTTCTTTCC

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемая культура принадлежит к следующей систематической группе: *Fungi; Saccharomycetales; W. anomalus*, причем степень сходства с другими видами составляет 99%.

При секвенировании участков 18S ITS–региона рДНК для культуры Phab V получена следующая собранная нуклеотидная последовательность:

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAG
 GTCAAACSTTTTAGTTTATTGTTGTTAAGCCGAGCCTAAAATACTTCTAAACCTGCCTA
 GCTGATATAACGAGTTGGAAGAACSTAATACATTTTCAGAAAGACTGCTTATTAG
 TACACTCTTGCTAAGTCAATATTTCAAGTTAACCTTGACAGAGTATCACTCAATAC
 CAAACCCGAAGGTTTGAGAGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATACCCTCTGGAATA
 CCAGAGGGTGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTAC
 AATACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAACCAAGAGATCCGTTG
 TTGAAAGTTTTGAAGATTTTAAATTTTTGTTAAAATTTTCATGACTATTGGTTAAAGG
 TTTTAAACATTAAAAAAATGTGTTTAGACSTTTGGGCAGTAAGCCAGGCTCACCACCCA
 AAGCAAAGTTCAAAAAAATAAGACAATGTGTGTAAGGTTTATCGCCGCGCAATTAAGCGC

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемая культура принадлежит к следующей систематической группе:

Eukaryota, Saccharomycetales, Phaffomycetaceae, Wickerhamomyces, W. anomalus, причем степень сходства с другими видами составляет 99% (табл. 8).

Таблица 8– Результаты анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента 18S ITS–региона рДНК идентифицированных дрожжевых штаммов

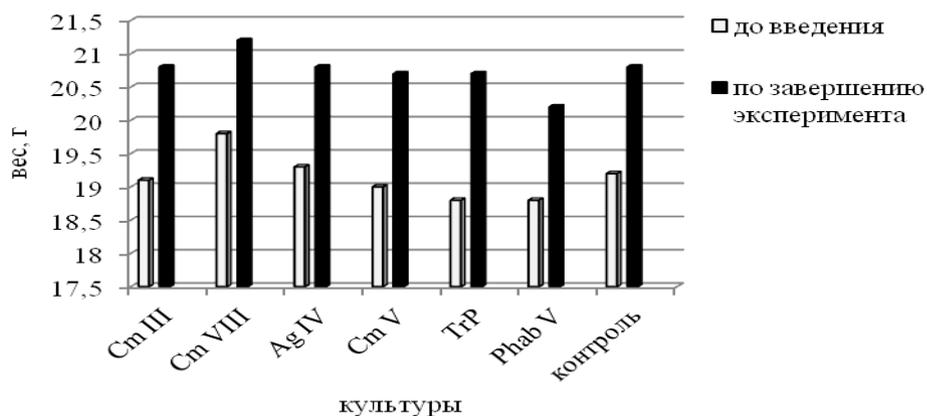
Культура	Систематическая группа	Сходство, %
Ag IV	<i>Fungi; Basidiomycota; Rhodotorula; R. mucilaginosa</i> (рег.номер RCAM05019)	99,0
Cm VIII	<i>Fungi; Basidiomycota; Rhodotorula; R. mucilaginosa</i>	99,0
TrP	<i>Fungi; Ascomycota; Saccharomycetales; C. tanzawaensis</i> (рег.номер RCAM04985)	99,0
Cm III	<i>Fungi; Metschnikowiaceae; C. lusitaniae</i> (рег.номер RCAM04987)	99,0
Cm V	<i>Fungi; Saccharomycetales; W. anomalus</i>	99,0
Phab V	<i>Eukaryota, Saccharomycetales, Phaffomycetaceae, Wickerhamomyces, W. anomalus</i> (рег.номер RCAM04986)	99,0

Идентифицированные штаммы дрожжей депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ (Приложение Г, рисунок Г.1 – Г.4).

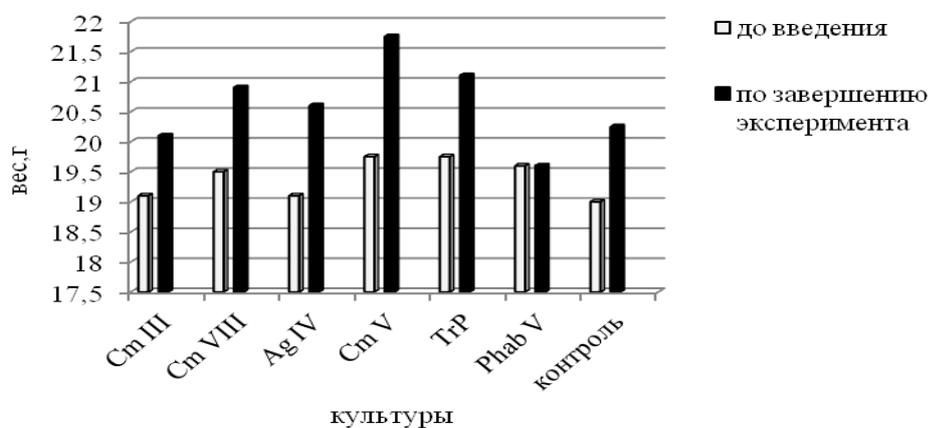
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ

4.1 Исследование острой токсичности

При исследовании острой токсичности дрожжевых суспензий титром 1×10^{10} КОЕ/мышь после проведенного заражения ежедневно следили за состоянием мышей. В течение всего периода наблюдения животные были активны, подвижны, кожные покровы чистые, шерсть без изменений, изменений пищевого поведения не выявлено. Реакции на действия экспериментаторов были адекватными. Ни в одной из групп падежа животных не наблюдали. В каждой из групп за период эксперимента мыши прибавили в весе (рис.44 - 45).



А



б

Рисунок 44 – Динамика веса мышей, получавших суспензии дрожжей (1×10^{10} КОЕ/мышь): а – *per os*, б – внутривенно

Таким образом, введенные дрожжевые суспензии не оказывали негативного влияния на организм мышей, что свидетельствовало об отсутствии у них токсичности.

4.2 Исследование вирулентности и диссеминации

При исследовании вирулентности и диссеминации дрожжевых суспензий титром $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мышь после проведенного заражения осуществляли ежедневный мониторинг за внешним видом животных и их поведением. В течение всего эксперимента поведение животных не менялось, изменений кожных покровов, слизистой не наблюдали. Активность, поведенческие и пищевые реакции оставались без изменения. Снижение веса и гибели животных не отмечалось (рис.46).

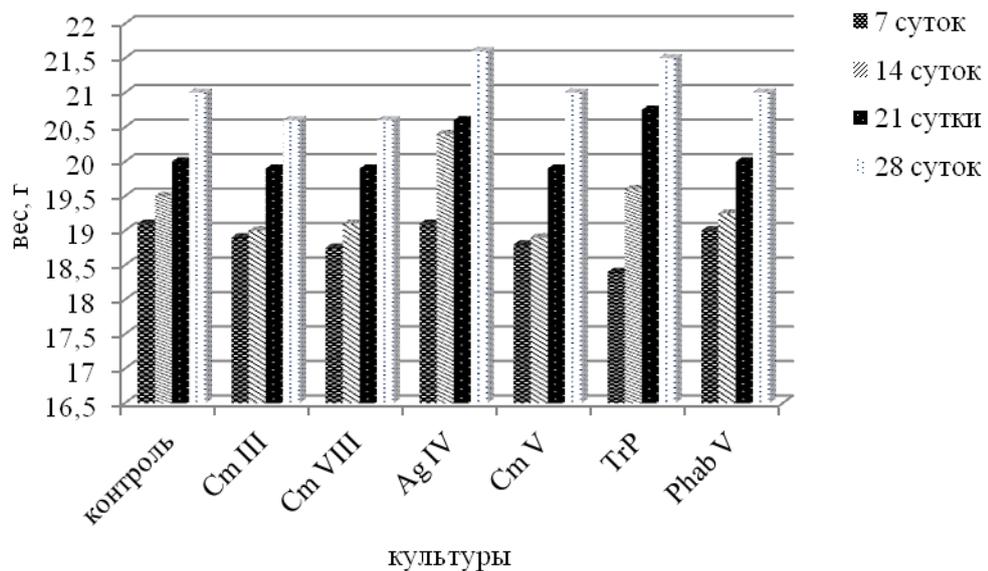


Рисунок 46 – Динамика веса мышей при исследовании вирулентности и диссеминации ($1,0 \times 10^7$ КОЕ/мышь)

Через 7, 14, 21 и 28 суток с начала эксперимента, согласно дизайну исследования, провели забой 2-х особей из каждой группы. Забой животных осуществляли под хлороформным наркозом. На вскрытии поверхность внутренних органов гладкая, без видимой патологии, нормальной окраски, плотной структуры.

При исследовании отпечатков внутренних органов мышей выявлены дрожжевые колонии с нехарактерными для исследуемых культур морфологическими признаками, локализованные в органах преимущественно контрольной группы животных (Приложение Б, табл. 1). В посевах крови у мышей, забранной в контрольные сроки эксперимента, микроорганизмов не выявлено.

4.3 Исследование токсигенности

При исследовании токсигенности после введения фильтратов дрожжевых суспензий поведение и внешний вид животных отслеживали ежедневно. Гибели животных не отмечено ни в одной из опытных групп. Поведение адекватное, потребление пищи и воды активное. Изменений кожных покровов и слизистых не выявлено. Шерстяной покров оставался гладким и блестящим. У всех без исключения, мышей наблюдали прибавку в весе (Приложение Б, табл. 2 - 3). Данные, полученные в ходе исследования, свидетельствовали об отсутствии токсического влияния фильтратов, как 3-х, так и 7-и суточных изучаемых дрожжевых культур.

Таким образом, комплексное исследование токсичности, вирулентности, диссеминации, токсигенности исследуемых дрожжевых культур свидетельствует об их безопасности для живых организмов.

Глава 5. ПРИМЕНЕНИЕ БИОМАССЫ ЖИВЫХ И АВТОЛИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ В КАЧЕСТВЕ БИОДОБАВКИ К АКВАРИУМНЫМ КОРМАМ

Сухую биомассу «живых» и автолизированных исследуемых штаммов, перемешанную с контрольными кормами в соотношении 25%, 50% и 75% к стандартному рациону скармливали 84 трехнедельным малькам гуппи (*P. reticulata*) средней массой 15,98 - 16,03 мг и длиной 10,93 - 11,12 мм. На протяжении эксперимента отклонений в поведении рыб не наблюдали. Гуппи активно двигались, поедали корм, изучали пространство аквариумов, реагировали на звук и приближение к стенке аквариума.

В ходе эксперимента установлено (Приложение В, табл. 4- 5), что при добавлении биомассы живых клеток дрожжей AgIV и PhabV к контрольным кормам, показатели массы и длины тела рыбок у опытных групп № 1,3,5,6, не отличались от таковых в контрольных группах. Прирост массы и длины тела рыб был более выражен у особей при добавлении в корм автолизата дрожжей ($m_{cp}=75,6\pm 0,4$, $l_{cp}=26\pm 0,2$) по сравнению с идентичными группами рыб, получавших живые клетки ($m_{cp}=64\pm 0,2$, $l_{cp}=25\pm 0,08$). При этом менее существенная разница между показателями длины и веса в опытных и контрольных группах установлена при кормлении рыбок экспериментальными кормами, содержащими биомассу живых клеток культуры TrP,a наибольшие значения данных показателей отмечены в опытной группе 4 А на 35- е сутки эксперимента (Приложение В, табл. 6).

При добавлении в диету биомассы живых и автолизированных клеток культуры CmIII максимальные значения длины ($l_{cp}=21,8\pm 0,2$; $l_{cp}=20,7\pm 0,2$; $l_{cp}=22,1\pm 0,3$) и веса ($m_{cp}=56,9\pm 0,3$; $m_{cp}=62\pm 0,6$; $m_{cp}=57,5\pm 0,5$) характерны для опытных групп 3 А, 5 А, 6А соответственно (Приложение В, табл. 7).

Как видно из данных, представленных в таблицах 8 - 9, при кормлении гуппи диетой, обогащенной биомассой живых и автолизированных клеток

культур CmV и CmVIII, исследуемые характеристики в контрольных и опытных группах были практически идентичными.

Исследование показателей удельной скорости роста и увеличения веса рыбок при добавлении в контрольные корма биомассы живых и автолизированных клеток дрожжей отличались разнообразием.

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. 47). 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. 48). 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»).

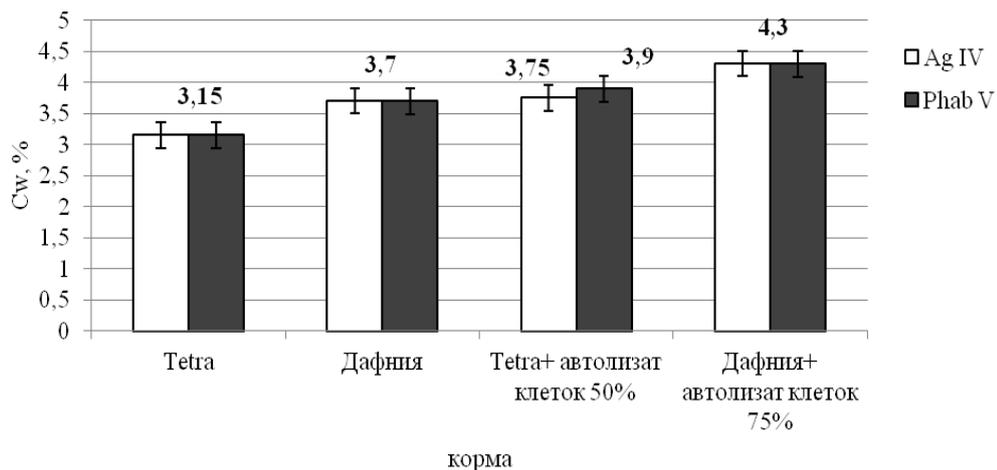


Рисунок 47 - Средние показатели удельной скорости роста группы *P. reticulata* при добавлении биомассы автолизированных клеток штаммов *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalus* PhabV к контрольным кормам

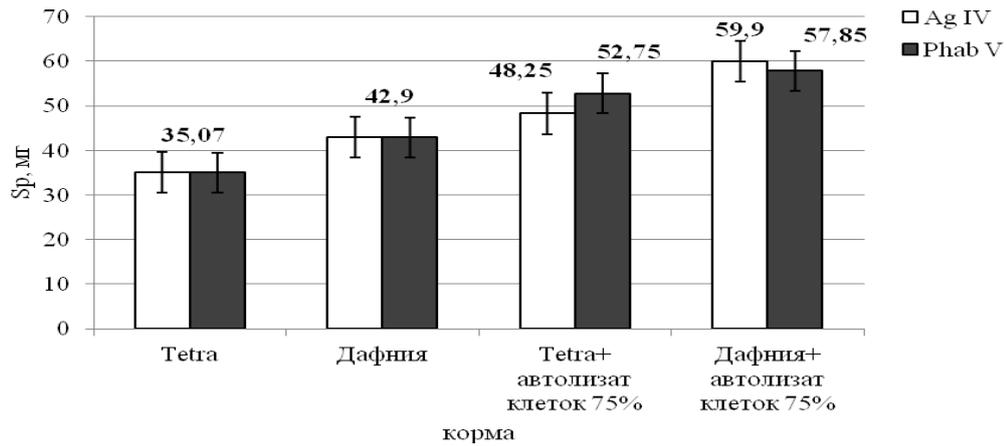


Рисунок 48 - Средние показатели увеличения веса группы *P. reticulata* при добавлении биомассы автолизированных клеток штаммов *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalus* PhabV к контрольным кормам

Данные показатели при добавлении в корма биомассы, как живых, так и автолизированных клеток штаммов *C. tanzawaensis*, *C. lusitaniae*, *W. anomalus* практически аналогичны таковым при кормлении кормом «Tetra» и незначительно уменьшались по сравнению с данными во второй контрольной группе («Дафния»).

При добавлении в корма биомассы, как живых, так и автолизированных клеток дрожжей TrP (3,0–3,15%), Cm III (3,5–3,9 %), CmV (3,0–3,7%), CmVIII (3,7–4,0%) исследуемые показатели были практически аналогичными таковым при кормлении «Tetra» и незначительно уменьшались по сравнению с данными во второй контрольной группе («Дафния») (Приложение В, табл. 10).

Таким образом, полученные результаты наглядно свидетельствуют об эффективности биодобавок из автолизированных клеток дрожжей, особенно культур *R. mucilaginosa* и *W. anomalus*, о чем свидетельствуют преимущества показателей удельной скорости роста и увеличении веса рыб по сравнению с таковыми при кормлении контрольными кормами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Потребности промышленного производства делают актуальным поиск новых источников белкового сырья. Значимым направлением для решения данной задачи остается разработка путей получения кормового белка, в том числе, путем микробного синтеза [9, 245]. Благодаря широкому распространению дрожжевых организмов в природе, актуальным направлением является поиск новых перспективных штаммов для получения белковых продуктов. Вследствие этого наблюдается растущий интерес к изучению различных экологических местообитаний с целью выявления источников дрожжей [62,127, 150].

Особое внимание уделяется перспективам использования дрожжей и дрожжевых продуктов в современной биотехнологии. Благодаря устойчивости к инфекциям и способности к быстрому росту на огромном количестве дешевых субстратов, включая отходы сельского хозяйства и пищевой промышленности, дрожжи популярны как богатые источники белка, минералов, витаминов группы В и других питательных веществ для человека и животных. Остро стоит вопрос изучения различных потенциальных источников белка, которые могут использоваться в качестве кормовой составляющей.

В аквакультуре в качестве источника питательных веществ и биологически активных соединений применяются автолизаты и гидролизаты дрожжей. Иммуностимулирующие соединения, такие как β -глюканы, нуклеиновые кислоты, а также маннанные олигосахариды усиливают иммунные реакции и устойчивость к стрептококковой инфекции у рыб [160]. Дрожжи также востребованы в сфере разработки микробиологических питательных сред. Дрожжевые автолизаты и экстракты в качестве источников витаминов и ростовых добавок находят применение при культивировании микроорганизмов различных физиологических групп.

Учитывая перспективность данного направления, нами предпринята попытка поиска новых перспективных источников получения белкового сырья. С поверхности высших грибов: фоллиота (*P. abstrouse*), шампиньон (*Agaricus* sp.), рядовка (*Tricholoma* sp.), чешуйчатка (*P. aurivellus*), трутовик (*L. sulfareus*), печеночница обыкновенная (*F. hepatica*), навозник мерцающий (*C. micaceus*), произрастающих в северной части территории Астраханской области (с. Садовое, Ахтубинский район) в чистые культуры были выделены 16 культур дрожжей. Исследование культурально - морфологических и физиолого - биохимических признаков выделенных культур показало их принадлежность к аскомицетовым дрожжам.

Установлено, что оптимальной для роста всех дрожжей являлась температура 20-25 °С, практически все культуры сбраживают мальтозу, лактозу, галактозу, глюкозу, сахарозу и раффинозу, а основным и главным источником питания являлся углерод. Все культуры показали способность к синтезу рибофлавина. Интенсивный рост подавляющего большинства культур выявлен на среде с мелассой; менее продуктивный рост отмечался при добавлении в среду глюкозы. По результатам изучения культурально - морфологических и физиолого - биохимических свойств были отобраны шесть культур – лидеров для получения маточных культур с целью дальнейшего культивирования в условиях модельного эксперимента, которые по показателям качества биомассы согласно ГОСТ20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия» демонстрировали преимущество в сравнении с контрольным промышленным штаммом *C. tropicalis* CK-4-1.

С помощью метода определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента ITS–региона проведена идентификация выбранных шести культур – лидеров, относящихся к 4 родам: *R. mucilaginosa*, *C. lusitaniae*, *W. anomalus*, *C. tanzawaensis*.

Идентифицированные штаммы дрожжей депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ.

С целью возможного использования в биотехнологической практике исследована безопасность новых дрожжевых культур.

Исследование острой токсичности идентифицированных штаммов дрожжей проведено на мышах Balb/c. Во время эксперимента гибели животных не отмечено. Поведение, пищевые рефлексы животных оставались адекватным. Изменений кожных покровов и слизистых не наблюдали. Шерстяной покров был гладким и блестящим. Не выявлено каких-либо изменений в поведении и внешних характеристик животных при изучении вирулентности, диссеминации и токсигенности исследуемых культур. Посев отпечатков органов и крови животных показал отсутствие в них изучаемых штаммов. Патологических изменений в органах также не обнаружено. Таким образом, полученные результаты наглядно свидетельствуют, что выделенные и задепонированные штаммы безопасны для живых организмов.

В настоящее время остро стоит вопрос изучения различных потенциальных источников белка, которые могут использоваться в качестве кормовой составляющей.

В этой связи важным направлением исследования дрожжевых культур является их разработка в качестве не только источника белка, но и ряда биологически активных компонентов, таких, как маннанные олигосахариды в стенках дрожжевых клеток, которые предотвращают рост патогенных микроорганизмов, дрожжевые нуклеотиды, обеспечивающие повышенную устойчивость к вирусным, бактериальным и паразитарным инфекциям.

Исследование возможности использования живых и автолизированных клеток дрожжевых штаммов в качестве добавки для аквариумных кормов осуществляли на 84-х трехнедельных мальках гуппи (*P. reticulata*) средней массой 15,98 -16,03 мг и длиной 10,93 - 11,12 мм.

При применении, как живых, так и автолизированных клеток идентифицированных штаммов дрожжей – лидеров в качестве добавки к аквариумным кормам у рыбок наблюдали прибавление массы и увеличение длины. Наблюдаемые показатели не только не уступали показателям в контрольных группах, но в условиях применения автолизированных дрожжей превосходили их, особенно при применении клеток штаммов *R. mucilaginosa* AgIV и *W. anomalus* PhabV.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования разрабатываемых дрожжевых штаммов в качестве добавки для аквариумных кормов.

Известно, что успешная исследовательская и производственная работа микробиологов обеспечивается качественными питательными средами, в производстве которых актуальна проблема замены дорогостоящего мясного сырья на альтернативное, экономически выгодное, стандартное и доступное растительное сырье. При этом существенное значение для оценки их качества и стандартизации имеют физико-химические свойства питательных основ для их приготовления [57]. Оптимальный состав питательной среды обеспечивает жизнеспособность посевного материала, стимулирует рост, накопление, выделение и сохранение микроорганизмов, влияет на синтез целевого продукта [107].

Ранее в производстве питательных сред в России кроме прочих использовали гидролизат кормовых дрожжей. С прекращением промышленного производства кормовых дрожжей приостановилось и изготовление соответствующего гидролизата. Несмотря на универсальность и преимущества методов получения мясных, рыбных и казеиновых гидролизатов, возникла необходимость использования альтернативных источников сырья, что связано с возможным загрязнением продуктов животного происхождения антибиотиками, нитратами, химикатами, что отрицательно влияет на культивирование микроорганизмов [104].

Таким образом, перспективным направлением в области разработки микробиологических питательных сред остается поиск сырьевой базы для получения белковых гидролизатов, не уступающих мясным по биологическим свойствам [46].

Таким образом, с поверхности высших грибов фотиота (*P. abstrouse*), шампиньон (*Agaricus* sp.), рядовка (*Tricholoma* sp.), чешуйчатка (*P. aurivellus*), трутовик (*L. sulfareus*), печеночница обыкновенная (*F. hepatica*), навозник мерцающий (*C. micaceus*), произрастающих в северной части территории Астраханской области (с. Садовое, Ахтубинский район) выделены культуры, исследование культурально-морфологических и физиолого - биохимических признаков которых показало их принадлежность к аскомицетовым дрожжам. Проведена идентификация 6 культур – лидеров, относящихся к 4 родам: *R. mucilaginosa*, *C. lusitaniae*, *W. anomalus*, *C. tanzawaensis*. Идентифицированные культуры дрожжей депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Пушкин).

Идентифицированные культуры дрожжей, как показывают исследование их острой токсичности, вирулентности, диссеминации и токсигенности, безопасны для живых организмов.

Исследование возможности использования живых и автолизированных клеток дрожжевых штаммов в качестве добавки для аквариумных кормов наглядно показывают, что их автолизаты по эффективности не уступают стандартным кормам, а в ряде случаев превосходят их, что свидетельствует об их перспективности для дальнейшей разработки. Установлена перспективность автолизатов дрожжей, на примере *Rhodotorula mucilaginosa* AgIV, который апробирован в качестве составе комбикорма для кормления

тиляпии (*Tilapia*) и гуппи (*Poecilia*) на базе Инновационного центра «Биоаквапарк – НТЦ Аквакультуры», г. Астрахань.

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 *S. micaceus*) выделены изоляты дрожжей *R. mucilaginosa*, *C. tanzawaensis*, *C. lusitaniae*, *W. anomalus*.

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. anomalus* PhabV, *W. anomalus* Cm V.

4. Штаммы *R. mucilaginosa* AgIV, *C. tanzawaensis* TrP, *C. lusitaniae* CmIII, *W. anomalus* PhabV демонстрируют преимущество по показателям качества биомассы в сравнении с контрольным промышленным штаммом *S. tropicalis* CK-4-1 согласно ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия» (массовая доля влажности: *S. 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: *S. 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: *S. tropicalis* CK 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 тиляпии (*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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллабекова, Д.А. Виноградное растение как местообитание дрожжевых грибов / Д.А. Абдуллабекова, Е.С. Магомедова, Г.Г. Магомедов, Р.З. Гасанов, Д.А. Аливердиева. Труды XIV Съезда Русского ботанического общества и конференции «Ботаника в современном мире». – Т. 3. – 2018. – С. 88–90.
2. Абдусамиев, Ф. Т. Вариант комплексной переработки отходов сельскохозяйственных предприятий / О.А. Ковалева, В.И. Крюков, М.В. Яркина // Продовольственная безопасность: от зависимости к самостоятельности. – 2017. – С. 12–14.
3. Абросимова, К. С. Изменение микрофлоры кишечника молоди *Acipenser ruthenus* L. при тимпании / К.С. Абросимова. Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России: материалы Международной научной конференции. - 2014. – С.295 –298.
4. Агеева, Н.М. Исследование состава микрофлоры винограда с целью идентификации природных популяций *Saccharomyces cerevisiae* / Н.М. Агеева, А.И. Насонов, А.В. Прах, И.И. Супрун // Вестник АПК Ставрополя. – 2017. – №. 1. – С. 115-119.
5. Агеева, Н. М. Видовое многообразие микрофлоры на ягодах винограда / Н.М. Агеева, И.И. Супрун, А.В. Прах // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 111 (07). – С. 1-10.
6. Аленкина, Т.В. Оптимизация стадии репродукции в технологии производства бактериофага диагностического чумного Л-413С / Т.В. Аленкина, О.С. Зинина, М.В. Антонычева, Н.И. Вахрушина, А.К. Никифоров // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – №. 2. – С. 79–82.

7. Алехин, Ю.Н. Перспективы использования высушенных пивных дрожжей и кормов на их основе в животноводстве / Ю.Н. Алехин, Т.И. Елизарова, Б.П. Лазарев // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК–продукты здорового питания. – 2014. – №. 2. – С. 7–12.
8. Логвинова, Т. И. Изучение свойств штаммов дрожжей, в качестве микробиологических продуцентов кормового белка / Т.И Логвинова, Е. Н. Колодина, О.А. Артемьева, Д.А. Никанова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – №. 12–1. – С. 57-61.
9. Артюхова, С. И. Биотехнология новых форм каротиноидных препаратов на основе микробного синтеза / С.И. Артюхова, Г.И. Бондарева // Россия молодая: передовые технологии – в промышленность – 2013. – №. 3. – С. 4–6.
10. Бабурина, М. И. Влияние кормовой добавки на основе биомассы пивных дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis* на скорость формирования и качественный состав мясного сырья / М.И. Бабурина, А.Н. Иванкин, Н.А. Горбунова // Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции. – 2018. – С. 340– 345.
11. Бабьева, И. П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И.П. Бабьева, В.И. Голубев. – М: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
12. Бабьева, И. П. Биология дрожжей / И.П. Бабьева, И.Ю. Чернов. – М: Товарищество науч. изд. КМК, 2004. – 239 с.
13. Базлов, Г. В. Конструирование питательных сред на основе дрожжевого автолизата пекарских дрожжей для культивирования холерного вибриона в производстве вакцины холерной бивалентной химической таблетированной / Г.В. Базлов, Н.Г. Авдеева, А.К. Никифоров // Вестник Саратовского государственного университета. - № 3. – Саратов, 2012. – С.7 – 10.

14. Банницына, Т.Е. Дрожжи в современной биотехнологии / Т.Е. Банницына, А.В. Канарский, А.В. Щербаков, В.К. Чеботарь, Е.И. Кипрушкина // Вестник Международной академии холода. – 2016. – №. 1. – С. 24 – 29.
15. Байнович, Б. Альтернативы мясному белку / Б. Байнович, У. Биндрич, А. Мэтис, Х. Фолькер // Все о мясе. – 2012. – №. 6. – С. 34 – 37.
16. Богомоллов, В. В. Технологические аспекты получения новых кормовых продуктов/ В.В. Богомоллов // Генетика и разведение животных. – 2016. – №. 3. – С. 35–40.
17. Бондарева, Г. И. Получения триптофана с использованием биотехнологии / Г.И.Бондарева, С.И. Артюхова //Динамика систем, механизмов и машин. – 2012. – №. 5. – С. 99 –102.
18. Буряченко, С. В. Молекулярная генетика дрожжей – сахаромикетов /С.В. Лабинская. – LambertAcademicPublishing, 2016 – 72 с.
19. Волкова, Г. С. Биотехнологические аспекты получения биопрепаратов, обогащенных биологически ценными компонентами растительного сырья / Г.С. Волкова, Н.А. Фурсова, Е.Н. Соколова, Е.А. Борщева, Л.В. Римарева //Аспирант. – 2017. – №. 1. – С. 72–76.
20. Воронина, Е. Ю. Численность почвообитающих бактерий и микромикетов в ризосфере, микоризосфере и гифосфере симбиотрофных базидиомикетов / Е.Ю. Воронина //Микология и фитопатология. – 2009. – Т. 43. – №. 5. – С. 398–406.
21. Воронина, Е.Ю. Численность и структура сапротрофного бактериального комплекса микоризосферы и гифосферы базидиомикетов-симбиотрофов / Е.Ю. Воронина, Л.В. Лысак, Ю.А. Загрядская //Известия российской академии наук. Серия биологическая. – 2011. – №. 6. – С. 725–732.
22. Воронина, Н. С. Переработка глицерина, полученного в результате производства биодизеля, с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Н.С. Воронина, И.А. Пермякова, В.В. Вольхин //Вестник Пермского национального исследовательского политехнического

- университета. Химическая технология и биотехнология. – 2017. – №. 4. – С.67–78.
23. Гармаш, С. Н. Биотрансформация целлюлозосодержащих отходов с целью получения этанола / С.Н. Гармаш // Вопросы химии и химической технологии. – 2013. – №. 5. – С. 17– 22.
24. Гармаш, С. Н. Биоконверсия отходов аграрного сектора экономики с целью получения биоэтанола / С.Н. Гармаш // Вестник Днепропетровского государственного аграрно - экономического университета. – 2016. – №. 1. – С. 32–36.
25. Герасимович, К. М. Характеристика продукции картиноидов штаммами дрожжей рода *Rhodospiridium* / К.М. Герасимович, Н.В. Бесараб, А.В. Кантерова, Г.И. Новик // Сахаровские чтения 2016 года: экологические проблемы XXI века: материалы 16-й Международной научной конференции. – 2016. – С. 122–123.
26. Глушакова, А. М. Динамика дрожжевых сообществ в плодах шиповника (*Rosa canina* L.) / А.М. Глушакова, И.Ю. Чернов // Микология и фитопатология. – 2009. – Т. 43. – №. 3. – С. 193-199.
27. Глушакова, А.М. Дрожжи в млечном соке *Hevea brasiliensis* / А.М. Глушакова, А.В. Качалкин, И.А. Максимова, И.Ю. Чернов //Микробиология. – 2016. – Т. 85. – №4. – С. 466 – 471.
28. Голубев, В. И. Фунгицидная активность дрожжей, выделенных из чала / В.И. Голубев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49. – №. 2. – С. 175– 175.
29. Гордин, А. А. Производство кормового белка - стратегическая цель по импортозамещению / А.А. Гордин, А.В. Нечукин // Экономика и управление: проблемы, решения. – 2015. – №. 12. – С. 61–63.
30. ГОСТ 20083-74. Дрожжи кормовые. Технические условия. – М.: ГОСТ, 1993. – 60 с.

31. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики – М.: Стандартиформ, 2019. – 11с.
32. Гревцова, С. А. Биотехнологические аспекты производства кормового белка на основе пивной дробины с использованием препаратов селена / С.А. Гревцова, З.Р. Бораев // Естественные и технические науки: опыт, проблемы, перспективы. – 2015. – №. 1. – С. 78–81.
33. Гришанов А. В. Влияние йодированных дрожжей на сохранность карпа / А.В. Гришанов, А.П. Коробов // Актуальные проблемы и перспективы развития ветеринарной медицины, зоотехнии и аквакультуры. – 2016. – С. 254–258.
34. Гураль, С. В. Коррекция экспериментального дисбактериоза у японских перепелов биомассой каротиносинтезирующих дрожжей / С.В. Гураль, О.М. Стефанышин, М.В. Каминская, Н.И. Борецкая, И.Н. Попык. Материалы II Всероссийской научно - практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РСФСР и Башкирской АССР, доктора ветеринарных наук, профессора Хамита Валеевича Аюпова (1914–1987 гг.) – 2014. – С. 354 – 357.
35. Дармограй, Л. М. Питательная ценность и продуктивное действие биомассы дрожжей на организм животных и птицы (обзорная информация) /Л.М. Дармограй, М.Е. Шевченко // Научный вестник Львовского национального университета ветеринарной медицины и биотехнологии имени С. З. Гжицкого. – 2014. – Т. 16. – №. 2 (59). – С. 83–88.
36. Дармограй, Л. М. Использование биомассы дрожжей в комбикормах кроликов при интенсивной технологии выращивания / Л.М. Дармограй, М.Е. Шевченко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2016. – №. 19. - № 1. – С.142–147.

37. Ерина, Н. В. Микробные сообщества филлосферы некоторых растений семейства *Grossulariaceae* / Н.В. Ерина, Т.С. Коптева // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 110. – С. 1–12.
38. Ерина, Н. В. Видовой состав эпифитной микрофлоры некоторых растений семейства *Grossulariaceae* и различные типы их взаимодействий / Н.В. Ерина, Т.С. Коптева, И.А. Заикина // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 114. – С. 1 – 9.
39. Ефименко, Д. Ю. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей *Rhodosporidium diobovatum* / Д.Ю. Ефименко. Студенческая наука XXI века: материалы IV Международной студенческой научно – практической конференции. – 2015. – С. 12–13.
40. Желтов, Ю. А. Применение кормов микробиологического синтеза, искусственных аминокислот, ферментализатов БВК, мочевины и углеаммонийных солей (УАС) в кормлении рыб / Ю.А. Желтов, А.И. Дворецкий, Е.В.Немировская, О.В. Дерень // Рыбохозяйственная наука Украины. – 2013. – С. 30–35.
41. Загрядская, Ю. А. Бактериальные комплексы плодовых тел и гифосферы некоторых базидиомицетов / Ю.А. Загрядская, Л.В. Лысак, И.И. Сидорова, А.В. Александрова, Е.Ю. Воронина // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2013. – №. 4. – С. 405–405.
42. Иванов, В. Г. Практикум по органической химии / В.Г. Иванов, О.Н. Гева, Ю.Г. Гаверова. – М.: АCADEMIA, 2002. – 288 с.
43. Исаева, О. В. Дрожжи *Candida railenensis* в плодах дуба черешчатого (*Quercus robur L.*) / О.В. Исаева, А.М. Глушакова, А.М. Юрков, И.Ю. Чернов // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – №. 3. – С. 399– 403.

44. Качалкин, А. В. Особенности дрожжевых группировок в филлосфере сфагновых мхов / А.В. Качалкин, А.М. Глушакова, А.М. Юрков, И.Ю. Чернов // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – №. 4. – С. 533– 541.
45. Кленова, И. А. Экологические подходы к оценке безвредности нетрадиционных белковых продуктов / И.А. Кленова, Д.А. Рудиков // Заметки ученого. – 2016. – №. 7. – С. 132–137.
46. Ковтун, Ю. С. Сравнительная оценка потенциальных белковых основ микробиологических сред / Ю.С. Ковтун, А.А. Курилова, Т.В. Таран, Л.С. Катунина, Н.В. Чурикова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – №. 3. – С. 92– 95.
47. Колесников, А.С. Совершенствование технологической схемы и технических средств для получения кормовых дрожжей из свекловичного жома / А.С. Колесников // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. – 2015. – №. 1. – С. 4 –11.
48. Колодина, Е. Н. Изучение биологической безопасности дрожжей рода *Candida* как потенциального источника кормового белка/ Е.Н. Колодина, О.А. Артемьева, Е.Н. Котковская, О.В. Павлюченкова, Д.А. Переселкова // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2016. – Т. 62. – №. 5. – С. 72–78.
49. Кононович, А. С. Технология производства живого чешского пива / А.С. Кононович // Молодежь и наука. – 2016. – №. 2. – С. 34–34.
50. Кончакова, Е. Эффективность пивных дрожжей в молочном животноводстве / Е. Кончакова, Я. Фрерикс, О. Будаев, Р. Пальчиков // Комбикорма. – 2016. – №. 12. – С. 84– 85.
51. Корнеева, О. С. Влияние условий культивирования на рост биомассы *Yarrowia lipolytica* - продуцента кормового белка / О.С. Корнеева, Е.А. Мотина, С.Ф. Яковлева, А.Н. Яковлев // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2016. – № 1. – С.182–185.

52. Кощаев, А. Г. Особенности обмена веществ птицы при использовании в рационе пробиотической кормовой добавки / А.Г. Кощаев, С.А. Калюжный, Е.И. Мигина // Ветеринария Кубани. – 2013. – №. 4. – С. 17–20.
53. Крикунова, Л. Н. Влияние янтарной кислоты на азотный обмен при развитии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Л.Н. Крикунова, В.П. Осипова, И.В. Лазарева // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2017. – №. 7. – С. 35–39.
54. Кирица, Е. Влияние растительных экстрактов на процесс биосинтеза каротиноидов дрожжами / Е. Кирица // Вестник АПК Верхневолжья. – 2017. – №. 3. – С. 54–58.
55. Кудрявцев, В. И. Систематика дрожжей / В.И. Кудрявцев. – М: АН СССР, 1954. – 428с.
56. Кулиш, С. А. Выделение из природных источников дрожжевых грибов, синтезирующих полисахариды и экзодеполимеразы клеточных стенок растений / С.А.Кулиш, Л.И.Сапунова, Л.В.Евтухова. Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов II международной научно–практической конференции. - 2017.– С. 85–86 .
57. Курилова, А.А. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций / А.А. Курилова, Т.В. Таран, Л.С. Катунина, С.И. Головнева // Проблемы особо опасных инфекций – 2009. – Т. 3. – №. 101. – С. 66–68.
58. Курсанов, Л. И. Микология / Л.И. Курсанов. – М: Рипол Классик, 2013. – 480 с.
59. Лобанок, А. Г. Дрожжи как основа биологически активных кормовых добавок про- и пребиотического действия / А.Г.Лобанок, Л.И.Сапунова, А.Н.Шрейко, Е.А. Долженкова //Известия Национальной академии наук Беларуси. – 2014. – №. 1. – С. 17–22.

60. Логвинова, Т. И. Изучение свойств штаммов дрожжей, в качестве микробиологических продуцентов кормового белка / Т.И. Логвинова, Е.Н. Колодина, О.А. Артемьева, Д.А. Никанова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – №. 12–1. – С. 57–61.
61. Лунина, Ю.Н. Биосинтез лимонной кислоты из глюкозосодержащих субстратов у дрожжей *Yarrowia lipolytica* / Ю.Н. Лунина, С.В. Камзолова, В. Римович, А.В. Афонин, И.Г. Моргунов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2017. – С. 30 – 37.
62. Магомедова, Е. С. Разнообразие и морфофизиологические свойства дрожжей, обитающих в условиях различной вертикальной поясности / Е.С. Магомедова, Д.А. Абдуллабекова, Ш.А. Абрамов // Юг России: экология, развитие. – 2015. – Т. 4. – №. 1. – С. 99–102.
63. Мадзу, О.Б. Дрожжи рода *Pichia* как инструмент биоконверсии растительного сырья / О.Б. Мадзу, Е.Г. Борисенко, О.Д. Сидоренко // Успехи современной науки. – 2017. – Т. 6. – №. 3. – С. 75–79.
64. Макаров, А. В. Некоторые аспекты применения микробных культур в качестве продуцентов белка / А.В. Макаров, О.Б. Сопрунова. Векторы развития науки: сборник статей студентов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей. – Ч.2. – 2015. – С. 31 – 34.
65. Максимова, И. А. Руководство к практическим занятиям по биологии дрожжей / И.А. Максимова, И.Ю. Чернов. – Тула: Гриф и К., 2006. – Т. 96.
66. Манукян, Г. А. Подбор условий предварительной обработки биомассы дрожжей для получения β –глюкана / Г.А. Манукян, А.А. Красноштанова // Бутлеровские сообщения. – 2017. – Т. 50. – №. 5. – С. 88–94.
67. Марфенина, О. Е. Грибные эпифиты древесных растений после «ледяного дождя» / О.Е. Марфенина, А.Е. Иванова, А.М. Глушакова, В.С. Соина,

- В.А. Шишков, Л.Ф. Бареева // Микология и фитопатология. – 2012. – Т. 46. – №. 6. – С. 377– 384.
68. МУ 2620 – 82. Методические указания. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов. – Киев, 1982. – 23с.
69. МУК 4.2.2316 – 08. Методические указания. Методы контроля бактериологических питательных сред. – М: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.
70. Мусич, О. И. Каротиноидные дрожжи, как альтернатива для усиления пигментации желтка яиц в рационе кур-несушек / О.И. Мусич // Научно-технический бюллетень научно – исследовательского центра биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК. – 2015. – № 3. – С. 129– 133.
71. Наумов, Г.И. Эколого-биогеографические особенности дрожжей *Saccharomyces paradoxus batschinskaya* и родственных видов: ранние исследования / Г.И. Наумов // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – №. 4. – с. 387– 387.
72. Наумова, Е.С. Молекулярно – генетическая и физиологическая дифференциация дрожжей *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus*: анализ штаммов из всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) / Е.С. Наумова // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – №. 2. – С. 236– 236.
73. Назаренко, Л. В. Биотопливо: история и классификация его видов / Л.В. Назаренко // Вестник московского городского педагогического университета. – 2012. – С. 16 – 32.
74. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. – М: Академия, 2005. – 608 с.
75. Никитин, Д.А. Биомасса грибов и видовое разнообразие культивируемой микобиоты почв и субстратов о. Нортбрук (Земля Франца-Иосифа) / Д.А.

- Никитин, М.В. Семенов, А.А. Семиколенных, И.А. Максимова, Качалкин А. В., А.Е. Иванова Биоразнообразие, систематика, экология // Микология и фитопатология. – 2019. – Т. 53. – №. 4. – С. 210- 222.
76. Новокрещенов, Ю. В. Биологические методы получения жидких видов топлива / Ю.В. Новокрещенов, Е.С. Тарасова. Электрификация и автоматизация сельского хозяйства: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА. – 2013. – С. 65 – 68.
77. Овсянникова, Т. А. Обогащение дрожжей микроэлементами/ Т.А. Овсянникова, Л.В. Кричковская, В.Л. Дубонос // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2014. – №. 2. – С. 56–59.
78. Орлова, Т.Н. Пробиотики-перспектива животноводства / Т.Н. Орлова, Р.В. Дорофеев //Аграрная наука - сельскому хозяйству. – 2017. – С. 177–180.
79. Орлова, Т. Н. Актуальность и перспективность получения экологически чистой продукции животноводства/ Т.Н. Орлова, Р.В. Дорофеев // Перспективы производства продуктов питания нового поколения. – 2017. – С. 115– 117.
80. Павлова, Е. А. Технология применения белкового ингредиента из остаточных пивных дрожжей при производстве слоеных изделий / Е.А. Павлова, В.Е. Куцакова, Т.В. Шкотова, С.В. Ефимова //Евразийский союз ученых. – 2015. – №. 4–11. – С. 79–85.
81. Палагина, М. В. Обоснование использования дальневосточных растений в технологии фруктовые (плодовые) виноматериалов с учетом выбора расы активных сухих дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / М.В. Палагина, А.А. Ширшова, А.Н. Стаценко // Научные труды Государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2013. – Т. 4. – С. 78– 84.

82. Панова Т.М. Получение и анализ этанола: метод. указания по выполнению лаб. практикума для студентов очной и заоч. формы обучения специальности 240406" Технология хим. переработки древесины" и направления 240100" Хим. технология и биотехнология"/Т.М. Панова; Урал. гос. лесотехн. ун-т.- Екатеринбург: УГЛТУ, 2008.-22 с.- Библиогр.: с. 22.
83. Пермякова, Л. В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей / Л.В. Пермякова //Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 42. – №. 3. – С. 46 – 52.
84. Поддубный, Д. А. Оценка влияния йодсодержащего препарата на продуктивность радужной форели / Д.А Поддубный. Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации в свете импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны: материалы национальной научно – практической конференции. - 2016 г. – С.92 – 95.
85. Полянская, И. С. Вологодский функциональный кормовой продукт для сельскохозяйственных животных/ И.С. Полянская, Куренкова Л.А., Богатырева Е.В., Фоменко П.А., Забегалова Г.Н. // Молочнохозяйственный вестник. – 2018. – №. 2 (30). – С. 111– 120.
86. Постников, А. Е. Оценка состава осадочных пивных дрожжей при получении дрожжевых гидролизатов / А.Е. Постников, И.Н. Павлов // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности. – 2014. – С. 405– 409.
87. Привалова, Е. А. Арилхалькогенилацетаты трис (2-гидроксиэтил) аммония-стимуляторы роста спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Е.А. Привалова, Н.П. Тигунцева, С.Н. Адамович, Р.Г. Мирсков, А.Н. Мирскова // Известия Академии наук. – 2017. – №. 7. – С. 1320–1324.
88. Ралкова, В.С. Возможность использования изолятов дрожжей, выделенных из биологических объектов для утилизации углеводов,

- увеличения биомассы – источника кормового белка / В.С. Ралкова, О.А. Артемьева, О.Н. Колодина, Д.А. Никанова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – №. 11–1. – С. 66–70.
89. Рамазанова, З. Р. Эпифитная микрофлора и фитонцидная активность листьев некоторых древесных растений г. Махачкалы / З.Р. Рамазанова, З.М. Асадулаев // Известия Дагестанского государственного педагогического университета. – 2013. – №. 3 – С. 24 –28.
90. Рогожин, В. В. *Medusomyces gisevii*: строение, функционирование и использование / В.В. Рогожин, Ю.В. Рогожин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7. – №. 4. – С. 24 –35.
91. Руководство к практическим занятиям по микробиологии (под ред. Н.С.Егорова, 3-е издание) / М. Н. Пименова, Н. Н. Гречушкина, А. И. Нетрусов и др. — Изд-во Московского университета Москва, 1995. — 224 с.
92. Салкенова, А. Е. Брожение пивных дрожжей как процесс биотехнологии / А.Е. Салкенова // Образование и наука в современных реалиях. – 2018. – С. 15–19.
93. Саубенова, М. Г. Производство биоэтанола как альтернативного источника энергии / М.Г.Саубенова, Т.В. Кузнецова // Приволжский научный вестник. – 2015. – №. 7 – С.23 – 27.
94. Сергеенко, М. Е. Ремесленники древнего Рима / М.Е. Сергеенко – М: Рипол Классик, 2013. –170 с.
95. Сибатаев, С. А. Перспективы развития электроэнергетики / С.А. Сибатаев. Язык и мировая культура: взгляд молодых исследователей: сборник материалов XIV Всероссийской научно-практической конференции. - 2014. – С. 190– 192.
96. Сидорова, И. И. Микробиота гифосферы агарикомицетов с разным трофическим статусом: численность культивируемых бактерий и

- микромикетов / И.И. Сидорова, А.В. Александрова, Е.Ю. Воронина //Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51. – №. 2. – С. 78 – 89.
97. Симон, М. Ю. Использование кормовых дрожжей в кормлении осетровых (*Acipenserinae*) видов рыб (обзор) / М.Ю. Симон //Рыбохозяйственная наука Украины. – 2015. – №. 4. – С. 100– 126.
98. Скоков, Р. Ю. Развитие научного обеспечения рыбного хозяйства / Р. Ю. Скоков. Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона: материалы IX Международной научно-практической конференции.– 2017. – С. 230 – 234.
99. Сычёва, Л. В. Использование кормовых дрожжей при откорме бычков / Л.В. Сычева // Нива Поволжья. – 2013. – №. 1. – С. 81 – 83.
100. Сычева, Л. В. Влияние скармливания кормовых дрожжей на мясную продуктивность и химический состав мяса бычков / Л.В. Сычева //Научное обеспечение инновационного развития агропромышленного комплекса регионов РФ. – 2018. – С. 924– 927.
101. Тамахина, А. Я. Дрожжи рода *Saccharomyces*, выделенные из филлосферы девясила британского / А.Я. Тамахина, Ж.Р. Локьяева //Новая наука: Теоретический и практический взгляд. – 2016. – №. 4. – С. 36– 39.
102. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М: Дрофа, 2004. – 256 с.
103. Терехова, В. Е. Перспективы исследования дрожжевой флоры осетровых рыб для мониторинга их состояния в аквакультуре / В.Е. Терехова, Н.Л. Белькова //Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). – 2017. – Т. 189. – С. 171 –176.
104. Тимченко, Л. Д. Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капустная среда для культивирования лактобактерий / Л.Д. Тимченко, Н.И. Пенькова, Л.С. Катунина //Вестник Московского государственного областного университета.– 2010. – №. 2. – С. 51–55.

105. Ткаченко, А. Ф. Липиды микроорганизмов как источник биотоплива / А.Ф. Ткаченко, Е.А. Тигунова, С.М. Шульга // Цитология и генетика. – 2013. – №. 47. - № 6. – С. 22–29.
106. Туманова, М. И. Кормовой микробиологический белок для свиней / М.И. Туманова. Синтез науки и общества в решении глобальных проблем современности: сборник статей Международной научно – практической конференции. – Ч.2. – 2016. – С. 105 – 107.
107. Федорова, О. В. Питательные среды в производствах медицинских и ветеринарных препаратов / О.В. Федорова, С.А. Понкратова, Р.Т. Валеева, И.Р. Исламгулов // Вестник Казанского технологического университета. – 2017. – Т. 20. – №. 4. – С. 130 – 133.
108. Феофилова, Е. П. Лигнин: химическое строение, биodeградация, практическое использование (обзор) / Е.П. Феофилова, И.С. Мысякина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. – №. 6. – С. 559 – 569.
109. Хазра, Д. Водоросли как источник сырья для производства биотоплива / Д. Хазра, Амин – уль Маннан М., Арун Карнвал, Дибан Чакраварти Каннан // Альгология. – 2017. – С. 337 – 356.
110. Хайруллина, Л. Ш. НуПро в рационе перепелов / Л.Ш., Хайруллина, Р.Р. Гадиев. Аграрная наука – инновационному развитию АПК в современных условиях: материалы Международной научно - практической конференции. – Т.3. – 2013. – С. 238 – 241.
111. 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.
112. 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.

113. Цыганков, М.А. Синтез модифицированных, устойчивых к протеолитической деградации интерферонов гамма в дрожжах *Pichia pastoris* / М.А. Цыганков, А.Е. Зобнина, М.В. Падкина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – №. 4. – С. 429–436.
114. Чайка, И. История применения дрожжей в пекарном деле / И. Чайка // Хлебопекарская и кондитерская промышленность Украины. – 2013. – №. 9. – С. 18–19.
115. Червякова, О. П. Оценка биопотенциала первичного и вторичного растительного сырья для получения дрожжевой кормовой добавки, обогащенной каротиноидами / О.П. Червякова, Б.А. Кареткин, И.В. Шакир, В.И. Панфилов //Актуальная биотехнология. – 2015. – №. 3. – С. 96–97.
116. Червякова, О. П. Интенсификация биосинтеза каротиноидов дрожжами рода *Rhodotorula* / О.П. Червякова, А.М. Фомичева, И.В. Шакир, В.И. Панфилов //Актуальная биотехнология. – 2016. – №. 3. – С. 176–177.
117. Чичина, Т. В. Технология производства сорбента микотоксинов из отработанных пивных дрожжей / Т.В. Чичина, Т.В. Шкотова // Теплофизическое приборостроение. Теоретические основы тепло - и хладотехники. – 2014. – С. 188 – 191.
118. Шинкаревич, Е. Д. Использование пигмента астаксантина в кормлении нильской тилапии / Е.Д. Шинкаревич //Научное обеспечение развития АПК в условиях импортозамещения. – 2018. – С. 295– 297.
119. Ширшиков, Н. В. Культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в биореакторе с диффузором / Н.В. Ширшиков, Ю.В. Редикульцев, А.Н. Сизов, Д.А. Шевелев, В.В. Безручко, А.Б. Гаврилов // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2015. – №. 4. – С.294 – 302.

120. Эльдаров, М. А. Геномика и биохимия винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / М.А. Эльдаров, С.А. Кишковская, Т.Н. Танащук, А.В. Марданов // Успехи биологической химии. – 2016. – Т. 56. – С. 155–196.
121. Яворская Т. А. Важность и перспектива применения пробиотиков в аквакультуре / Т.А. Яворская, Е.С. Серова // Электронный научно – практический журнал «Молодежный научный вестник». – 2017. – №. 12. – С. 111–116.
122. Яворская, Т. А. Пробиотики в аквакультуре / Т.А. Яворская // Электронный научно – практический журнал «Молодежный научный вестник». – 2017. – С. 111 –117.
123. Andreadis, S. S. Survey of arthropod assemblages responding to live yeasts in an organic apple orchard / S. S. Andreadis, P.Witzgall, P.G. Becher // Frontiers in Ecology and Evolution. – 2015. – Vol. 3. – P. 1 – 7.
124. Ambroset, C. Deciphering the molecular basis of wine yeast fermentation traits using a combined genetic and genomic approach / C. Ambroset, M. Petit, C. Brion, I. Sanchez, P. Delobel, C.Guérin, H.Chiapello, N.Pierre, F. Bigey, S. Dequin, B. Blondin //G3: Genes, Genomes, and Genetics. – 2011. – Vol. 1. – N. 4. – P. 263–281.
125. Arguello, J. R. Can yeast (*S. cerevisiae*) metabolic volatiles provide polymorphic signaling? / J. R. Arguello, C.Sellanes, Yann Ru Lou, A.R. Raguso //PloS one. – 2013. – Vol. 8. – N. 8. – P. 1 – 12.
126. Avalos, J. Biological roles of fungal carotenoids/ J. Avalos, M.C. Limón // Current genetics. – 2015. – Vol. 61. – N. 3. – P. 309– 324.
127. Bagheri, B. The diversity and dynamics of indigenous yeast communities in grape must from vineyards employing different agronomic practices and their influence on wine fermentation / B. Bagheri, F. F.Bauer, M. E. Setati // South African Journal of Enology and Viticulture. – 2015. – Vol. 36. – N. 2. – P. 243–251.

128. Bajaj, B. K. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity/ B. K. Bajaj, S. Raina, S. Singh //Journal of basic microbiology. – 2013. – Vol. 53. – N. 8. – P. 645–656.
129. del Barrio-Galán, R. Effect of different ageing techniques on the polysaccharide and phenolic composition and sensorial characteristics of Chardonnay white wines fermented with different selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains / R. del Barrio-Galán, M. Medel-Marabolí , A.Peña-Neira //European Food Research and Technology. – 2016. – Vol. 242. – N. 7. – P. 1069-1085.
130. Barnett, J. A. Yeast research: a historical overview / J. A. Barnett, L. Barnett. – American Society for Microbiology Press, 2011. – 367 p.
131. Belda, I. Unraveling the enzymatic basis of wine “flavorome”: a phylo-functional study of wine related yeast species / I. Belda, J. Ruiz, A. Alastruey-Izquierdo, E. Navascués, D. Marquina , A.Santos // Frontiers in microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1–13.
132. Becher, P. G. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development/ P. G. Becher, G. Flick, E. Rozpędowska, A.Schmidt, A.Hagman , S. Lebreton , M.C. Larsson, B.S. Hansson, J. Piškur, M. Bengtsson // Functional Ecology. – 2012. – Vol. 26. – N. 4. – P. 822– 828.
133. Becher, P. G. Chemical signaling and insect attraction is a conserved trait in yeasts/ P. G. Becher, A. Hagman, V. Verschut, A. Chakraborty, E. Rozpędowska, S. Lebreton, M. Bengtsson, G. Flick, P. Witzgall, J. Piškur // Ecology and evolution. – 2018. – Vol. 8. – N. 5. – P. 2962– 2974.
134. Beck, J. J. Harnessing insect–microbe chemical communications to control insect pests of agricultural systems / J. J. Beck, R. L.Vannette // Journal of agricultural and food chemistry. – 2016. – Vol. 65. – N. 1. – P. 23–28.

135. Blackwell, M. Yeasts in Insects and Other Invertebrates/ M. Blackwell // Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity. – Springer, Cham, 2017. – P. 397–433.
136. Borneman, A. R. The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins/ A. R. Borneman, B.A. Desany, D. Riches, J. P. Affourtit, A. H. Forgan, I. S. Pretorius, M. Egholm, P. J. Chambers // FEMS yeast research. – 2012. – Vol. 12. – N. 1. – P. 88–96.
137. Breil, C. Bio-based solvents for green extraction of lipids from oleaginous yeast biomass for sustainable aviation biofuel/ C. Breil, A. Meullemiestre, M. Vian, F. Chemat // Molecules. – 2016. – Vol. 21. – N. 2. – P. 1 – 14.
138. Brown, M. J. F. A horizon scan of future threats and opportunities for pollinators and pollination/ M. J. F. Brown, V.L. Dicks, R. J. Paxton, K.C. R Baldock , A.B.Barron, M.P. Chauzat , B.M.Freitas , D.Goulson, S.Jepsen, C.Kremen, J. Li, P. Neumann, D.E. Pattermore, S. G.Potts, O.Schweiger, C.LSeymour, J.C.Stout // PeerJ. – 2016. – Vol. 4. – P.1 – 20.
139. Brysch-Herzberg M. Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions/ M. Brysch-Herzberg, M. Seidel // International journal of food microbiology. – 2015. – Vol. 214. – P. 137–144.
140. Buijs, N. A. Long chain alkane production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / N. A. Buijs, Y. J. Zhou, V. Siewers, J. Nielsen // Biotechnology and bioengineering. – 2015. – Vol. 112. – N. 6. – P. 1275– 1279.
141. Buijs, N. A. Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / N. A. Buijs, V. Siewers, J. Nielsen // Current opinion in chemical biology. – 2013. – Vol. 17. – N. 3. – P. 480–488.
142. Caspeta, L. The role of biofuels in the future energy supply / L. Caspeta, N.A. Buijs, J. Nielsen // Energy & Environmental Science. – 2013. – Vol. 6. – N. 4. – P. 1077–1082.

143. Caspeta, L. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant / L. Caspeta, Y. Chen, P.Ghiaci, A. Feizi, S. Buskov, B. M. Hallström, D.Petranovic, J.Nielsen // *Science*. – 2014. – Vol. 346. – N. 6205. – P. 75 – 78.
144. Chaucheyras-Durand, F. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future/ F. Chaucheyras-Durand, N.D.Walker, A. Bach // *Animal Feed Science and Technology*. – 2008. – Vol. 145. – N. 1– 4. – P. 5–26.
145. Chen, K. Q. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber/ K. Q. Chen, J. Li, J. F. Ma, M. Jiang , P.Weï, Z.M.Liu, H.J.Ying // *Bioresource technology*. – 2011. – Vol. 102. – N. 2. – P. 1704–1708.
146. Ciani, M. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation / M. Ciani, F. Comitini // *Current Opinion in Food Science*. – 2015. – T. 1. – P. 1–6.
147. Cordero-Bueso, G. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries / G. Cordero-Bueso, T. Arroyo, A. Serrano, J. Tello, I. Aporta, M. Dolores Vélez, V.Valero // *International journal of food microbiology*. – 2011. – Vol. 145. – N. 1. – P. 132– 139.
148. Courtois, E. A. Evolutionary patterns of volatile terpene emissions across 202 tropical tree species / E. A. Courtois, K. G. Dexter, C.E.T. Paine, T. Stien, G. Engel, C. Baraloto, J. Chave // *Ecology and evolution*. – 2016. – Vol. 6. – N. 9. – C. 2854–2864.
149. David V. High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation / V. David, S. Terrat, K Herzine, O. Claisse, S. Rousseaux, R. Tourdot-Maréchal, I. Masneuf-Pomarede, L. Ranjard, H. Alexandre // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. – 2014. – Vol. 41. – N. 5. – P. 811– 821.

150. Dayo-Owoyemi, I. Taxonomic assessment and biotechnological potential of yeasts hold at the Unesp-Central for microbial resources/ I. Dayo-Owoyemi – Rio Claro. – 2012. – 205 p.
151. Davis, T. S. A survey of insect assemblages responding to volatiles from a ubiquitous fungus in an agricultural landscape / T.S. Davis, P.J. Landolt //Journal of chemical ecology. – 2013. – Vol. 39. – N. 7. – P. 860–868.
152. Davis, T. S. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals/ T.S. Davis, L. Tawni, T. L. Crippen, R. W.Hofstetter, J. K.Tomberlin //Journal of chemical ecology. – 2013. – Vol. 39. – N. 7. – P. 840– 859.
153. Dias, C. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921/ C. Dias, S. Sousa, J. Caldeira, A. Reis, T. Lopes da Silva // Bioresource technology. – 2015. – Vol. 189. – P. 309–318.
154. Dobrowolski, A. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica* / A. Dobrowolski, P. Mituła, W. Rymowicz, A.M. Mirończuk // Bioresource technology. – 2016. – Vol. 207. – P. 237–243.
155. Drumonde-Neves, J. Yeast biodiversity in vineyard environments is increased by human intervention / J. Drumonde-Neves, R. Franco-Duarte, T. Lima, D. Schuller, C. Pais // PloS one. – 2016. – T. 11. – N. 8. – P. 1–13.
156. Espinosa-Gonzalez, I. Hydrothermal treatment of oleaginous yeast for the recovery of free fatty acids for use in advanced biofuel production/ I. Espinosa-Gonzalez, A. Parashar, D. C.Bressler // Journal of biotechnology. – 2014. – Vol. 187. – P. 10–15.
157. Fakas, S. DGK1-encoded diacylglycerol kinase activity is required for phospholipid synthesis during growth resumption from stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Fakas, C. Konstantinou , G. M. Carman // Journal of Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 286. – N. 2. – P. 1464–1474.

158. Farré-Armengol, G. Bidirectional interaction between phyllospheric microbiotas and plant volatile emissions / G. Farré-Armengol, I. Filella, J. Llusia, J. Peñuelas // Trends in plant science. – 2016. – Vol. 21. – N. 10. – P. 854–860.
159. Ferreira, I. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications / I. Ferreira, O. Pinho, E. Vieira, J. G.Tavarela // Trends in food science & technology. – 2010. – Vol. 21. – N. 2. – P. 77–84.
160. Fichman, Y. Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation / Y. Fichman, S. Y. Gerdes, H. Kovacs, L. Szabados, A. Aviah Zilberstein, N. L. Csonka // Biological Reviews. – 2015. – vol. 90. – N. 4. – P. 1065– 1099.
161. Fossati, E. Synthesis of morphinan alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*/ E. Fossati, L. Narcross, A. Ekins, J. P. Falguyret, J. Vincent, J. Martin // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – N. 4. – P. 1 – 15.
162. Gammacurta, M. Impact of yeast strain on ester levels and fruity aroma persistence during aging of Bordeaux red wines/ M. Gammacurta, S. Marchand, W. Albertin, V. Moine, G. de Revel // Journal of agricultural and food chemistry. – 2014. – Vol. 62. – N. 23. – P. 5378–5389.
163. Galanie S.Complete biosynthesis of opioids in yeast / S. Galanie, K. Thodey, I. J. Trenchard, Filsinger, M. Interrante, C. D. Smolke // Science. – 2015. – Vol. 349. – N. 6252. – P. 1095–1100.
164. Gibson, C. M. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects / C. M. Gibson, M.S. Hunter // Ecology Letters. – 2010. – Vol. 13. – N. 2. – P. 223–234.
165. Gobbi, M. Fermentative aptitude of non-Saccharomyces wine yeast for reduction in the ethanol content in wine /M. Gobbi, L. De Vero, L. Solieri, F. Comitini, P. Giudici, M. Ciani // European Food Research and Technology. – 2014. – Vol. 239. – N. 1. – P. 41– 48.

166. Good, A. P. Honey bees avoid nectar colonized by three bacterial species, but not by a yeast species, isolated from the bee gut / A. P. Good, M. P. L. Gauthier, R.L.Vannette, T. Fukami // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – N. 1. – P. 1–8.
167. Gonzalez, R. Yeast respiration of sugars by non-Saccharomyces yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines / R. Gonzalez, M. Quirós, P. Morales // Trends in food science & technology. – 2013. – Vol. 29. – N. 1. – P. 55–61.
168. Gonzalez, F. Symbiosis between yeasts and insects / F. Gonzalez // Crop Production Science. – 2014. – 40p.
169. Greppi, A. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food / A. Greppi, F. Saubade, C. Botta, C. Humblot, J. P. Guyot, L. Cocolin // Food microbiology. – 2017. – Vol. 62. – P. 169–177.
170. Gruber, A. Combined influence of different feed on body development of larvae, fry and young of the species *Poecilia reticulata* (Guppy) / A. Gruber // Lucrări tiinifice-Universitatea de iine Agricole i Medicină Veterinară, Seria Zootehnie. – 2012. – Vol. 58. – P. 543–547.
171. Halsey, J. A., e Silva M. C. P., Andreote F. D. Bacterial selection by mycospheres of Atlantic Rainforest mushrooms/ J. A. Halsey, M. C. P. e Silva, F.D. Andreote // Antonie van Leeuwenhoek. – 2016. – Vol. 109. – N. 10. – P. 1353–1365.
172. Herrera, C. M. Yeasts in nectar of an early-blooming herb: sought by bumble bees, detrimental to plant fecundity / C.M. Herrera, M. I. Pozo, M. Medrano // Ecology. – 2013. – Vol. 94. – N. 2. – P. 273–279.
173. Hoang, D. Interactions between *Drosophila* and its natural yeast symbionts—Is *Saccharomyces cerevisiae* a good model for studying the fly-yeast relationship?/ D. Hoang, A. Kopp, J. A. Chandler // PeerJ. – 2015. – Vol. 3. – P. 1–16.

174. Hoshino, Y. T. Soil clone library analyses to evaluate specificity and selectivity of PCR primers targeting fungal 18S rDNA for denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE) / Y. T. Hoshino, S. Morimoto // *Microbes and environments*. – 2009. – P. 281–287.
175. Hubenova, Y. Enhanced phytate dephosphorylation by using *Candida melibiosica* yeast-based biofuel cell / Y. Hubenova, D. Georgiev, M. Mitov // *Biotechnology letters*. – 2014. – Vol. 36. – N. 10. – P. 1993–1997.
176. Hubenova, Y. Stable current outputs and phytate degradation by yeast based biofuel cell / Y. Hubenova, D. Georgiev, M. Mitov // *Yeast*. – 2014. – Vol. 31. – N. 9. – P. 343–348.
177. Hubenova, Y. Extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cells: A review / Y. Hubenova, M. Mitov // *Bioelectrochemistry*. – 2015. – Vol. 106. – P. 177–185.
178. Hyma, K. E. Mixing of vineyard and oak tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards / K. E. Hyma, J. C. Fay // *Molecular ecology*. – 2013. – Vol. 22. – N. 11. – P. 2917–2930.
179. Johnson, E. A. Yeast biotechnology / E.A. Johnson, C. Echavarri-Erasun // *The Yeasts (Fifth Edition)*. – 2011. – P. 21–44.
180. Jayakody, L. N. Expression of Gre2p improves tolerance of engineered xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* to glycolaldehyde under xylose metabolism / L.N. Jayakody, T. L. Turner, E.J. Yun, I. I. Kong, J.J. Liu, Y. S. Yong-Su Jin // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2018. – Vol. 102. – N. 18. – P. 8121–8133.
181. Jolly, N. P. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces yeasts* in wine production uncovered / N. P. Jolly, C. Varela, I. S. Pretorius // *FEMS yeast research*. – 2014. – Vol. 14. – N. 2. – P. 215–237.
182. Jolly, N. P. The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa / N.P. Jolly, O. P.H. Augustyn, I. S.

- Pretorius // South African Journal of Enology and Viticulture. – 2017. – Vol. 24. – N. 2. – P. 35–42.
183. Kachalkin, A. V. Yeasts of the vineyards in Dagestan and other regions / A. V. Kachalkin, D. A. Abdullabekova, E. S. Magomedova, G. G. Magomedov, I. Yu. Chernov // Microbiology. – 2015. – Vol. 84. – N. 3. – P. 425–432.
184. Kerkhoven, E. J. Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* / E. J. Kerkhoven, K. R. Pomraning, S. E. Baker, J. Nielsen // NPJ systems biology and applications. – 2016. – Vol. 2. – P. 1– 7.
185. Knauer, A. C. Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers / A. C. Knauer, F. P. Schiestl // Ecology letters. – 2015. – Vol. 18. – N. 2. – P. 135 –143.
186. Klug, L. Yeast lipid metabolism at a glance / L. Klug, G. Daum // FEMS yeast research. – 2014. – Vol. 14. – N. 3. – P. 369–388.
187. Kumar, S. A review of biodiesel as an alternative fuel for vehicles / S. Kumar, A. Pal // Int. J. Eng. Technol. Manage. Appl. Sci. – 2014. – Vol. 2. – P.163 – 177.
188. Kurtzman, C., The yeasts: a taxonomic study / C. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout – Elsevier, 2011. – PP.123.
189. Kurtzman, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematic / C.P. Kurtzman // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2014. – Vol. 64. – N. 2. – P. 325–332.
190. Lam, Howell S. S. T. H. Drosophila-associated yeast species in vineyard ecosystems / S.S. T.H. Lam, K.S. Howell // FEMS microbiology letters. – 2015. – Vol. 362. – N. 20. – P. 1 – 7.
191. Lane, S. Value-added biotransformation of cellulosic sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae* / S. Lane, J. Dong, Y. S. Jin // Bioresource technology. – 2018. – P.380 – 394.

192. Lara-Flores, M. The use of probiotic in aquaculture: an overview / M. Lara-Flores // *Int Res J Microbiol.* – 2011. – Vol. 2. – N. 12. – P. 471–478.
193. Li, Y. Complete biosynthesis of noscapine and halogenated alkaloids in yeast / Y. Li, S. Lib, K. Thodey, I. Trenchard, A. Cravens, C.D.Smolke // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2018. – Vol. 115. – N. 17. – P. E3922– E3931.
194. Liang, X. Proline mechanisms of stress survival / X. Liang, L. Zhang, S. N. Kumar, D. F. Becker // *Antioxidants & redox signaling.* – 2013. – Vol. 19. – N. 9. – P. 998–1011.
195. Lievens, B. Microbiology of sugar-rich environments: diversity, ecology and system constraints / B. Lievens, M.I. Pozo, Z. B. Belgacem, A. Stevenson, K. A. Willems, H. Jacquemyn // *Environmental microbiology.* – 2015. – Vol. 17. – N. 2. – P. 278–298.
196. Lyons, J. I. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a southeastern US salt marsh / J. I. Lyons, S.Y. Newel, A. Buchan, M.A. Moran // *Microbial Ecology.* – 2003. – Vol. 45. – N. 3. – P. 270-281.
197. Madden, A. A. The ecology of insect–yeast relationships and its relevance to human industry / A. A. Madden, M. J. Epps, T. Fukami, R. E. Irwin, J. Sheppard, M. D. Sorger, R. R. Dunn // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* – 2018. – Vol. 285. – N. 1875. – P. 1 – 8.
198. Magallon-Andalon, C. G. Parasitism and substrate competitions effect of antagonistic yeasts for biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya (*Carica papaya L.*) var Maradol / C. G. Magallon-Andalon, G. Luna-Solano, J. A. Ragazzo-Sanchez, M. Calderon-Santoyo // *Mexican J Sci Res.* – 2012. – Vol. 1. – N. 1. – P. 2–9.
199. Maganti, H. Ecological structuring of yeasts associated with trees around Hamilton, Ontario, Canada / H. Maganti, D. Bartfai, J. Xu // *FEMS yeast research.* – 2012. – Vol. 12. – N. 1. – P. 9–19.

200. Manter, D. K. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis / D. K. Manter, J.M. Vivanco // *Journal of Microbiological Methods*. – 2007. – Vol. 71. – N. 1. – P. 7–14.
201. Martin K. J. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts/ K. J. Martin, P. T. Rygiewicz // *BMC microbiology*. – 2005. – Vol. 5. – N. 1. – P. 11 – 28.
202. Martins, G. Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process / G. Martins, J. Vallance, A. Mercier, W. Albertin, P. Stamatopoulos, P. Rey, A. Lonvaud, I. Masneuf-Pomarède // *International journal of food microbiology*. – 2014. – Vol. 177. – P. 21–28.
203. Mata-Gómez, L. C. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview / L.C. Mata-Gómez, J. C. Montañez, A. Méndez- Zavala, C. N. Aguilar // *Microbial cell factories*. – 2014. – Vol. 13. – N. 1. – P. 1 – 11.
204. Matthäus, F., Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica* / F. Matthäus, M. Ketelhot, M. Gatter, G. Barth // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – Vol. 80. – N. 5. – P. 1660–1669.
205. Marova, I. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production / I. Marova, M. Carnecka, A. Halienova., M. Certik, T. Dvorakova, A. Haronikova // *Journal of Environmental Management*. – 2012. – Vol. 95. – P. 338–342.
206. Marsit, S. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review/ S. Marsit, S. Dequin // *FEMS yeast research*. – 2015. – Vol. 15. – N. 7. – P.1–12.
207. Mekoue Nguela, J. Interactions of condensed tannins with *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and cell walls: tannin location by microscopy/ J. Mekoue Nguela, A. Vernhet, N. Sieczkowski, J.M. Brillouet // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2015. – Vol. 63. – N. 34. – P. 7539–7545.

208. Michelon, M., Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption / M. Michelon, Thais de Matos de Borba, Ruan da Silva Rafael Carlos André Veiga Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros Burkert // Food Science and Biotechnology. – 2012. – Vol. 21. – N. 1. – P. 1–8.
209. Milanesio, J. Extraction of lipids from *Yarrowia lipolytica* / J. Milanesio, P. Hegel, S. Séverine Camy, J. S. Condoret // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2013. – Vol. 88. – N. 3. – P. 378–387.
210. Milanović, V. Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments / V. Milanović, F. Comitini, M. Ciani // International journal of food microbiology – 2013. – Vol. 161. – N. 3. – P. 240–246.
211. Molodoi, E. Biotechnological aspects concerning the ergosterol obtaining from yeasts / E. Molodoi, A. Usatîi, N. Efremova, N. Chiselița, L. Fulga // Analele Universitatii din oradea, Fascicula Biologie. – 2013. – Vol. 20. – N. 1. – P. 12–18.
212. Mittelbach, M. Mutualism in yeasts / M. Mittelbach, R. L. Vannette // Yeasts in natural ecosystems: ecology. – Springer, Cham, 2017. – P. 155–178.
213. Nadolski, J. Factors restricting the abundance of wasp colonies of the European hornet *Vespa crabro* and the Saxon wasp *Dolichovespula saxonica* (Hymenoptera: Vespidae) in an urban area in Poland / J. Nadolski // Entomologica Fennica. – 2013. – Vol. 24. – N. 4. – P. 204–215.
214. Navarrete, P. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture / P. Navarrete, D. Tovar-Ramírez // Sustainable aquaculture techniques. – IntechOpen, 2014. – P. 135–172.
215. Nemcová, K., The diversity of yeasts associated with grapes and musts of the Strekov winegrowing region, Slovakia / K. Nemcová, E. Breierová, R. Vadkertiová, J. Molnárová // Folia microbiologica. – 2015. – Vol. 60. – N. 2. – P. 103–109.

216. Pankratov, T. A. Microbial communities of lichens / T.A. Pankratov, A. V. Kachalkin, E.S. Korchikov, T.G.Dobrovolskaya // *Microbiology*. – 2017. – Vol. 86. – N. 3. – P. 293–309.
217. Pent, M. Bacterial communities in boreal forest mushrooms are shaped both by soil parameters and host identity / M. Pent, K. Põldmaa, M. Bahram // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1– 13.
218. Pérez-Álvarez, E. P. Influence of two different cover crops on soil availability, nutritional status, and grape yeast-assimilable (YAN) in a cv. Tempranillo vineyard / E. P. Pérez-Álvarez, T. Garde-Cerdán, P. Santamaría, E. García-Escudero, F. Peregrina // *Plant and Soil*. – 2015. – Vol. 390. – N. 1-2. – C. 143–156.
219. Perez, M. F. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons / M.F. Perez, L. Contreras, N.M. Garnica, M.V. Fernandez-Zenoff, M.E. Farias, M. Sepulveda, J. Ramallo, J. R. Dib // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – N. 10. – P. 1–21.
220. Petrovič, U. Next generation biofuels: a new challenge for yeast / U. Petrovič // *Yeast*. – 2015. – Vol. 32. – N. 9. – P. 583–593.
221. Qverland, M. Yeast derived from lignocellulosic biomass as a sustainable feed resource for use in aquaculture / M. Qverland, A. Skrede // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2017. – Vol. 97. – N. 3. – P. 733–742.
222. Rigouin, C. Production of medium chain fatty acids by *Yarrowia lipolytica*: combining molecular design and TALEN to engineer the fatty acid synthase / C. Rigouin, M. Gueroult, C. Croux, G.Dubois, V. Borsenberger, S.Barbe, A. Marty, F. Daboussi, I. André, F. Bordes // *ACS synthetic biology*. – 2017. – Vol. 6. – N. 10. – P. 1870–1879.
223. Rolland, T. Yeasty clocks: dating genomic changes in yeasts / T. Rolland, B. Dujon // *Comptes rendus biologiques*. – 2011. – Vol. 334. – N. 8–9. – P. 620–628.
224. Rodriguez, A. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid

- biosynthesis / A. Rodriguez, K. R. Kildegaard, M. Li , I. Borodina, J. Nielsen // Metabolic engineering. – 2015. – Vol. 31. – P. 181– 188.
225. Sahandi, J. Effect of in-feed probiotic blend on growth performance and infection resistance of the guppy (*Poecilia reticulata*) / J. Sahandi, H. Jafaryan, P. Moradi, C.Tadiri // Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. – 2013. – Vol. 16. – N. 4. – P. 243–250.
226. Santamauro, F. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources/ F. Santamauro, F. M. Whiffin, R. J. Scott, C. J. C.Chuck// Biotechnology for biofuels. – 2014. – Vol. 7. – N. 1. – P. 2 –11.
227. Sasano, Y. Simultaneous accumulation of proline and trehalose in industrial baker's yeast enhances fermentation ability in frozen dough / Y. Sasano, Y. Haitani, K. Hashida, I. Ohtsu, J. Shima, H. Takagi // Journal of bioscience and bioengineering. – 2012. – Vol. 113. – N. 5. – P. 592–595.
228. Schaeffer, R. N. Consequences of a nectar yeast for pollinator preference and performance/ R.N. Schaeffer, Y.Z. Mei, J.S. Manson, R. E. Irwin // Functional ecology. – 2017. – Vol. 31. – N. 3. – P. 613–621.
229. Schneider, T. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents / T. Schneider, Graeff-Hönninger , W. T. French , R. Hernandez , N. Merkt, W. Claupein, M. Hetrick, P. Pham // Energy. – 2013. – Vol. 61. – P. 34–43.
230. Scheidler, N. H. Volatile codes: correlation of olfactory signals and reception in Drosophila-yeast chemical communication / N. H. Scheidler, C. Liu, K. A.Hamby, F. G. Zalom, Z.Syed // Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 1 –13.
231. Siddiqui, M. S. E. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools / M. S. E. Siddiqui, K. Thodey, I. Trenchard, C.D. Smolke // FEMS yeast research. – 2012. – Vol. 12. – N. 2. – P. 144–170.

232. Sipiczki, M. *Candida stigmatis* sp. nov., a new anamorphic yeast species isolated from flowers / M. Sipiczki // FEMS Yeast Research. – 2010. – Vol. 10. – N. 3. – P. 362–365.
233. Sipiczki, M. Overwintering of vineyard yeasts: survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines / M. Sipiczki // Frontiers in microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1–17.
234. Spribille, T. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens / T. Spribille, V. Tuovinen, P. Resl, D. Vanderpool, H. Wolinski, M.C.Aime, K. Schneider, E.Stabentheiner, M.Toome-Heller, G.Thor, H. Mayrhofer, H. Johannesson, J. P. McCutcheon // Science. – 2016. – Vol. 353. – N. 6298. – P. 488–492.
235. Starmer, W. T. Yeast ecology / W. T. Starmer, M. A. Lachance // The Yeasts (Fifth Edition). – 2010. – P. 65–83.
236. Stökl, J. Smells like aphids: orchid flowers mimic aphid alarm pheromones to attract hoverflies for pollination / J. Stökl, J. Brodmann, A. Dafni, M. Ayasse, B.S. Hansson // Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences. – 2011. – Vol. 278. – N. 1709. – P. 1216–1222.
237. Streletskii, R. A. Quantitative determination of indole-3-acetic acid in yeasts using high performance liquid chromatography—tandem mass spectrometry/ R.A. Streletskii, A.V. Kachalkin, A.M.Glushakova, V.V.Demin, I. Yu.Chernov// Microbiology. – 2016. – Vol. 85. – N. 6. – P. 727– 736.
238. Tanahashi, M. Discovery of mycangia and the associated xylose-fermenting yeasts in stag beetles (*Coleoptera: Lucanidae*) // M. Tanahashi, K. Kubota, N. Matsushita, K. Togashi Naturwissenschaften. – 2010. – Vol. 97. – N 3. – P. 311–317.
239. Tai, M. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production / M. Tai, G. Stephanopoulos// Metabolic engineering. – 2013. – Vol. 15. – P. 1–9.

240. Takush, D. G. Impact of yeast on the aroma and flavour of Oregon Pinot Noir wine / D. G. Takush, J. P. Osborne // Australian journal of grape and wine research. – 2012. – Vol. 18. – N. 2. – P. 131–137.
241. Tilloy, V. Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions / V. Tilloy, A. Ortiz-Julien, S. Dequin // Applied and environmental microbiology. – 2014. – Vol. 80. – N. 8. – P. 2623–2632.
242. Tristezza, M. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy/ M. Tristezza, C.Vetrano, G. Bleve, G. Spano, V. Capozzi, A.Logrieco, G.Mita, F.Grieco // Food microbiology. – 2013. – Vol. 36. – N. 2. – P. 335– 342.
243. Tsolmonbaatar, A. Isolation of baker's yeast mutants with proline accumulation that showed enhanced tolerance to baking-associated stresses / A. Tsolmonbaatar, K. Hashida, Y. Sugimoto, D.Watanabe, H.Takagi // International journal of food microbiology. – 2016. – Vol. 238. – P. 233–240.
244. Urubschurov, V. Biodiversity of yeasts in the gastrointestinal ecosystem with emphasis on its importance for the host / V. Urubschurov, P. Janczyk // The dynamical processes of biodiversity-Case studies of evolution and spatial distribution. – InTech, 2011. – P. 278 –302.
245. Van der Westhuizen, T. J. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa / T. J. Van der Westhuizen , O. P. H. Augustyn, I.S. Pretorius // South African Journal of Enology and Viticulture. – 2017. – Vol. 21. – N. 1. – P. 3–9.
246. Valle Rodriguez, J. O. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid ethyl esters, an advanced biofuel, by eliminating non 216 essential fatty acid utilization pathways/ J. O. Valle Rodriguez, S. B. Siewers, J. Nielsen – 2014. – Vol. 115. – P. 226–232.

247. Vannette, R. L. Nectar microbes can reduce secondary metabolites in nectar and alter effects on nectar consumption by pollinators / R.L. Vannette, Fukami T. // *Ecology*. – 2016. – Vol. 97. – N. 6. – P. 1410–1419.
248. Victor, M. Y. Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts / M. Y. Victor, S. K. Bhatia // *Biotechnology letters*. – 2012. – Vol. 34. – N. 8. – P. 1405–1414.
249. Vieira, É. D. Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy / É. D. Vieira, M. G. S. Andrietta, S. R. Andrietta // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2013. – Vol. 44. – N. 2. – P. 551–558.
250. Vohra, A. Probiotic yeasts in livestock sector / A. Vohra, P. Syal, A. Madan // *Animal Feed Science and Technology*. – 2016. – Vol. 219. – P. 31–47.
251. Walker, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts / G. M. Walker // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2011. – Vol. 99. – N. 1. – P. 25–34.
252. Warmink, J. A. Universal and species specific bacterial ‘fungiphiles’ in the mycospheres of different basidiomycetous fungi / J. A. Warmink, R. Nazir, J. D. Van Elsas // *Environmental Microbiology*. – 2009. – Vol. 11. – N. 2. – P. 300–312.
253. Wei, N. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast / N. Wei, J. Quarterman, S. R. Kim, J. H. D. Cate, Y. S. Jin // *Nature communications*. – 2013. – Vol. 4. – P. 1–8.
254. Wei, N. Simultaneous utilization of cellobiose, xylose, and acetic acid from lignocellulosic biomass for biofuel production by an engineered yeast platform / N. Wei, E. J. Oh, G. Million, J. H. D. Cate, Y. S. Jin // *ACS synthetic biology*. – 2015. – Vol. 4. – N. 6. – P. 707–713.
255. Williams, J. Identification of uric acid as the redox molecule secreted by the yeast *Arxula adenivorans* / J. Williams, A. Trautwein-Schult, D. Jankowska, G. Kunze, M. A. Squire, K. Baronian // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2014. – Vol. 98. – N. 5. – P. 2223–2229.

256. Yurkov, A. Basidiomycetous yeasts from *Boletales* fruiting bodies and their interactions with the mycoparasite *Sepedonium chrysospermum* and the host fungus *Paxillus* / A. Yurkov, D. Krüger, D. Begerow, A. Norbert, M.T.Tarkka // *Microbial ecology*. – 2012. – Vol. 63. – N. 2. – P. 295–303.
257. Zabed, H. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches / H. Zabed, J. N.Sahu, A. N. Boyce, G.Faruq // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2016. – Vol. 66. – P. 751–774.
258. Zhou, Y. J. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories / Y. J. Zhou, N. A. Buijs, Z.Zhu, J. Q Siewers, J. Nielsen // *Nature communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1–44.
259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

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
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
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

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.

Приложение А

Графики калибровочных кривых для дрожжевых культур

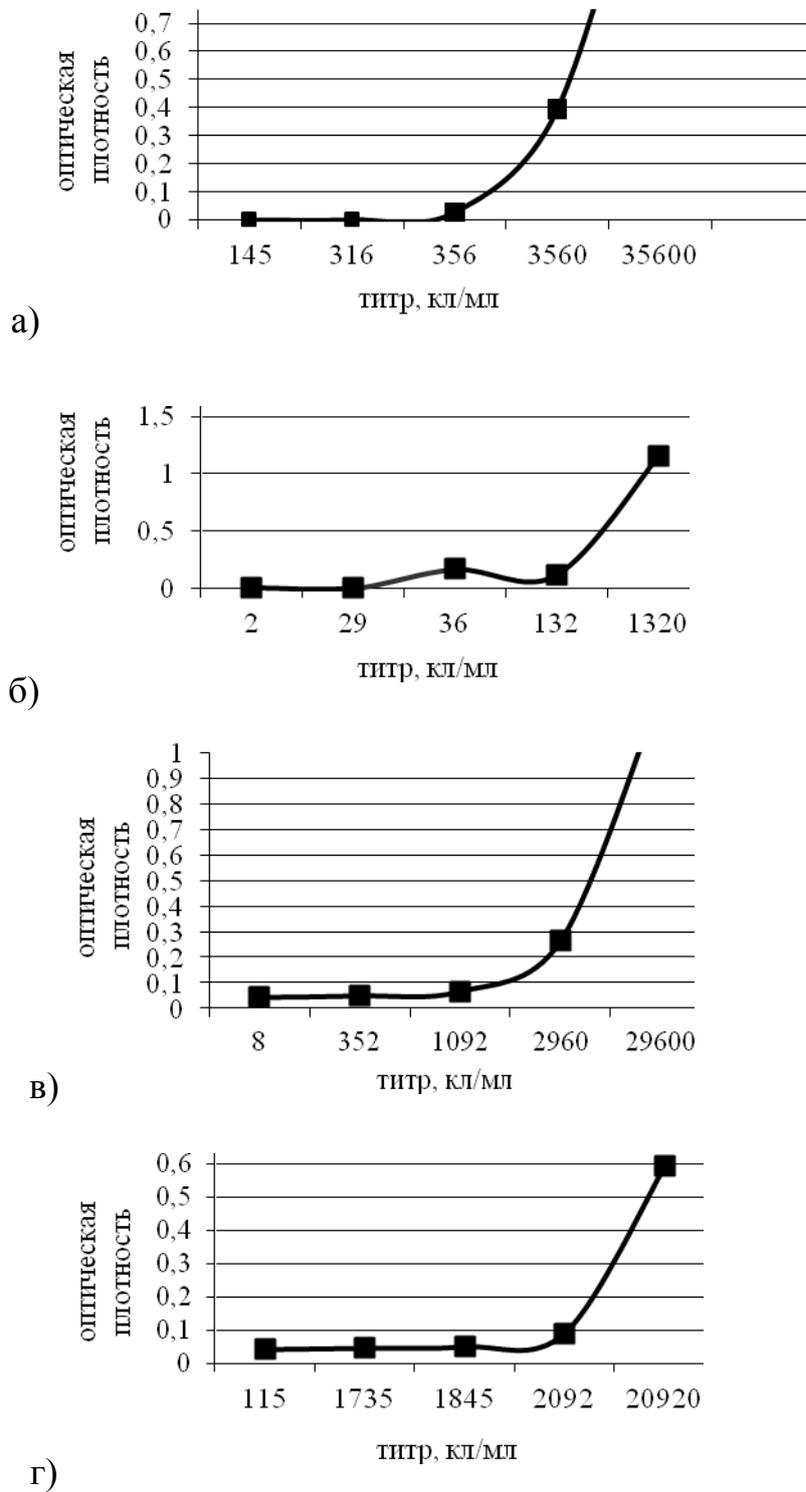


Рисунок А.1 - Калибровочная кривая для культур PhaurI (а), PhaurIII (б), L.sulf (в), PhaurII (г)

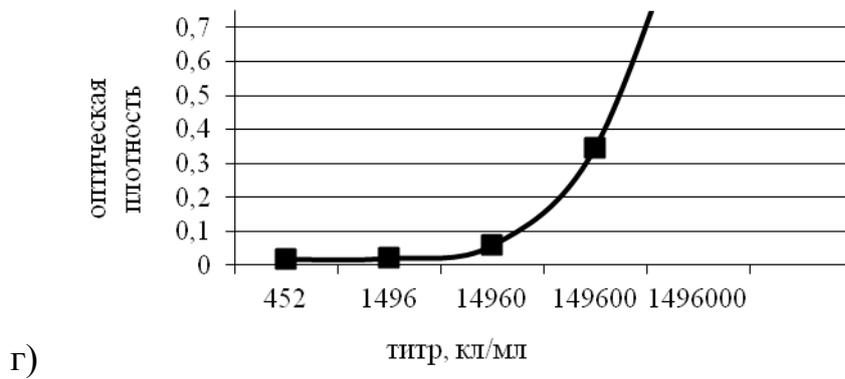
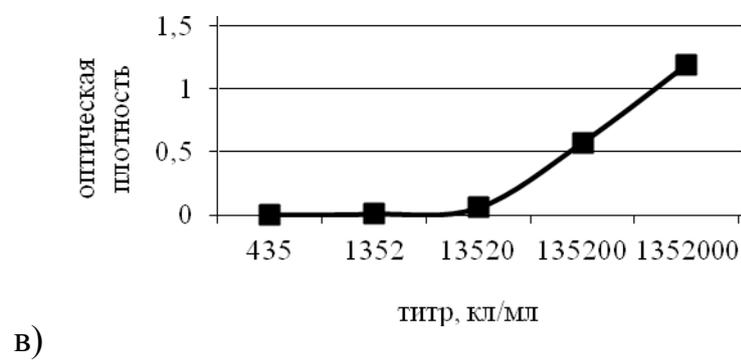
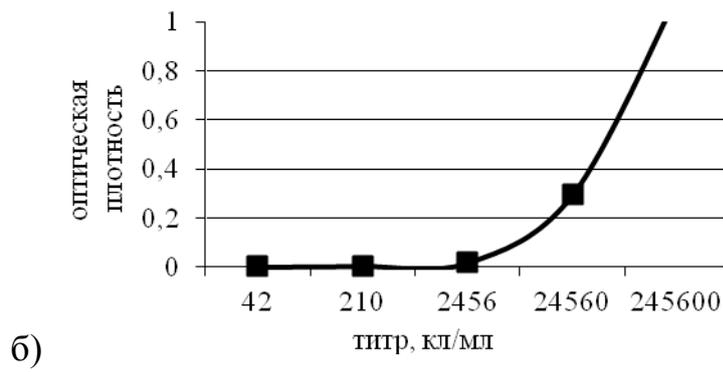
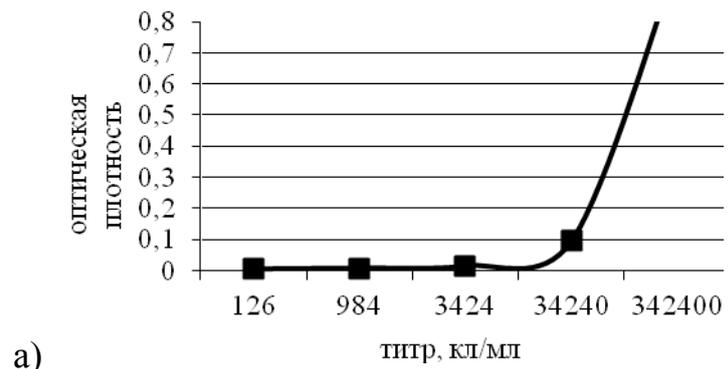
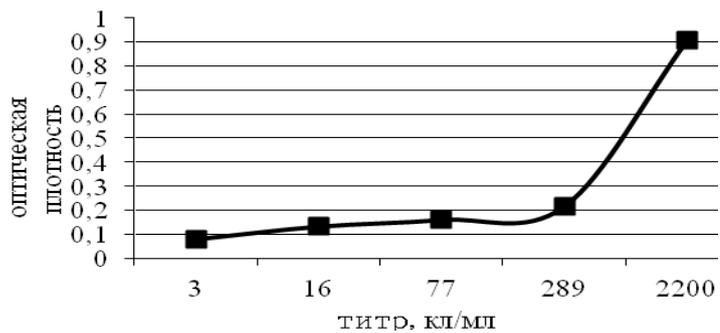
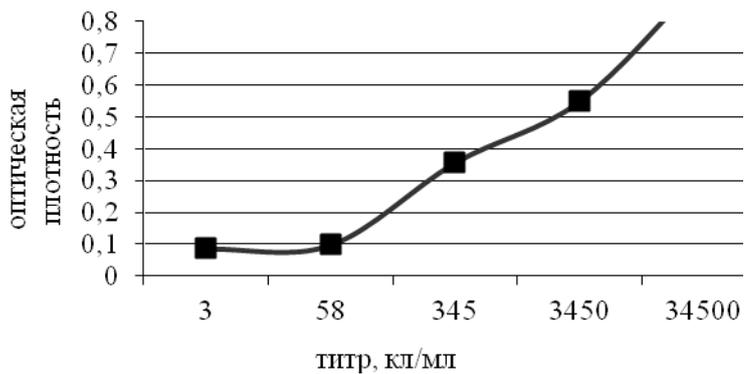


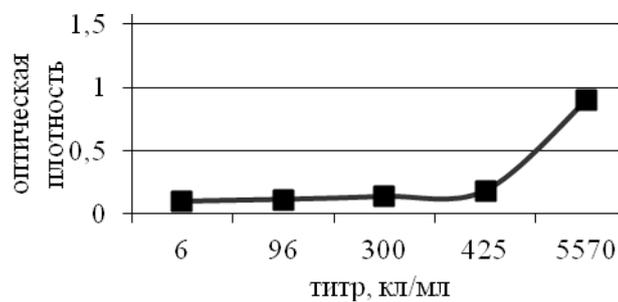
Рисунок А. 2 - Калибровочная кривая для культур TrP (а), PhabII (б), PhabV (в), AgIV (г)



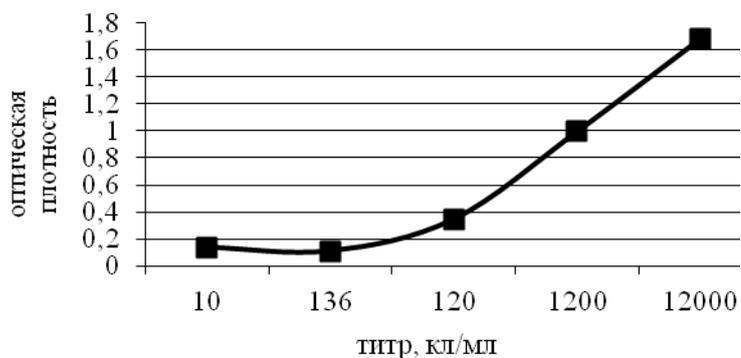
а)



б)

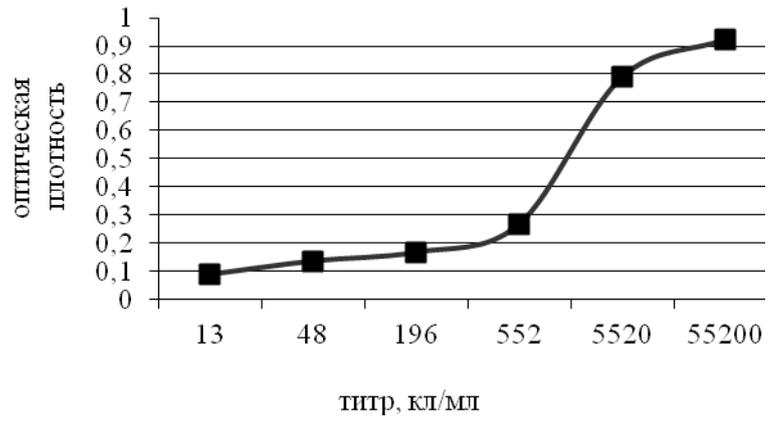


в)

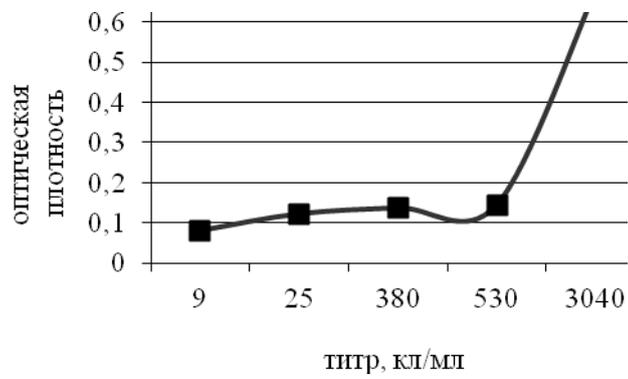


г)

Рисунок А.3 - Калибровочная кривая для культур Cm III (а), CmV (б), CmVI (в), CmVII (г)



а)



б)

Рисунок А.4 - Калибровочная кривая для культур CmVIII (а), CmIX (б)

Таблица 2 – Динамика веса мышей при исследовании токсигенности 3 –х суточных дрожжевых культур

Группы	Вес в начале эксперимента, г	Вес в конце эксперимента, г	Вес в начале эксперимента, г	Вес в конце эксперимента, г
	Объем фильтрата, мл			
	1,0	1,7	1,0	1,7
Контроль	19±0,33	19,1±0,35	20±0,28	20,4±0,32
1 (CmIII)	18,4±0,18	19,3±0,25	19,6±0,18*	20,3±0,31*
2 (CmVIII)	18,4±0,18	19±0,33	19,4±0,18*	20,1±0,4
3 (AgIV)	18,6±0,26	19,3±0,37	19,6±0,18*	20,3±0,37
4 (CmV)	19,4±0,26	19,1±0,35*	20±0,3	20,5±0,33*
5 (TrP)	18,9±0,3	19,7±0,46*	20±0,19*	21,3±0,31*
6 (PhabV)	19±0,33	19,4±0,53	20,6±0,26*	20,6±0,42

Примечание: * - $p \leq 0,05$ относительно веса соответствующей группы в начале эксперимента

Таблица 3 – Динамика веса мышей при исследовании токсигенности 7 - ми суточных дрожжевых культур

Группы	Вес в начале эксперимента, г	Вес в конце эксперимента, г	Вес в начале эксперимента, г	Вес в конце эксперимента, г
	Объем фильтрата, мл			
	1,0	1,7	1,0	1,7
Контроль	19 ± 0,35	18,9 ± 0,35	20 ± 0,33	19,8±0,25
1 (CmIII)	19,5 ± 0,53	19±0,38	20 ± 0,46	20±0,47*
2 (CmVIII)	18,9 ± 0,49	19,6±0,42	20,3 ± 0,37*	20,5±0,38*
3 (AgIV)	20 ± 0,6	19±0,33	20,5 ± 0,5	20,4±0,32*
4 (CmV)	19,6 ± 0,42	19,4±0,42	20,6 ± 0,32	20,3±0,45
5 (TrP)	19 ± 0,46	20±0,61	20,5 ± 0,33*	20,3±0,35
6 (PhabV)	19,3 ± 0,45	19±0,38	19,9 ± 0,44	20±0,46

Примечание: * - $p \leq 0,05$ относительно веса соответствующей группы в начале эксперимента

Приложение В

Динамика показателей роста группы *P. reticulate* при кормлении биомассой живых и автолизированных клеток дрожжевых штаммов

Таблица 4 – Динамика роста группы *P. reticulate* при добавлении биомассы живых и автолизированных клеток штамма Ag IV (*R. mucilaginosa*) к контрольным кормам

Группы	Продолжительность эксперимента, сутки											
	Посадка		7		14		21		28		35	
	м _{ср} , МГ	L _{ср} , ММ	м _{ср} , МГ	L _{ср} , ММ	м _{ср} , МГ	L _{ср} , ММ	м _{ср} , МГ	L _{ср} , ММ	м _{ср} , МГ	L _{ср} , ММ	м _{ср} , МГ	L _{ср} , ММ
«Tetra»	16,03± 0,08	11,12±0,07	19,85±0,2	12,68±0,09	23,92±0,1	14,27±0,15	30,98±0,4	15,23±0,09	41,2±0,36	17,98±0,09	51,1±0,6	24,48±0,22
Дафния	15,98± 0,1	10,93±0,06	18,9±0,1	12,1±0,05	22,93±0,19	13,83±0,08	29,8±0,32	14,95±0,03	38,9±0,56	17,4±0,19	58,87±0,2	22,65±0,34
1Ж	16±0,05	11±0,05	24,1±0,1*	13,7±0,07*	26±0,07*	14,8±0,1*	33±0,1*	15,7±0,08*	45,6±0,1*	18,8±0,06*	62,4±0,4*	24,3±0,3*
1 А	15,8± 0,3	10,8±0,2	23,6±0,3*	12,8±0,1*	25,7±0,2*	15,1±0,2*	32,9±0,2*	16±0,09*	45,2±0,3*	17,8±0,3*	62±0,4*	22,5±0,3*
2Ж	16±0,06	11±0,05	19±0,2*	12,4±0,1*	24±0,06*	13,8±0,08*	30,9±0,3*	15,5±0,2*	39,3±0,5*	17,9±0,2*	63,3±0,3*	23±0,3*
2 А	15,9± 0,1	11±0,2	22±0,5*	13,1±0,1*	25,2±0,3*	14,3±0,2*	32,3±0,4*	15,6±0,2*	40,9±0,5*	17,7±0,2*	62,1±0,4*	23±0,3*
3Ж	15,9±0,06	11±0,04	25,7±0,2*	14±0,06*	28,8±0,2*	15,5±0,1*	34,9±0,1*	15,7±0,08*	45,7±0,2*	19,6±0,1*	63,6±0,2*	24,8±0,4*
3 А	15,8±0,2	10,8±0,05	24,9±0,5*	14,1±0,2*	28,7±0,2*	15,5±0,2*	35,4±0,2*	16,1±0,1*	46,3±0,2*	18,5±0,2*	64±0,2*	25±0,08*
4Ж	16,05±0,07	11,1±0,05	20±0,7*	12,9±0,03*	24,6±0,1*	14,6±0,2*	33±0,4*	15,9±0,04*	39,8±0,5*	18,2±0,2*	63,8±0,3*	23,6±0,1*
4 А	15,9±0,09	11,1±0,05	22,2±0,4*	13,4±0,2*	25,9±0,4*	15,1±0,2*	34,6±0,3*	16,1±0,2*	44,3±0,5*	17,1±0,2*	63,5±0,2*	23,7±0,1*
5Ж	16,1±0,08	11,1±0,05	28,7±0,2*	14,2±0,1*	30,9±0,4*	15,9±0,03*	38,9±0,1*	16,4±0,2*	51,7±0,2*	21,7±0,2*	70,1±0,9*	24,9±0,4*
5А	15,9±0,07	11±0,07	29,2±0,2*	29,2±0,2*	31,9±0,3*	15,5±0,2*	40,3±0,2*	16,8±0,2*	52,5±0,3*	22,3±0,3*	71,5±0,9*	24,9±0,3*
6Ж	16±0,04	11±0,03	19,8±0,4*	13±0,05*	25,9±0,04*	15,4±0,2*	33,5±0,2*	16,4±0,1*	40,3±0,4*	18,8±0,2*	74,7±0,4*	25,4±0,2*
6 А	15,9±0,1	10,9± 0,1	23,3±0,4*	13,5±0,2*	27,2±0,3	16,1±0,1*	35,9±0,2*	16,6±0,2*	43,4±0,3*	19,5±0,2*	75,6±0,4*	26±0,2*

Примечание: Ж–живые клетки, А–автолизированные клетки, * - $p \leq 0.05$ относительно показателей в начале эксперимента в соответствующей группе; «1» -25%; «2» -50%; «3» -75% добавки к стандартному корму.

Таблица 5 – Динамика роста гуппи *P. reticulate* при добавлении биомассы живых и автолизированных клеток штамма PhabV(*W. anomalous*) к контрольным кормам

Группы	Продолжительность эксперимента, сутки											
	Посадка		7		14		21		28		35	
	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм
Tetra	16,03± 0,08	11,12±0,07	19,85±0,2	12,68±0,09	23,92±0,1	14,27±0,15	30,98±0,4	15,23±0,09	41,2±0,36	17,98±0,1	51,1±0,6	24,48±0,2
Дафния	15,98± 0,1	10,93±0,06	18,9±0,12	12,1±0,05	22,93±0,19	13,83±0,08	29,8±0,3	14,95±0,03	38,9±0,56	17,4±0,19	58,87±0,2	22,65±0,3
1Ж	16±0,06	11±0,05	25,3±0,2*	13,9±0,04*	26,8±0,2*	14,7±0,2*	35,9±0,06*	16,3±0,07*	50±0,1*	19±0,04*	63,7±0,2*	24,7±0,09*
1 А	16±0,06	10,9±0,05	26,7±0,6*	13,9±0,1*	27,8±0,2*	15,1±0,1*	36,6±0,2*	16,4±0,1*	50,6±0,7*	19,3±0,1*	64±0,2*	25±0,08*
2Ж	16±0,06	11,1±0,06	24,8±0,2*	13,6±0,03*	26±0,2*	14,7±0,09*	35,1±0,2*	16,1±0,1*	49,5±0,5*	19±0,09*	61,9±0,7*	24,1±0,3*
2 А	16±0,09	11±0,07	25,9±0,2*	13,9±0,06*	27,7±0,2*	15±0,2*	35±0,9*	16,6±0,1*	51±0,6*	19,5±0,2*	63,3±1,2*	24,9±0,4*
3Ж	16±0,06	11,1±0,04	26,7±0,25*	14,2±0,2*	29,7±0,2*	16±0,02*	36,8±0,1*	17,2±0,1*	48±0,3*	20,2±0,1*	68±0,3*	26,2±0,09*
3 А	16± 0,1	11±0,09	27,8±0,4*	14,2±0,2*	30,5±0,3*	16,2±0,08*	37,8±0,1*	17,4±0,1*	49,3±0,3*	20,6±0,3*	68,7±0,4*	26,7±0,2*
4Ж	16,1±0,09	11±0,05	20,2±0,4*	13,1±0,1*	25±0,05*	15,1±0,03*	33,8±0,2*	16,1±0,1*	41,4±0,2	19±0,08*	64,9±0,2*	24±0,1*
4 А	16,1±0,09	11±0,05	20,5±0,3*	13,7±0,09*	25,6±0,2*	14,6±0,2*	34,3±0,3*	16,3±0,1*	42,4±0,2	19±0,07*	65,3±0,2*	23,8±0,1*
5Ж	16,1±0,06	11,1±0,06	29,9±0,2*	14,8±0,09*	32,6±0,2*	16,2±0,1*	41±0,2*	16,5±0,4*	55,2±0,1*	22,5±0,2*	67±0,3*	23,9±0,3*
5А	16±0,06	11±0,04	31,2±0,4*	14,9±0,1*	33,8±0,3*	16,2±0,1*	42±0,3*	17,1±0,2*	56±0,3*	22,7±0,1*	68±0,2*	24,5±0,3*
6Ж	16,1±0,04	11,1±0,04	21,1±0,1*	13,4±0,05*	26,4±0,09*	16,1±0,04*	34±0,08*	16,9±0,03*	41,2±0,2*	19,1±0,1*	74±1,4*	24,6±0,3*
6 А	15,9±0,07	10,9±0,05	27,1±0,9*	13,8±0,1*	31,7±0,8*	15,8±0,3*	36,8±0,4*	16,5±0,1*	45,8±0,3*	18,4±0,1*	73,8±0,7*	25,1±0,4*

Примечание: Ж–живые клетки, А–автолизированные клетки, * - $p \leq 0.05$ относительно показателей в начале эксперимента в соответствующей группе; «1» -25%; «2» -50%; «3» -75% добавки к стандартному корму.

Таблица 6 – Динамика роста гуппи *P. reticulata* при добавлении биомассы живых и автолизированных клеток биомассы штамма TrP (*C. tanzawaensis*) к контрольным кормам

Группы	Продолжительность эксперимента, сутки											
	Посадка		7		14		21		28		35	
	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм
«Tetra»	16,03± 0,08	11,1±0,07	19,85±0,2	12,68±0,09	23,92±0,1	14,27±0,15	30,98±0,1	15,23±0,09	41,2±0,36	17,98±0,09	51,1±0,6	24,48±0,22
Дафния	15,98± 0,1	10,93±0,1	18,9±0,12	12,1±0,05	22,9±0,19	13,83±0,08	29,8±0,32	14,95±0,03	38,9±0,56	17,4±0,19	58,87±0,2	22,65±0,34
1Ж	16± 0,06	11,1±0,06	20,2±0,1*	14± 0,05*	25,3±0,6*	14,5±0,2*	28,4±0,5*	15±0,04*	34,9±0,2*	16,4±0,1*	49,5±0,2*	17,8±0,05
1 А	16± 0,07	11±0,1	21±0,2*	14,2±0,2*	25,7±0,5*	14,7±0,2*	29,4±0,3*	15,2±0,1*	35,4±0,3*	16,9±0,09*	50,4±0,3*	17,5±0,09*
2Ж	16± 0,05	11± 0,05	20,5±0,2*	13,6±0,03*	24,9±0,1*	13,9±0,4*	29,9±0,5*	15,3±0,1*	32,1±0,2*	15,9±0,3*	44,9±0,3*	17±0,2*
2 А	16,1± 0,05	11±0,06	21,2±0,3*	13,8±0,03*	25,4±0,2*	13,8±0,2*	30,6±0,5*	15,5±0,1*	32,6±0,3*	16,1± 0,06*	45,6±0,2*	17,2±0,1*
3Ж	16± 0,07	11± 0,05	23±0,3*	14±0,3*	23,8±0,2*	14,3±0,1*	31,3±0,6*	16±0,03*	42±0,2*	16,6±0,1*	55,7±0,2*	17,9±0,2*
3 А	16± 0,09	10,8±0,2	23,6±0,4*	14,1±0,08*	24,2±0,2*	14,2±0,2*	32±0,5*	16,1±0,08*	42±0,4*	16,4±0,1*	56,4±0,2*	18,1±0,3*
4Ж	16± 0,06	11± 0,05	20±0,3*	13,2±0,1*	23±0,4*	13,8±0,1*	29,3±0,3*	14,5±0,2*	37,4±0,5*	16,5±0,2*	57,7±1,1*	21,7±0,2*
4 А	15,8± 0,1	10,8±0,1	20,8±0,3*	13,1±0,3*	23,2±0,4*	14±0,2*	29,6±0,5*	14,7±0,08*	37,6±0,5*	16,6±0,2*	58,8±0,8*	21,4±0,2*
5Ж	16± 0,08	11,1±0,07	26,3±0,3*	14,4±0,2*	33,2±2,4*	14,9±0,09*	39,8±0,2*	15,4±0,3*	51,2±0,3*	19,5±0,3*	51,1±0,6*	21,5±0,2*
5А	16± 0,09	10,7±0,2	27±0,4*	14,2±0,2*	33,8±2,2*	15,1±0,2*	41,3±0,4*	14,6±0,1*	51,4±0,3*	18,8±0,3*	51,4±0,3*	21,2±0,1*
6Ж	16± 0,05	11,1±0,06	20,5±0,2*	13±0,04*	25,1±0,2*	13,7±0,1*	31,6±0,3*	14,5±0,2*	38,3±0,3*	16,1±0,1*	55,7±0,2*	21±0,1*
6 А	15,8± 0,2	10,9±0,1	21±0,3*	13,8±0,1*	25,4±0,4*	13,7±0,1*	32,1±0,4*	14,1±0,2*	39,1±0,3*	15,9±0,2*	54,6±0,9*	21,4±0,1*

Примечание: Ж–живые клетки, А–автолизированные клетки, * - $p \leq 0.05$ относительно показателей в начале эксперимента в соответствующей группе; «1» -25%; «2» -50%; «3» -75% добавки к стандартному корму.

Таблица 7– Динамика роста группы *P. reticulate* при добавлении биомассы живых и автолизированных клеток штамма Cm III (*C. lusitaniae*) к контрольным кормам

Группы	Продолжительность эксперимента, сутки											
	Посадка		7		14		21		28		35	
	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм
«Тетра»	16,03±0,1	11,1±0,07	19,85±0,2	12,68±0,09	23,92±0,1	14,27±0,15	30,98±0,4	15,23±0,09	41,2±0,36	17,98±0,09	51,1±0,6	24,48±0,22
Дафния	15,98± 0,1	10,9±0,06	18,9±0,1	12,1±0,05	22,9±0,19	13,83±0,08	29,8±0,32	14,95±0,03	38,9±0,56	17,4±0,19	58,87±0,2	22,65±0,34
1Ж	16±0,04	11,1±0,04	21,3±0,3*	12,9±0,09*	25,8±0,6*	14,4±0,1*	28,9±0,5*	15±0,04*	35,8±0,2*	16±0,09*	49,8±0,5*	19±0,1*
1 А	15,9±0,09	11±0,06	21,8±0,3*	13,1±0,09*	26,1±0,6*	14,5±0,1*	29,7±0,6*	15,1±0,1*	36,7±0,3*	15,8±0,2*	50,6±0,4*	18,4±0,2*
2Ж	16±0,05	11±0,04	20,8±0,3*	13,6±0,2*	25,1±0,3*	13,9±0,3*	30,7±0,8*	15±0,1*	34,6±0,2*	16,2±0,06*	43,4±0,5*	17,3±0,3*
2 А	15,9±0,2	10,9±0,1	21,2±0,2*	13,8±0,2*	25,5±0,3*	13,8±0,2*	31,4±0,8*	15±0,2*	35,1±0,3*	16,3±0,2*	44,5±0,5*	17,3±0,3*
3Ж	16±0,04	11±0,03	23,4±0,3*	13,5±0,2*	26,5±0,3*	14,7±0,1*	36,1±0,3*	16,1±0,2*	45,2±0,4*	17,1±0,1*	56,6±0,3*	19±0,07*
3 А	15,8± 0,1	11±0,06	24,5±0,6*	13,7±0,3*	27,1±0,4*	14,9±0,1*	36,7±0,5*	16,1±0,09*	45,7±0,5*	18,3±0,5*	56,9±0,3*	21,8±0,2*
4Ж	16±0,06	11,1±0,04	21,2±0,3*	13,1± 0,1*	24,7±0,3*	13,9±0,05*	31±0,4*	15±0,09*	37,8±0,5*	16,9±0,2*	56,1±1*	19,8±0,2*
4 А	16± 0,1	10,9±0,04	21,6±0,2*	13,3±0,2*	24,8±0,3*	14±0,1*	31,2±0,4*	15,2±0,1*	38,8±0,7*	16,8±0,2*	56,3±1*	20,5±0,5*
5Ж	16±0,07	11±0,05	26,9±0,3*	14±0,07*	34,4±2,2*	15,5±0,3*	40,8±0,3*	15±0,1*	50,2±0,4*	19,1±0,1*	62,1±0,6*	20,6±0,2*
5А	15,8±0,2	11±0,07	27,2±0,2*	14,1±0,09*	34,4±2,2*	15,5±0,3*	41,7±0,2*	15,1±0,1*	50,8±0,3*	19±0,2*	62±0,6*	20,7±0,2*
6Ж	16,1±0,05	11,1±0,04	21,6±0,3*	13,3± 0,1*	26,6±0,2*	13,8±0,2*	32,8±0,3*	14,8±0,09*	39,2±0,3*	15,1±0,04*	57,3±0,3*	18,8±0,08*
6 А	16± 0,1	11±0,1	22,7±0,6*	13,6±0,2*	27±0,2*	13,9±0,2*	33,6±0,6*	15±0,09*	39,4±0,4*	16,9±0,5*	57,5±0,5*	22,1±0,3*

Примечание: Ж–живые клетки, А–автолизированные клетки, * - $p \leq 0.05$ относительно показателей в начале эксперимента в соответствующей группе; «1»- 25%; «2»-50%; «3»-75% добавки к стандартному корму.

Таблица 8 – Динамика роста гуппи *P. reticulata* при добавлении биомассы живых и автолизированных клеток штамма Cm V (*W. anomalous*) к контрольным кормам

Группы	Продолжительность эксперимента, сутки											
	Посадка		7		14		21		28		35	
	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм	m _{ср} , мг	L _{ср} , мм
«Tetra»	16,03±0,08	11,1±0,07	19,85±0,2	12,68±0,09	23,92±0,1	14,27±0,15	30,98±0,4	15,23±0,09	41,2±0,36	17,98±0,09	51,1±0,6	24,48±0,2
Дафния	15,98±0,1	10,9±0,06	18,9±0,12	12,1±0,05	22,9±0,19	13,83±0,08	29,8±0,32	14,95±0,03	38,9±0,56	17,4±0,19	58,87±0,2	22,7±0,34
1Ж	16±0,07	11±0,07	20,2±0,3*	13,1±0,1*	25,5±0,6*	14,2±0,1*	30,6±1,1*	14,8±0,1*	39,8±0,4*	17±0,05*	51,2±1*	20,2±0,5*
1 А	15,9±0,1	11±0,09	20,4±0,3*	13,2±0,1*	25,9±0,6*	14,2±0,2*	30,4±0,8*	14,8±0,1*	40,3±0,3*	17,2±0,2*	51,9±1*	20,3±0,6*
2Ж	15,9±0,07	11±0,08	19,7±0,3*	13,7±0,1*	25,8±0,5*	14,1±0,1*	31,8±0,8*	15±0,1*	36,5±0,7*	16±0,2*	47,1±0,3*	19,2±0,6*
2 А	16±0,1	11±0,1	20,2±0,6*	14,2±0,2*	26,4±0,6*	14,3±0,1*	32,5±1*	15,3±0,4*	37,2±0,6*	16,3±0,3*	48,1±0,6*	19,9±0,4*
3Ж	16±0,07	11±0,03	23,3±0,3*	13,5±0,1*	27,1±0,1*	14,4±0,1*	37±0,5*	16,2±0,2*	45,7±0,4*	16,7±0,2*	55,3±1,1*	19,1±0,2*
3 А	15,8±0,1	11±0,08	25,1±0,8*	13,7±0,09*	27,8±0,2*	14,5±0,08*	37,4±0,6*	16,2±0,2*	46,6±0,6*	17±0,2*	55±0,7*	18,6±0,2*
4Ж	16±0,06	11±0,02	20,7±0,4*	13±0,06*	24,8±0,1*	13,9±0,07*	31,7±0,5*	14,8±0,1*	37,7±0,4*	16,4±0,2*	53,2±1,3*	19,1±0,6*
4 А	15,9±0,1	10,9±0,09	21,3±0,4*	13±0,06*	25,5±0,3*	14±0,1*	32,4±0,6*	14,9±0,2*	37±0,9*	16,4±0,1*	54,6±0,8*	21,8±0,4*
5Ж	16,1±0,05	11,1±0,05	27,5±0,2*	14,4±0,1*	36,7±2*	15,5±0,2*	42,7±0,6*	16,2±0,1*	49,4±0,3*	17,7±0,06*	61±0,4*	20,3±0,4*
5А	16,1±0,05	11,1±0,05	27,5±0,2*	14,4±0,1*	36,7±2*	15,5±0,2*	42,7±0,6*	16,2±0,1*	49,4±0,3*	17,7±0,06*	61,6±0,6*	20,5±0,4*
6Ж	16±0,05	11±0,04	21,1±0,07*	13,1±0,06*	26,9±0,4*	14,2±0,3*	39,3±1,7*	15,2±0,1*	47,3±0,4*	16±0,2*	54,9±0,1*	21,2±0,2*
6 А	15,9±0,1	10,9±0,1	21,3±0,3*	13,3±0,09*	27,6±0,3*	14,3±0,3*	39,7±1,7*	15,3±0,1*	47,9±0,8*	16±0,2*	54,7±0,2*	21,5±0,4*

Примечание: Ж–живые клетки, А–автолизированные клетки, * - $p \leq 0.05$ относительно показателей в начале эксперимента в соответствующей группе; «1»- 25%; «2»-50%; «3»-75% добавки к стандартному корму.

Таблица 9 – Динамика роста гуппи *P. reticulata* при добавлении биомассы живых и автолизированных клеток штамма Cm VIII (*R. mucilaginosa*) к контрольным кормам

Группы	Продолжительность эксперимента											
	Посадка		7 –е сутки		14 –е сутки		21 – е сутки		28 – е сутки		35 – е сутки	
	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм	м _{ср} , мг	L _{ср} , мм
«Тетра»	16 ± 0,08	11,1±0,07	19,85±0,2	12,68±0,09	23,92±0,1	14,27±0,15	30,98±0,4	15,23±0,09	41,2±0,36	17,98±0,1	51,1±0,6	24,48±0,2
Дафния	16 ± 0,1	10,9 ±0,06	18,9±0,12	12,1±0,05	22,9±0,19	13,83±0,08	29,8±0,32	14,95±0,03	38,9±0,56	17,4±0,19	58,87±0,2	22,65±0,3
1Ж	16± 0,07	11,1± 0,08	24,2±0,1*	13,6±0,2*	26,8±0,4*	14,8±0,04*	32,4±0,3*	15,2±0,08*	43,7±0,8*	18,1±0,1*	62,9±0,7	24,3±0,2*
1 А	15,9±0,09	11±0,1	24,6±0,3*	13,7±0,2*	26,7±0,4*	14,9±0,08*	33,1±0,4*	15,3±0,08*	43,9±0,9*	18,2±0,2*	63,7±0,5	24,8±0,3*
2Ж	16± 0,07	11±0,03	18,6±0,3*	12,2±0,1*	24,3±0,2*	14±0,04*	29,9±0,2*	15± 0,07*	39,1±0,6*	17,5±0,2*	61,7±0,3	20±0,2*
2 А	15,9±0,1	10,9±0,1	19,1±0,4*	12,3±0,1*	25,3±0,3*	14± 0,07*	30,1±0,3*	15±0,08*	39,2±0,6*	17,6±0,2*	61,9±0,4	20,1±0,2*
3Ж	15,9± 0,1	11±0,04	24,2±0,4*	13,8± 0,07*	28,6±0,3*	15±0,1*	35±0,7*	15,8±0,1*	46,1±0,3*	18,6±0,2*	65,6±0,9	24±1,1*
3 А	15,6±0,2	10,9±0,09	24,6±0,3*	13,9±0,1*	27,9±0,5*	15,1±0,2*	35,7±0,5*	15,8±0,1*	46,1±0,3*	16±2,8*	65,8±0,9	25,3±0,5*
4Ж	16± 0,06	11,1± 0,05	20,7±0,5*	13± 0,05*	24,3±0,2*	13,9±0,04*	34,1±1*	15±0,1*	41,2±1,6*	16,7±0,1*	62,4±0,6	24,1±0,4*
4 А	16± 0,05	11±0,1	21±0,6*	13±0,09*	25±0,4*	14±0,2*	35±0,9*	15±0,1*	42±1,6*	16,5±0,2*	63,4±0,5	24,1±0,4*
5Ж	16± 0,07	11±0,04	26,6±0,4*	14± 0,08*	30,5±0,5*	15,1±0,08*	38,6±0,4*	15,7±0,2*	51,2±0,2*	21±0,2*	63,9±0,6	21,7±0,2*
5А	15,9±0,1	10,9± 0,08	26,9±0,3*	14,3±0,2*	31±0,6*	15,2±0,1*	39±0,6*	16±0,2*	52±0,5*	21,5±0,3*	64,1±0,6	22,1±0,3*
6Ж	16± 0,05	11±0,06	20,8±0,4*	13,6±0,1*	25,3±0,2*	14,3±0,1*	33,2±0,8*	15,1± 0,07*	40,2±0,7*	17±0,2*	60,9±0,7	21,4±0,2*
6 А	15,7±0,1	10,8±0,1	21,4±0,6*	13,7±0,2*	26,3±0,3*	14,5±0,2*	34,7±1,3*	15,4±0,1*	41,6±1,1*	17,2±0,2*	61,4±0,5	21,5±0,1*

Примечание: Ж–живые клетки, А–автолизированные клетки, * - $p \leq 0.05$ относительно показателей в начале эксперимента в соответствующей группе; «1» -25%; «2» -50%; «3» -75% добавки к стандартному корму.

Таблица 10 – Средние показатели удельной скорости роста и прироста биомассы группы *P. reticulata* при добавлении биомассы живых и автолизированных клеток дрожжей к контрольным кормам

Группы	Дрожжевые культуры											
	Ag IV		Phab V		TrP		Cm III		Cm V		Cm VIII	
	Cw, %	Sp, мг	Cw, %	Sp, мг	Cw, %	Sp, мг	Cw, %	Sp, мг	Cw, %	Sp, мг	Cw, %	Sp, мг
«Тетра»	3,15±0,05	35,07±0,6	3,15±0,05	35,07±0,6	3,15±0,05	35,07±0,6	3,15±0,05	35,07±0,6	3,15±0,05	35,07±0,6	3,15±0,05	35,07±0,6
Дафния	3,7±0	42,9±0,25	3,7±0	42,9±0,25	3,7±0	42,9±0,25	3,7±0,1	42,9±0,25	3,7±0	42,9±0,25	3,7±0	42,9±0,25
1Ж	3,75±0,05*	46,3±0,35*	3,95±0,1*	47,8±0,1*	3,0±0,04*	33,5±0,23	3,1±0,02	33,8±0,48	3,3±0,07*	35,3±0,99*	3,8±0,06*	46,9±0,6*
1 А	3,8±0,06*	46,1±0,5*	3,9±0,06*	47,97±0,3*	3,13±0,03	34,4±0,38	3,2±0,05*	34,65±0,4	3,25±0,1*	36±0,99*	3,9±0,05*	47,8±0,45*
2Ж	3,8±0,06*	47,3±0,35*	3,8±0,05*	45,87±0,7*	2,9±0	28,89±0,3	2,85±0,05	27,4±0,53	3,0±0,04*	31,2±0,31	3,7±0*	45,8±0,3*
2 А	3,75±0,05*	41,2±4,82*	3,9 ±0,1*	47,32±1,1*	2,9±0,02	29,5±0,25	2,97±0,04	28,55±0,6	3,0±0,04*	32,15±0,56	3,8±0,05*	46,05±0,49*
3Ж	3,9±0,06*	47,7±0,17*	4±0*	51,9±0,28*	3,4±0*	39,9±0,2*	3,5±0,05*	40,6±0,3*	3,4±0,08*	39,27±1,1*	3,95±0,1*	49,7±0,9*
3 А	4,05±0,05*	48,25±0,2*	4,1±0,06*	52,75±0,4*	3,5±0,05*	40,4±0,19	3,6±0,1*	41,1±0,4*	3,5±0,06*	39,27±0,7*	4,1±0,1*	50,15±0,88*
4Ж	3,9±0,06*	47,7±0,24*	4±0*	48,9±0,29*	3,5±0,05*	41,75±1,1	3,5±0,05*	40,1±0,1*	3,3±0,06*	37,3±1,28*	3,8±0,05*	46,3±0,6*
4 А	3,9±0,06*	47,58±0,2*	4±0*	49,3±0,27*	3,7±0,08	43,0±0,8*	3,55±0,1*	40,3±1,0*	3,4±0*	38,7±0,67*	3,8±0,06*	47,35±0,51*
5Ж	4,2±0,06*	54,0±0,95*	4±0*	51,1±0,37*	3,15±0,05	35,07±0,6	3,9±0,05*	46,1±0,6*	3,7±0*	44,88±0,4*	3,9±0,06*	48±0,5*
5А	4,25±0,05*	55,52±0,9*	4±0*	51,95±0,2*	3,5±0,07*	35,4±0,29	3,9±0,07*	46,2±0,5*	3,8±0,05*	45,5±0,58*	4±0,08*	48,2±0,69*
6Ж	4,3±0*	58,6±0,45*	4,3±0,1*	57,83±1,4*	3,4±0,02*	39,68±0,2	3,46±0,1*	41,2±0,3*	3,4±0*	38,88±0,1*	3,7±0*	44±0,8*
6 А	4,3±0*	59,9±0,6*	4,3±0*	57,85±0,7*	3,4±0,02*	38,8±0,72	3,46±0,1*	41,2±0,4*	3,46±0,1*	38,8±0,23*	3,9±0,07*	45,74±0,76*

Примечание: Ж–живые клетки, А–автолизированные клетки, * - $p \leq 0.05$ относительно показателей в начале эксперимента в соответствующей группе; «1» -25%; «2» -50%; «3» -75% добавки к стандартному корму.

Приложение Г

Справки о депонировании идентифицированных дрожжевых штаммов



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62

Выдано в ФГБОУ ВО "Астраханский
государственный технический
университет"

del. 10 del. № 484/10

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
(RCAM)

- 1.Депозитор:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет", 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 16
- 2.Авторы:** Храпова А.В., Сопрунова О.Б.
- 3.Штамм *Candida tanzawaensis* TrP** обладает способностью к накоплению этанола, а также биомассы для получения кормового белка.
- 4. Штамм *Candida tanzawaensis* TrP** депонирован 09 октября 2018 г. под регистрационным номером **RCAM04985**.
- 5. Адрес коллекции:** 196608, Санкт - Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812) 470-51-00, факс (812) 470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru.

Информация о штамме доступна на сайте <http://www.arriam.ru/>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ,
д.б.н.

Заведующая RCAM, к.б.н.



Н.А. Проворов

В.И. Сафронова

Рисунок Б.1 – Справка о депонировании штамма *C. tanzawaensis*



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62

Выдано в ФГБОУ ВО "Астраханский
государственный технический
университет"

22.10.2018 № 485/10

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
(RCAM)

1. **Депозитор:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет", 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 16

2. **Авторы:** Храпова А.В., Сопрунова О.Б.

3. **Штамм *Wickerhamomyces anomalus* Phab V** обладает способностью к накоплению этанола, а также биомассы для получения кормового белка.

4. **Штамм *Wickerhamomyces anomalus* Phab V** депонирован 09 октября 2018 г. под регистрационным номером **RCAM04986**.

5. **Адрес коллекции:** 196608, Санкт - Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812) 470-51-00, факс (812) 470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru.

Информация о штамме доступна на сайте <http://www.aggiam.ru/>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ,
д.б.н.

Заведующая RCAM, к.б.н.



Н.А. Проворов

В.И. Сафронова

Рисунок Б.2 – Справка о депонировании штамма *W. anomalus*



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62

Выдано в ФГБОУ ВО "Астраханский
государственный технический
университет"

22.10.2018 № 486/10

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
(RCAM)

1.Депозитор: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет", 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 16

2.Авторы: Храпова А.В., Сопрунова О.Б.

3.Штамм *Clavispora lusitaniae* CmIII обладает способностью к накоплению биомассы для получения кормового белка.

4. Штамм *Clavispora lusitaniae* CmIII депонирован 09 октября 2018 г. под регистрационным номером **RCAM04987**.

5. Адрес коллекции: 196608, Санкт - Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812) 470-51-00, факс (812) 470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru.

Информация о штамме доступна на сайте <http://www.arriam.ru/>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ,
д.б.н.

Заведующая RCAM, к.б.н.



Н.А. Проворов

В.И. Сафронова

Рисунок Б.3 – Справка о депонировании штамма *C. lusitaniae*



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62

Выдано в ФГБОУ ВО "Астраханский
государственный технический
университет"

22.10.2018 № *484/10*

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной коллекции
полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения
(RCAM)

1. **Депозитор:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Астраханский государственный технический университет", 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 16

2. **Авторы:** Храпова А.В., Сопрунова О.Б.

3. **Штамм *Rhodotorula mucilaginosa* AgIV** обладает способностью к накоплению этанола, а также биомассы для получения кормового белка.

4. **Штамм *Rhodotorula mucilaginosa* AgIV** депонирован 19 октября 2018 г. под регистрационным номером **RCAM05019**.

5. **Адрес коллекции:** 196608, Санкт - Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812) 470-51-00, факс (812) 470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru.

Информация о штамме доступна на сайте <http://www.arriam.ru/>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ,
д.б.н.

Заведующая RCAM, к.б.н.



Н.А. Проворов

В.И. Сафронова

Рисунок Б.4 – Справка о депонировании штамма *R. mucilaginosa*