



ИЗУЧЕНИЕ РАБОТЫ ДРОЖЖЕЙ В ТЕСТЕ

Уралова Муштарий

Специализированная школа имени Абу Али ибн Сины

АННОТАЦИЯ

Дрожжи способны синтезировать широкий спектр каротиноидов, а также обладают способностью в процессе ферментации накапливать достаточное количество биомассы и расти на относительно дешевых средах, эта группа эукариотных микроорганизмов занимает прочные позиции в современной биотехнологии, в том числе и в области микробиологического синтеза каротиноидов.

Ключевые слова: пробиотик, дрожжи, *Rhodotorula benthica*, питательные среды, культуральные свойства, культивирование.

Среди дрожжей имеются окрашенные в желтый, розовый, красный цвета, что обусловлено наличием в клетках пигментов – каротиноидов. В настоящее время некоторые из этих дрожжей (виды рода родоторула – *Rhodotorula*) используют для получения кормовых белково-каротиноидных препаратов, которые являются источником витамина А для животных [1].

В условиях недостатка традиционного кормового ресурса на основе микроводорослей представляется целесообразным и востребованным предприятиями аквакультуры использовать препараты на основе пробиотиков, которые представляют собой живые организмы и (или) вещества микробного происхождения, повышающие активность иммунной системы, принимающие активное участие в процессах пищеварения, способствующие восстановлению естественной микрофлоры.

В отличие от традиционных хлебопекарных и пивных, красные дрожжи *Rhodotorula* в своем составе имеют высокую концентрацию астаксантина и каротина, которые повышают иммунитет и выживаемость трепанга как на личиночных стадиях, так и после оседания [3].

В связи с тем, что дрожжи способны синтезировать широкий спектр каротиноидов, а также обладают способностью в процессе ферментации накапливать достаточное количество биомассы и расти на относительно дешевых средах, эта группа эукариотных микроорганизмов занимает прочные позиции в современной биотехнологии, в том числе и в области



микробиологического синтеза каротиноидов. В литературе описаны результаты научных исследований по изучению направленного синтеза каротиноидных пигментов красными дрожжами *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula acheniorum* и *Rhodotorula graminis*. Эти дрожжи, широко распространенные в природе, могут биосинтезировать определенные каротиноиды, такие как β -каротин, торулен и торулародин, в разных пропорциях.

Японскими учеными проводились исследования по распределению дрожжей в глубоководной среде в северо-западной части Тихого океана, в ходе которых обнаружены новые штаммы *Rhodotorula benthica* («ben'thi.ca» из бентоса, флоры и фауны глубокого моря), выделенные из донных организмов. На агаре Сабуро при 25 °С культура имеет светло-розовый цвет, блестящая, мягкая со слизистой поверхностью и имеет ровный край [6].

Как показывает практика, в Китае уже давно успешно применяют морские дрожжи родов *Rhodotorula benthica* в качестве кормовой пробиотической добавки для культивируемых гидробионтов.

Однако отсутствие сведений по вопросу каротиногенеза относительно дрожжей *R. benthica* предопределяет целесообразность создания коллекции штаммов и дальнейшего поиска условий культивирования с целью последующего использования в качестве высокоэффективного биотехнологического агента.

Целью настоящей работы являлось выделение чистой культуры *Rhodotorula benthica* и изучение культуральных особенностей роста на плотных питательных средах.

Для реализации цели поставлены следующие задачи:

- провести анализ научной литературы в области культивирования дрожжей *Rhodotorula spp.*, выбор на его основе питательных сред;
- выделить чистую культуру *Rhodotorula benthica*;
- дать сравнительную оценку питательных сред по ростовым качествам.

Источником выделения культуры дрожжей *Rhodotorula benthica* стала кормовая добавка (Китай).

Культуральные свойства микроорганизмов исследуют, как правило, при работе с чистой культурой. Выделение чистой культуры состоит из нескольких этапов: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры и определение чистоты выделенной культуры.



В лабораторных условиях проделано два экспериментальных опыта, общие схемы которых приведены на рис. 1, 2.

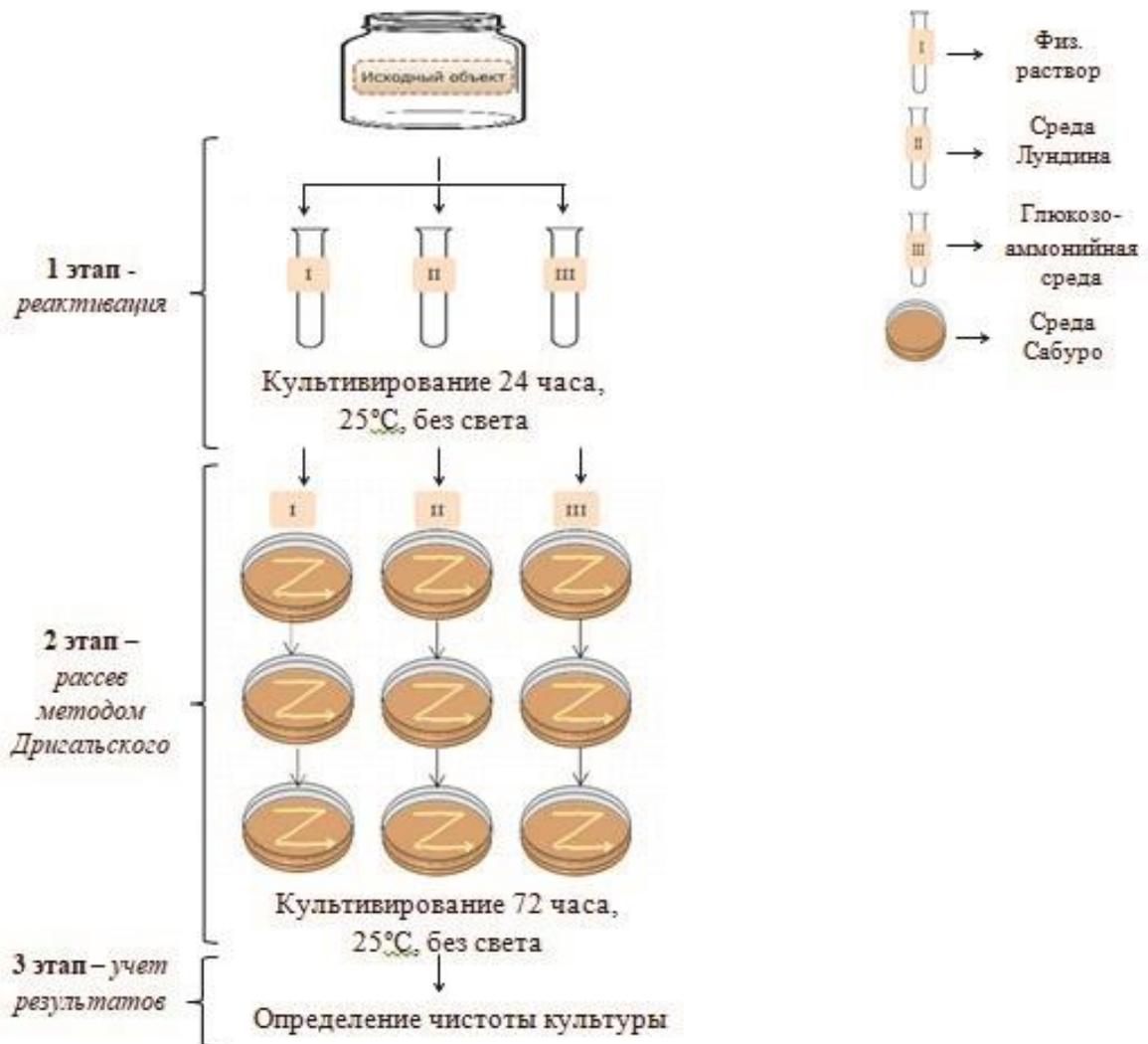


Рис. 1. Схема экспериментальных исследований по реактивации и выделению культуры дрожжей *Rhodotorula benthica*

Fig. 1. Scheme of experimental studies of the yeast culture *Rhodotorula benthica* reactivation and isolation

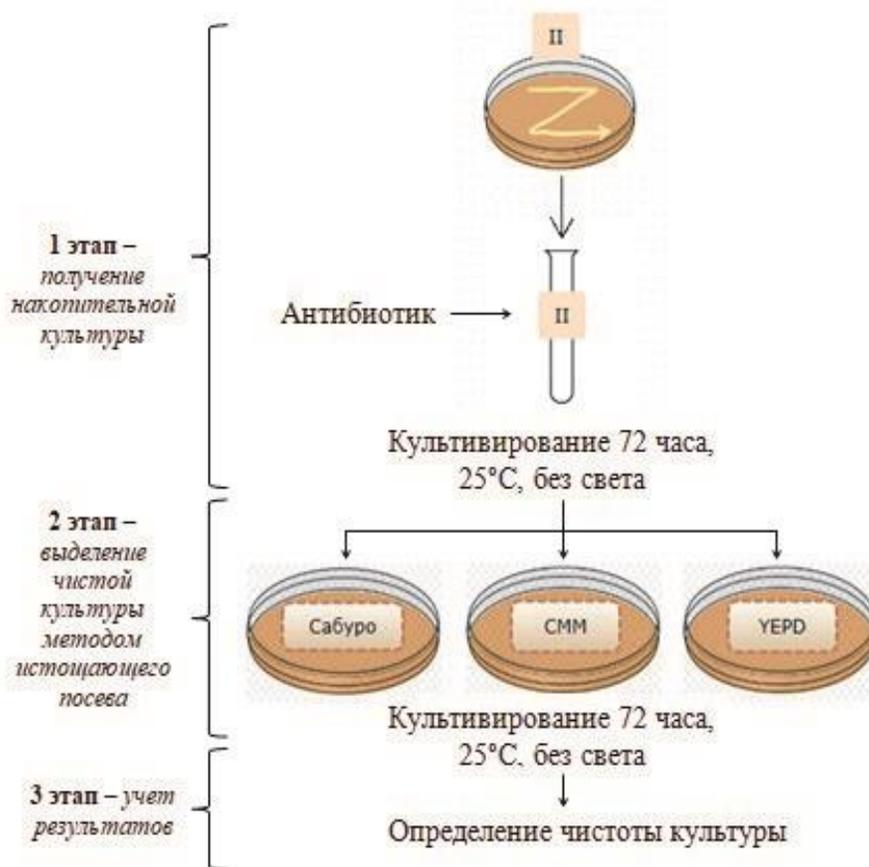


Рис. 2. Схема выделения чистой культуры *Rhodotorula benthica* на плотные среды Fig. 2. Scheme of isolation of pure yeast culture *Rhodotorula benthica* on solid media

Согласно схеме (рис. 1) опыт определен как реактивация, поскольку исходный материал – пробиотик, предполагающий наличие живых клеток продуцента.

В ходе эксперимента применяли стандартные методы, получившие наибольшее распространение в микробиологической практике – метод Дригальского, метод истощающего посева. Определение чистоты выделенной культуры осуществляли визуально, при этом отмечались культуральные особенности роста на плотных питательных средах [7].

В табл. 1 приведен рецептурный состав стандартных и экспериментальных питательных сред, растворов, выбранных путем анализа научной литературы.



Таблица 1

Рецептуры питательных сред и растворов**Table 1 Recipes of media and solutions**

Компоненты, г/л	Физ. раствор [8]	Среда Лундина [8]	Глюкозоаммонийная среда [10]	Сабуро [8]	Среда морских микроорганизмов (СММ) [11]	Среда для роста дрожжей (YEPD) [12]
1	2	3	4	5	6	7
NaCl	8,5	0,5	0,1	–	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	1,0	5,0	–	–	–

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
KH ₂ PO ₄	–	1,0	1,0	–	–	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	–	1,0	0,5	–	1,0	–
FeCl ₃ ·7H ₂ O 1% р-р	–	1 см ³	–	–	–	1 см ³
CaCO ₃	–	–	–	–	1,0	–
CaCl ₂	–	–	0,1	–	–	–
K ₂ HPO ₄	–	–	0,15	–	0,2	–
Сахароза	–	40,0	–	–	–	–
Глюкоза	–	–	40	40,0	1,0	20,0
Дрожжевой экстракт	–	–	0,5	–	5,0	10,0
Пептон	–	–	–	10,0	5,0	20,0
Агар	–	–	–	20,0	15,0	15,0

На рис. 3 приведены результаты посева шпателем Дригальского на плотную среду Сабуро, произведенные согласно схеме (см. рис. 1).



Рис. 3. Результаты выделения культуры дрожжей *Rhodotorula benthica* методом Дригальского (на фото демонстрация 3-й чашки): I – физ. раствор; II – среда Лундина; III – глюкозоаммонийная среда

Fig. 3. The results of the isolation of *Rhodotorula benthica* yeast culture by the Drigalski method (photo shows a 3rd cup): I – physical solution; II – Lundin's medium; III – glucoseammonium medium

После реактивации и выделения культуры дрожжей при визуальном контроле на среде

Сабуро через 72 ч культивирования просматривался рост микроорганизмов с типичными для *Rhodotorula benthica* колониями: пигментация светло-розовая, форма колоний округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, края ровные, структура однородная, консистенция слизистая, размер 1–3 мм в диаметре. Отмечено также присутствие посторонней споровой микрофлоры в виде белых, точечных колоний с шероховатой поверхностью, что свидетельствует о зараженности исходного материала. Преобладание роста посторонних микроорганизмов наблюдалось при использовании для реактивации физиологического раствора и глюкозоаммонийной среды. Состав среды Лундина оказался наиболее селективным, обеспечивающим преимущественное развитие выделяемых микроорганизмов.

Поэтому второй этап экспериментальной работы по выделению чистой культуры продолжен с выросшими изолированными колониями образца II.

На рис. 4 представлены результаты посевов штрихами, произведенных согласно схеме

(см. рис. 2).



Рис. 4. Результаты выделения чистой культуры дрожжей *Rhodotorula benthica* на плотные среды: а – Сабуро; б – СММ; в – YEPR

Fig. 4. Results of isolation of pure yeast culture *Rhodotorula benthica* on solid media: a – Saburo; б – CMM; в – YEPR

К культуральным свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных или жидких питательных средах. По результатам исследования составлена карта (табл. 2) выявленных признаков выделенных штаммов культуры дрожжей *Rhodotorula benthica* на плотных стандартных и экспериментальных средах.

Таблица 2 Культуральные свойства выделенной чистой культуры дрожжей *Rhodotorula benthica*

Table 2

Cultural properties of the selected pure culture of *Rhodotorula benthica* yeast

Наименование питательной среды	Характеристика колоний					
	Размер	Форма, профиль	Поверхность	Цвет	Край	Консистенция
Сабуро	Мелкие 1–2 мм	Округлая, выпуклая	Блестящая	Светлорозовый	Ровный	Однородная
СММ	Средние 3–4 мм	Округлая, выпуклая	Блестящая	Светлорозовый	Ровный	Однородная
YEPR	Крупные 5–6 мм	Округлая, конусовидная	Матовая	Коралловый	Ровный	Однородная



Из данных рис. 4 и табл. 2 следует, что выделенная культура дает обильный рост на экспериментальной питательной среде YEPD и обеспечивает наилучшие условия для биосинтеза каротиноидов, о чем свидетельствует выраженная пигментация. При этом стоит отметить, что при культивировании на плотных средах Сабуро и СММ образуются колонии S-типа, тогда как изменение поверхности, профиля и размера колоний на среде YEPD свидетельствует о явлении диссоциации.

Ионы и соли металлов (Ba, Fe, Mg, Ca, Zn и Co) являются стимуляторами каротиногенеза дрожжами *Rhodotorula* spp. [13]. Данным фактом можно объяснить наилучшие результаты при реактивации и выделении чистой культуры *Rhodotorula benthica* на средах Лундина и YEPD, поскольку в их состав входит 1% р-р $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Таким образом, в ходе проделанной экспериментальной работы выделена чистая культура *Rhodotorula benthica* и изучены ее культуральные особенности на плотных стандартных и экспериментальных средах. На основе полученных результатов предполагается ведение дальнейших разработок по регулированию биотехнологических параметров штамма дрожжей *Rhodotorula benthica*.

Список литературы

1. Мудрецова-Висс К.А., Дедюхина В.П. Микробиология, санитария и гигиена. 4-е изд., испр. и доп. М.: Форум: ИНФРА-М, 2009. 399 с.
2. Перспективные пробиотики для осетровых рыб / И.В. Бурлаченко, Н.В. Судакова, Е.И. Балакирев, Д.А. Мордовцев, Е.В. Малик // Рыб. хоз-во. 2006. № 3. С. 12–16.
3. Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* / Ji-hui Wang, Liuqun Zhao, Jin-feng Liu, Han Wang, Shan Xiao // Fish & Shellfish Immunology. 2015. Vol. 43, Issue 2. P. 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.028>.
4. Sandman G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application // Arch.Biochem. and Biophys. 2001. Vol. 385. P. 4–12.
5. Mata-Gómez, L.C, Montañez, J.C, Méndez-Zavala, A.et al. Биотехнологическое производство каротиноидов дрожжами: обзор. Microb Cell Fact 13, 12. 2014. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>.



6. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean / T.Nagahama, M. Namamoto, T.Nakase, H.Takami, K. Horikoshi // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001a. 80. P. 101–110.
7. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: практ. пособие / под ред. Н.С. Егорова. 2-е изд. М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1983. 215 с.
8. ГОСТ 10444.1-84. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе. М.: Стандартинформ, 2010. 17 с.
9. Кирица Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования: дис. ... доктора биол. наук по спец. 03.00.23-биотехнология. Кишинев, 2005. 128 с.
10. Фараджева Е.Д., Болотов Н.А. Производство хлебопекарных дрожжей: практ. руководство. СПб.: Изд-во «Профессия», 2002. 167 с.
11. Youchimizu M., Kimura T. Study of intestinal microflora of Salmonids // *Fish Pathol*. 1976. Vol. 10, № 2. P. 243–259.
12. Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment / Vytautas Melvydas, Ramune Staneviciene, Algima Balynaite, Jurate Vaiciuniene, Rasa Garjonyte // *Microbiological Research*. 2016. Vol. 193. P. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.007>.
13. Effect of barium and other metals on the growth of a D-lactic acid assimilating yeast *Rhodotorula glutinis* N 21 / Komemushi S, Sakaki H, Yokoyama H, Fujita T // *J Antibact Antifung Agt*. 1994. P. 583–587.

Сведения об авторах: Панчишина Екатерина Мироновна, кандидат технических наук, доцент, e-mail: panchishina.em@dgtru.ru;

Корниенко Надежда Леонидовна, младший научный сотрудник, e-mail: KornienkoNL@mail.ru;

Шадрина Екатерина Васильевна, кандидат технических наук, e-mail: shadrina.ev@dgtru.ru.