

Оригинальная статья / Original article  
УДК 597.2.5; 664.2.03; 663.1  
DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-61-78

## Использование экологически безопасного микромицета рода *Rhodotorula* для получения кормового каротинсодержащего концентрата

Валентина В. Колпакова<sup>1</sup>, Рузалия В. Уланова<sup>1,2</sup>, Денис С. Куликов<sup>1</sup>, Валентина А. Гулакова<sup>1</sup>, Лина В. Васильева<sup>2</sup>, Юлия Ю. Берестовская<sup>2</sup>, Елена Г. Черемных<sup>3</sup>, Александр А. Ашихмин<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт крахмала и переработки крахмалсодержащего сырья – филиал

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха», Красково, Россия

<sup>2</sup>Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра

«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup>Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

<sup>4</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Федеральный исследовательский центр

«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

### Контактное лицо

Валентина В. Колпакова, доктор технических наук, профессор, главный научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт крахмала и переработки крахмалсодержащего сырья – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха»; 140051 Россия, Московская область, г. Красково, ул. Некрасова 11.

Тел. +79152858450

Email [val-kolpakova@rambler.ru](mailto:val-kolpakova@rambler.ru)

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7288-8569>

### Формат цитирования

Колпакова В.В., Уланова Р.В., Куликов Д.С., Гулакова В.А., Васильева Л.В., Берестовская Ю.Ю., Черемных Е.Г., Ашихмин А.А. Использование экологически безопасного микромицета рода *Rhodotorula* для получения кормового каротинсодержащего концентрата // Юг России: экология, развитие. 2022. Т.17, N 4. С. 61-78. DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-61-78

Получена 20 апреля 2022 г.

Прошла рецензирование 11 июля 2022 г.

Принята 20 сентября 2022 г.

### Резюме

**Цель работы.** Изучение возможности использования экологически безопасного штамма дрожжей рода *Rhodotorula* для биоконверсии вторичного продукта переработки гороховой муки на белковый концентрат (сыворотки) в кормовую каротиноидсодержащую биомассу.

**Материал и методы.** Использовали новый штамм *Rhodotorula mucilaginosa* 111 и вторичные продукты переработки гороховой и нутовой муки на белковые концентраты и картофеля на крахмал (сыворотку). Применяли стандартные и специальные методы анализа сыворотки и микробно-растительного концентрата (КМРК): химические, биохимические, микробиологические, определение токсичности с инфузориями.

**Результаты.** Определены оптимальные режимы выращивания *R. mucilaginosa* 111 на гороховой сыворотке (температура 16,9°C; pH 7,8; количество посевного материала 1,85%). Биомассы на гороховой сыворотке синтезировалось больше, чем на нутовой и картофельной сыворотке – 81 г/дм<sup>3</sup>. Массовая доля белка в биомассе – 58,90±3,03% на сухое вещество, скор незаменимых аминокислот – 119–243%. Липиды включали 20% насыщенных и 78% ненасыщенных жирных кислот, линолевой кислоты – 45,26±0,70%, олеиновой – 24,04±0,76%, пальмитолеиновой – 6,46±0,31%, пальмитиновой – 13,70±0,81%. Дрожжи продуцировали производные фитоина, торулен, β-каротин, торулародин, фитоин. КМРК из гороховой сыворотки стимулировал рост инфузории *Tetrahymena pyriformis* на 29,1%, из нутовой сыворотки – на 18,6% интенсивнее, чем дистиллированная вода, картофельная сыворотка понижала коэффициент ее роста.

**Заключение.** Сухая биомасса экологически безопасного нового штамма дрожжей *R. mucilaginosa* 111 содержала необходимые для кормления животных полноценные белки, липиды, минералы, каротиноиды; жидкую гороховую сыворотку возможно использовать для ее биоконверсии и в целях исключения загрязнения окружающей среды.

### Ключевые слова

Дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa*, гороховая сыворотка, микробно-растительный концентрат, белки, жирные кислоты, каротиноиды, безопасность, инфузория.

# Use of environmentally safe micromycetes of the genus *Rhodotorula* to obtain fodder carotene-containing concentrate

Valentina V. Kolpakova<sup>1</sup>, Ruzaliya V. Ulanova<sup>1,2</sup>, Denis S. Kulikov<sup>1</sup>, Valentina A. Gulakova<sup>1</sup>, Lina V. Vasilyeva<sup>2</sup>, Yulia Yu. Berestovskaya<sup>2</sup>, Elena G. Cheremnykh<sup>3</sup> and Alexander A. Ashikhmin<sup>4</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Starch and Processing of Starch-Containing Raw Materials – Branch of A.G. Lorkha Federal Potato Research Centre

<sup>2</sup>S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology, Fundamental Foundations of Biotechnology Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Mental Health Research Center, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Pushchino Scientific Centre for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

## Principal contact

Valentina V. Kolpakova, Doctor of Technical Sciences, Professor, Chief Researcher, All-Russian Research Institute of Starch and Processing of Starch-Containing Raw Materials – Branch of A.G. Lorkha Federal Potato Research Centre, 11 Nekrasova, St, Kraskovo, Moscow Region, Russia 140051.  
Tel. +79152858450  
Email [val-kolpakova@rambler.ru](mailto:val-kolpakova@rambler.ru)  
ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7288-8569>

## How to cite this article

Kolpakova V.V., Ulanova R.V., Kulikov D.S., Gulakova V.A., Vasilyeva L.V., Berestovskaya Yu.Yu., Cheremnykh E.G., Ashikhmin A.A. Use of environmentally safe micromycetes of the genus *Rhodotorula* to obtain fodder carotene-containing concentrate. *South of Russia: ecology, development*. 2022, vol. 17, no. 4, pp. 61-78. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-61-78

Received 20 April 2022

Revised 11 July 2022

Accepted 20 September 2022

## Abstract

**Aim.** The aim of the work was to study the possibility of using an environmentally friendly strain of yeast of the genus *Rhodotorula* for the bioconversion into fodder carotenoid-containing biomass of the secondary product of processing pea flour into a protein concentrate (whey).

**Material and Methods.** We used a new strain of *Rhodotorula mucilaginosa* 111 and by-products of processing pea and chickpea flour into protein concentrates and potatoes into starch (whey). We used standard and special methods for the analysis of serum and microbial-vegetable concentrate (FMVC) namely: chemical; biochemical; microbiological; and the determination of toxicity with ciliates.

**Results.** Optimal conditions for growing *R. mucilaginosa* 111 on pea whey were determined (temperature 16.9°C, pH 7.8, amount of inoculum 1.85%). More biomass was synthesized on pea whey than on chickpea and potato whey – 81 g/dm<sup>3</sup>. The mass fraction of protein in the biomass is 58.90±3.03% on dry matter and the rate of essential amino acids is 119–243%. Lipids included 20% saturated and 78% unsaturated fatty acids, linoleic acid – 45.26±0.70%, oleic – 24.04±0.76%, palmitoleic – 6.46±0.31%, palmitic – 13.70±0.81%. The yeast produced phytoin derivatives, torulene, β-carotene, torularodin and phytoin. FMVC from pea whey stimulated the growth of ciliates *Tetrahymena pyriformis* by 29.1%, from chickpea whey (by 18.6% more intensively than distilled water), while potato whey reduced its growth rate.

**Conclusion.** The dry biomass of the ecologically safe new yeast strain *R. mucilaginosa* 111 contained complete proteins, lipids, minerals, and carotenoids necessary for feeding animals. Thus liquid pea whey can be used for its biokonversions, while avoiding environmental pollution.

## Key Words

Yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, pea whey, microbial-vegetable concentrate, proteins, fatty acids, carotenoids, safety, ciliates.

## ВВЕДЕНИЕ

Обеспеченность кормами животноводческой и птицеводческой отраслей АПК является основой успешного их развития, однако изменяющиеся климатические и экономические условия ограничивают возможность производства продукции традиционными способами. К альтернативным технологиям, не зависящим от погодных условий и интенсификаций сельхозугодий, относится микробиологический синтез кормовой биомассы [1]. Биомасса одноклеточных организмов с питательными и биологически активными компонентами (белки, липиды, витамины, антиоксиданты, минеральные вещества) вводится в состав кормовых рационов в качестве полноценных и относительно дешевых ингредиентов. Ведущее положение в производстве микробного белка занимают дрожжи родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Saccharomycopsis*, *Kluyveromyces* и др. [2–6]. Особый интерес представляют те микроорганизмы, которые обеспечивают получение, кроме основных компонентов, и биологически активных веществ, придающих кормам ростовые, профилактические, антиоксидантные и другие свойства. В организме каротиноиды играют не только энергетическую роль, но и обладают антиоксидантными, иммуномодулирующими и онкопротекторными свойствами для нормализации репродуктивной функции, роста и развития животных и птицы [7–9]. Они являются изопреноидными пигментами и провитаминами А, принимают участие в пигментации организма, защите от хронических, дегенеративных и других заболеваний (старение, рак, катаракта, сердечно-сосудистые и т.д.) [10–13]. В составе пищевых добавок каротиноиды обладают и антимикробной активностью [14].

Сегодня 80–90% каротиноидов производят химическим синтезом, но все больше спрос возрастает на каротиноиды из природного растительного сырья, так как синтетические аналоги могут быть опасными для здоровья [15]. Природный кормовой каротин получают из тыквы, моркови, люцерны, экстракта фруктовых отходов и т. д.) [16; 17]. Из-за высокой потребности в каротиноидах для пищевой, кормовой промышленности и здравоохранения в 2022 году суммарная рыночная цена их препаратов, по прогнозам экспертов, может превысить 2,0 миллиарда долларов [18]. С учетом преимуществ микроорганизмов, по сравнению с растениями (темп роста, способность произрастать на отходах, часто загрязняющих окружающую среду, отсутствие сезонности роста и т.д.), исследования по получению кормовой биомассы, обогащенной каротиноидами, расширяются. Активными продуцентами каротиноидов выступают дрожжи родов *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Yarrowia*, *Phaffia* и др. [19–22], они привлекают внимание и как продуценты липидов и эссенциальных жирных кислот [23–25]. Так, каротинсодержащая кормовая биомасса получена для теплокровных животных, птиц и аквакультуры с дрожжами *Rhodotorula rubra*, *Rhodospiridium SC-111*, *Saccharomyces diastaticus Y-1218*, *Rhodotorula glutinis* [7; 26; 27]. При этом использовались отходы и вторичные продукты переработки сельскохозяйственного и пищевого сырья [28–32]. Так, при культивировании каротиноидных дрожжей *R. rubra* на экстракте

фруктовых отходов при pH 7,0, температуре 28,2°C и перемешивании при 150 об/мин выход биомассы составлял 7,83 мг/дм<sup>3</sup>, каротиноидов – 2,98±0,28 мг/дм<sup>3</sup> [17]. Урожайность биомассы на средах с картофельными сточными водами и глицериновыми фракциями с дрожжами *R. glutinis*, *Rothia mucilaginosa* и *Rhodotorula gracilis* также была высокой. Синтез в ней липидов, например, с культурой *R. gracilis* обеспечивал их количество 21,1 г/100 г, каротиноидов – 360,4 мкг/г биомассы, полиненасыщенных жирных кислот – 30,4% от общего количества [33; 34]. При трансформации отходов корочки дрожжами *Rhodospiridium toruloides*, остающихся после удаления полифенолов, количество каротиноидов составляло 2,00±0,23 мг/дм<sup>3</sup> [35]. Продуктивность ассоциации дрожжей *R. rubra* и *Kluyveromyces lactis* на ультрафильтрате молочной сыворотки составляла 24,3 г/дм<sup>3</sup>, каротиноидов – 10,2 мг/дм<sup>3</sup> [36]. У дрожжей *R. glutinis* и *R. mucilaginosa* при ферментации на сывороточной и картофельной среде урожайность достигала 30–45 г/дм<sup>3</sup>, массовая доля каротиноидов – 46–56 мг/дм<sup>3</sup> [36]. Положительные результаты получены и при использовании чайных отходов для синтеза каротиноидов и липидов дрожжами *R. toruloides*. Содержание пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой кислот составляло более 90% от общего количества жирных кислот [37]. Доказана также возможность использования сточных вод пивоварни с *R. glutinis* для производства липидов и каротиноидов [38]. Известно, что максимальная продуктивность дрожжей *Rhodotorula* и *Cryptococcus* с каротиноидов достигалась при росте на тростниковой патоке, кукурузном сиропе и солодовом экстракте (300 мкг/л) [39]. Таким образом, сведения по получению кормовой микробной биомассы, обогащенной наряду с белком, липидами и каротиноидами, и подбору ее продуцентов для различных сырьевых источников растительного происхождения весьма важны и актуальны.

Целью данной работы явилось изучение возможности использования жидкого вторичного продукта переработки гороховой муки на белковый концентрат (сыворотки) для получения кормового каротинсодержащего концентрата биоконверсией с новым экологически безопасным штаммом дрожжей рода *Rhodotorula*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили питательные среды, полученные на основе гороховой сыворотки – продукта, образующегося при получении белковых концентратов (БК) из гороховой муки. Химический состав гороховой муки, в % на сухое вещество (СВ): массовая доля белка (N×6,25) – 24,30±1,40, золы – 2,87±0,20, жира – 1,58±0,12, углеводов – 73,02±3,66. Для сравнения роста штамма *Rhodotorula* на гороховой сыворотке использовали нутовую и картофельную сыворотку. Нутовую сыворотку получали из муки с массовой долей, в % на СВ: белка (N×6,25) – 24,54±0,23; золы – 2,91±0,02; жира – 4,89±0,31; углеводов – 67,66±0,56. Химический состав сока, из которого получена картофельная сыворотка: СВ – 5,55±0,95%; азотистые вещества – 1,94±0,08 г/100 см<sup>3</sup>; аминный азот 1,03±0,07 г/100 см<sup>3</sup>; восстанавливающие сахара – 1,07±0,65 г/100 см<sup>3</sup>; зола – 0,85±0,05 г/100 см<sup>3</sup>.

Гороховую и нуттовую сыворотку получали после удаления белков из экстракта, полученного из муки с ферментными препаратами (ФП): Shearzym 500 L, Viscoferm L, Fungamyl 800 L, AMG 300 L 2500, Alcalase 2.4 L от компании "Novozymes", (Дания) по схеме, приведенной в работе [40]. Картофельный сок, остающийся после удаления крахмала из клубней картофеля [41], нагревали до температуры 95°C, после чего центрифугировали, получали супернатант обозначенный как сыворотка. Микробным объектом служил штамм дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* 111 из коллекции Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (Москва).

**Выведение и идентификация штамма.** Чистая культура штамма *R. mucilaginosa* 111 была выделена из водного образца озера Унтерсее Антарктида, отобранного с глубины 63 м при температуре 4,9°C, и идентифицирована после проведения генетического анализа 18SpPHK. Для обогащения образца клетками бактерий в олиготрофных условиях к образцу воды в соотношении 4:1 добавляли низко-минерализованную среду (НМС) с дрожжевым экстрактом, триптоном, казаминовыми кислотами и пептоном, каждый при концентрации 0,001%. Обогащенный клетками образец получали через 1 месяц при температуре 4°C. Культуру высевали на агаризованную НМС среду, в которой концентрация дрожжевого экстракта, триптона, казаминовых кислот и пептона была выше 0,005%, что позволило получить отдельные колонии, выросшие при 4°C. Чистую культуру штамма получали из одной колонии при многократном ее пересеве, поддерживали ее на НМС с 0,01% дрожжевого экстракта и 0,2% сахарозы при температуре 10°C. Микроскопические фазово-контрастные исследования проводили на микроскопе Olympus CX41 (Япония) с фотографической приставкой. На агаризованных средах образовывались круглые выпуклые маслянистые колонии дрожжей с гладкой поверхностью ярко-розового цвета.

**Идентификацию штамма** проводили на основе анализа последовательности рибосомальных генов по стадиям: рассев культуры до отдельных колоний; получение биомассы для анализа 18SpPHK; выделение ДНК (GenomicDNA Purification Kit) и идентификация штамма по последовательности 18SpДНК. Секвенирование генов 18S рPHK и 5,8S рPHK проводили на автоматическом секвенаторе AE 3000 с компьютерной программой BLAST. Электрофорез ПЦР образцов проводили на 1,0%-ном агарозном геле при напряжении 5 Вт/см. Анализ сходства нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 18S рДНК штамма, проведен с помощью сервера BLAST.

**Приготовление питательной среды.** Для биоконверсии сыворотки штаммом *R. mucilaginosa* 111 корректировали ее pH и стерилизовали при 0,5 атм. в течение 15 мин. Музейные культуры с сула-агара пересевали в пробирку с сывороткой, культивировали в течение 24 ч, после чего посевную культуру пересевали в колбы емкостью 300 см<sup>3</sup> с 50 см<sup>3</sup> питательной среды. Культуру выращивали на качалке в течение 48 ч при скорости вращения 150 мин<sup>-1</sup> и температуре 17±1°C. Суспензию инактивировали при температуре 95±5°C в течение 10–15 мин и охлаждали до температуры 22±2°C. Биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 4 000 мин<sup>-1</sup> в течение 10 мин, высушивали на лиофильной установке Hochvacuum HVDTG-50

(Германия) в вакууме при -80°C [42] и получали препарат кормового микробно-растительного концентрата (КМПК). Количество биомассы определяли гравиметрическим методом: 10 см<sup>3</sup> биомассы центрифугировали в течение 10 мин при 5000 мин<sup>-1</sup>, осадок дважды промывали стерильной дистиллированной водой, после чего его взвешивали. Результаты рассчитывали в г/дм<sup>3</sup> питательной среды.

**Анализ продуктов.** Количество белка в муке, сыворотке и концентратах определяли по методу Кьельдаля ГОСТ 10846-91 [43], массовую долю влаги – ГОСТ 13586.5-93 [44], золы – ГОСТ 10847-2019 [45], жира – ГОСТ 29033-91 [46], общих углеводов – по разнице между 100% и суммой остальных компонентов. Количество растворимых и нерастворимых волокон в КМПК определяли по методу, основанному на предварительном ферментативном гидролизе крахмала и белков [47]. Для гидролиза белков использовали протеолитический ФП Alcalase 2.4 L, для гидролиза углеводов – α-амилазу Фунгамил 800 L и амилоглюкозидазу AMG ("Novozymes", Дания). Растворимые волокна осаждали четырьмя объемами 95% (v/v) этанола в течение 2 часов при 4°C, после чего промывали 2 раза 95%-ным этанолом. Количество высушенной массы определяли гравиметрическим методом, массовую долю волокон выражали в процентах на СВ. При расчете аминокислотного сора концентратов использовали шкалу эталонного белка ФАО/ВОЗ (2011) [48].

**Углеводный состав** сыворотки и культуральной жидкости исследовали на газовом хроматографе модели GCMS-QP 2010 (Япония, Shimadzu Corporation) с колонкой ReproGel Na HPLC (9 μm, 8x300 mm).

**Аминокислотный состав** (АС) определяли на хроматографе модели L-8800 фирмы "Hitachi" (Япония) в стандартном режиме анализа белковых гидролизатов с сульфированным сополимером стирола с дивинилбензолом и ступенчатым градиентом натрий-цитратного буферного раствора с возрастающим значением pH и молярности [49].

**Жирнокислотный состав.** Липиды из КМПК выделяли по методу Фолча. После упаривания в ротационном испарителе, к ним добавляли хлороформ, солянокислый метанол (Supelco Methanolic-HCl 0.5 N), смесь нагревали 1 ч при 90°C. Жирнокислотный состав липидов исследовали на хроматографе с масс-детектором Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra при температуре 120°C, инжектора – 200°C; интерфейса – 205°C, детектора – 200°C на колонке SLB-IL82 (30 m, 0,20 mm, d = 0,25 mm) с гелевым носителем при скорости потока 35,6 см/сек и его делении 1:10. Градиентный режим изменяли от 120°C до 260°C со скоростью 5°C/мин в течение 2 минут.

**Состав каротиноидов.** Для определения состава каротиноидов клетки биомассы разрушали, после чего из них экстрагировали пигменты, которые разделяли ВЭЖХ-анализом. Для этого 150 мкл биомассы и стеклянные бусы размером 425–650 мкм (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:1 (V/V) помещали в пробирку Эппендорфа и интенсивно перемешивали в шейкере 5 раз по 15 сек. После каждого перемешивания клетки в течение 2 минут охлаждали во льду. К разрушенным клеткам добавляли 1 см<sup>3</sup> ацетон-метанольной смеси (7:2, v/v), перемешивали в шейкере и помещали на 10 мин в термостат при 45°C для экстракции пигментов. Образец центрифугировали в



течение 1 мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, США) при 2000 мин<sup>-1</sup>. Процедуру экстракции повторяли до появления серого цвета у продукта. Экстракты пигментов из нескольких порций объединяли, добавляли петролейный эфир и высушивали в стеклянном пузырьке под струей аргона. Анализ состава каротиноидов проводили с помощью ВЭЖХ на установке Shimadzu (Shimadzu, Япония) [50]. Установка состояла из насоса LC-10ADVP с модулем FCV-10ALVP, детектора с диодной матрицей SPD-M20A, термостата СТО-20АС и колонки с обращенной фазой Agilent Zorbax SB-C18 5 мкм 4,6 x 250 мм («Agilent», США). Концентрацию каротиноидов в моль% рассчитывали по коэффициентам экстинкции [51] и площадям полос поглощения в области 270–800 нм с помощью программы LC-solution (Shimadzu, Япония). Все реактивы были химически чистые.

Для определения коэффициента роста инфузорий и экологической безопасности концентратов использовали инфузорию *Tetrahymena pyriformis* WH14 из коллекции Всероссийского НИИ ветеринарной санитарии и экологии (Москва). К 10±0,001 мг образца добавляли 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и встряхивали на шейкере в течение 20 мин. Раствор разводили в 10 раз, отбирали 10 см<sup>3</sup> и определяли коэффициент роста числа клеток инфузорий на образцах через 24 часа. Контролем служила дистиллированная вода, подсчет живых тест-организмов проводили на приборе БиоЛаТ (ООО «Европолитест», Россия) [52] по специальной программе с использованием изображения лунок планшета с инфузориями. Программная обработка изображения основана на вычитании двух последовательных кадров лунки с тест-организмами и сканировании результирующего изображения для выявления объектов, отличающихся по яркости от фона. Коэффициент роста  $K_{\text{роста}}$  (%) вычисляли по формуле:

$$K_{\text{роста}} = \frac{A_{\text{оп}}}{A_{\text{к}}} \times 100, \text{ где } A_{\text{оп}} - \text{прирост клеток}$$

инфузории в опыте,  $A_{\text{к}}$  – прирост клеток в контроле. При уменьшении прироста клеток инфузории на 50% и более, по сравнению с контролем, проба считалась токсичной.

**Обработка результатов.** Экспериментальные данные обрабатывали в программах TableCurve 2D 5.1, TableCurve 3D 4.0, Mathematica 10.3 и Statistica 10. Доверительный интервал среднего арифметического рассчитан по уровню значимости  $p = 0,05$ .

## ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В статье представлены результаты по разработке микробиологического процесса получения каротиноидсодержащего КМПК с использованием вторичного продукта переработки зерна гороха на белковый концентрат – жидкой сыворотки. Сыворотка оставалась после осаждения белков из экстракта в изоэлектрической точке [40]. Для получения КМПК использовали новый штамм *Rhodotorula mucilaginosa* 111, активно усваивающий компоненты сред и синтезирующий белки, липиды, углеводы, каротиноиды.

При анализе последовательности рибосомальных генов по базе данных GenBank первичный скрининг показал, что штамм принадлежал к систематическому роду и видам: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula alborubescens*, *Rhodotorula evergladensis*. Критерием отнесения микроорганизма к конкретному виду считали гомологию не менее 98%. Для установления филогенетического родства использовали метод сравнения нуклеотидных последовательностей, кодирующих доменов D1/D2 гена 18S рРНК. Анализ филогенетического родства, построенный с использованием штаммов близкородственных микроорганизмов, энтеробластическое почкование, слизистая консистенция культуры и наличие пигментов показали, что наиболее близким к образцу был род *Rhodotorula*, вид – *mucilaginosa*. Штамм образца депонировали под номером 111.

С целью предварительного определения значений температуры и pH для развития культуры использовали НМС Американской коллекции типовых культур – АТСС, в состав которой входила сахароза в концентрации 0,2%. В пробирки со стерильной средой засекали культуру в 3-х кратной повторности, колбы выдерживали в течение недели при температуре 4, 10, 15, 20, 25 и 30°C и pH от 6,5 до 8,5. Наибольший рост культуры наблюдался при pH 8,0 и температуре 25°C. Штамм *R. mucilaginosa* 111 образовывал пигмент, окрашивающий колонии в розовато-оранжевый цвет (рис. 1), что характерно для каротиноидных пигментов базидиомицетовых дрожжей данного рода. Размер клеток яйцевидной формы, расположенных одиночно и попарно, составлял 3,75±1,25 мкм × 5,5±2,5 мкм. Размножались клетки чаще полярным почкованием, реже – многосторонним почкованием (рис. 1).

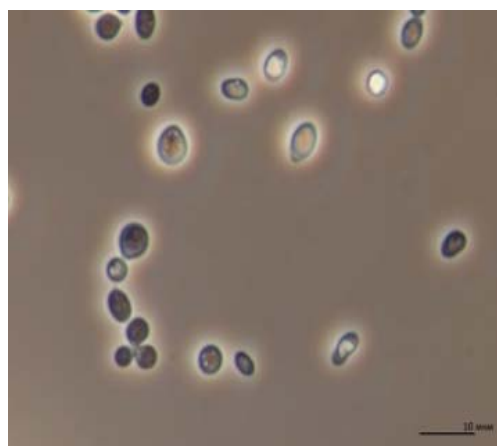


Рисунок 1. Внешний вид клеток *R. mucilaginosa* 111 на твердой питательной среде

Figure 1. Appearance of *R. mucilaginosa* 111 cells on a solid nutrient medium

Продуктивность (урожайность) культуры *R. mucilaginosa* 111 изучали на питательной среде из сыворотки, без внесения дополнительных ингредиентов, и сравнивали ее для сред из нутовой и картофельной сыворотки. Зерно нута по химическому составу и физико-химическим свойствам белков имеет сходство с зерном гороха, тогда, как картофель по данным показателям от зернобобовых отличается. Поэтому представлялось интересным исследовать продуктивность дрожжей на сыворотке различной природы, химический состав которой приведен в таблице 1. Параметры выращивания использовали те же, что и для гороховой сыворотки, но с консорциумом дрожжей *Saccharomyces cerevisia* и микромицета *Geotrichum candidum* (температура роста  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH 6,0–6,5) [40]. Показано, что продуктивность дрожжей *R. mucilaginosa* 111 на гороховой и нутовой сыворотке в 1,6 раза выше, чем на картофельной сыворотке (рис. 2). Возможно, что в состав сыворотки из зернобобовых культур в 1,5–1,8 раза больше входило легко усвояемых моно- и олигосахаридов. Для дальнейших исследований

использовали гороховую сыворотку, нуттовую и картофельную – для сравнения процессов роста и продуктивности дрожжей.

Технологические режимы культивирования дрожжей *R. mucilaginosa* 111 на гороховой сыворотке оптимизировали с методами математической обработки данных. Составили матрицу планирования эксперимента выращивания дрожжей в течение 3-х суток для выявления зависимости выхода биомассы от кислотности среды, температуры и количества посевного материала. Поиск искомой зависимости осуществляли в следующем виде:

$$md = a0 \cdot fpH \cdot ft \cdot fcm$$

где:  $fpH$ ,  $ft$  и  $fcm$  – функции эффектов влияния pH, температуры  $t$  и количества посевного материала  $cm$ .

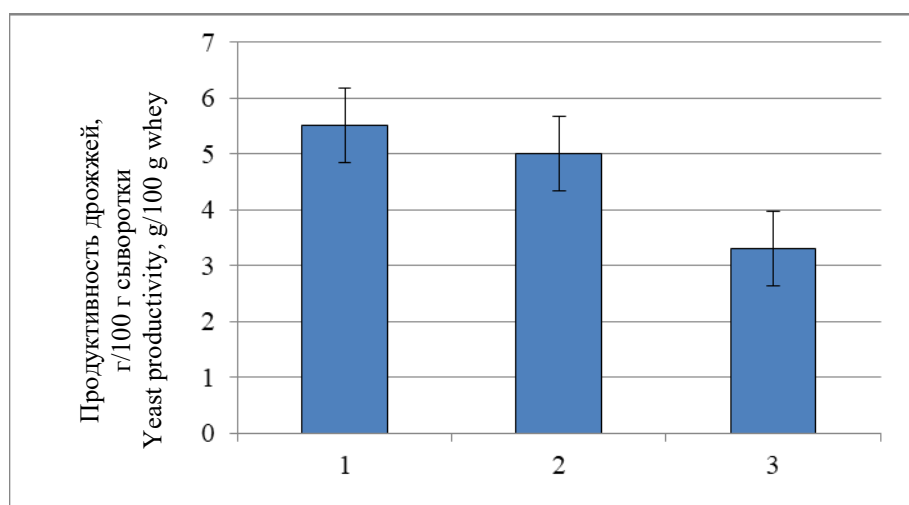
На рисунке 3 представлены частные эмпирические зависимости  $fpH$ ,  $ft$  и  $fcm$  эффектов влияния pH, температуры, количества посевного материала на выход биомассы дрожжей.

**Таблица 1.** Химический состав сыворотки различной природы

**Table 1.** Chemical composition of serum of various nature

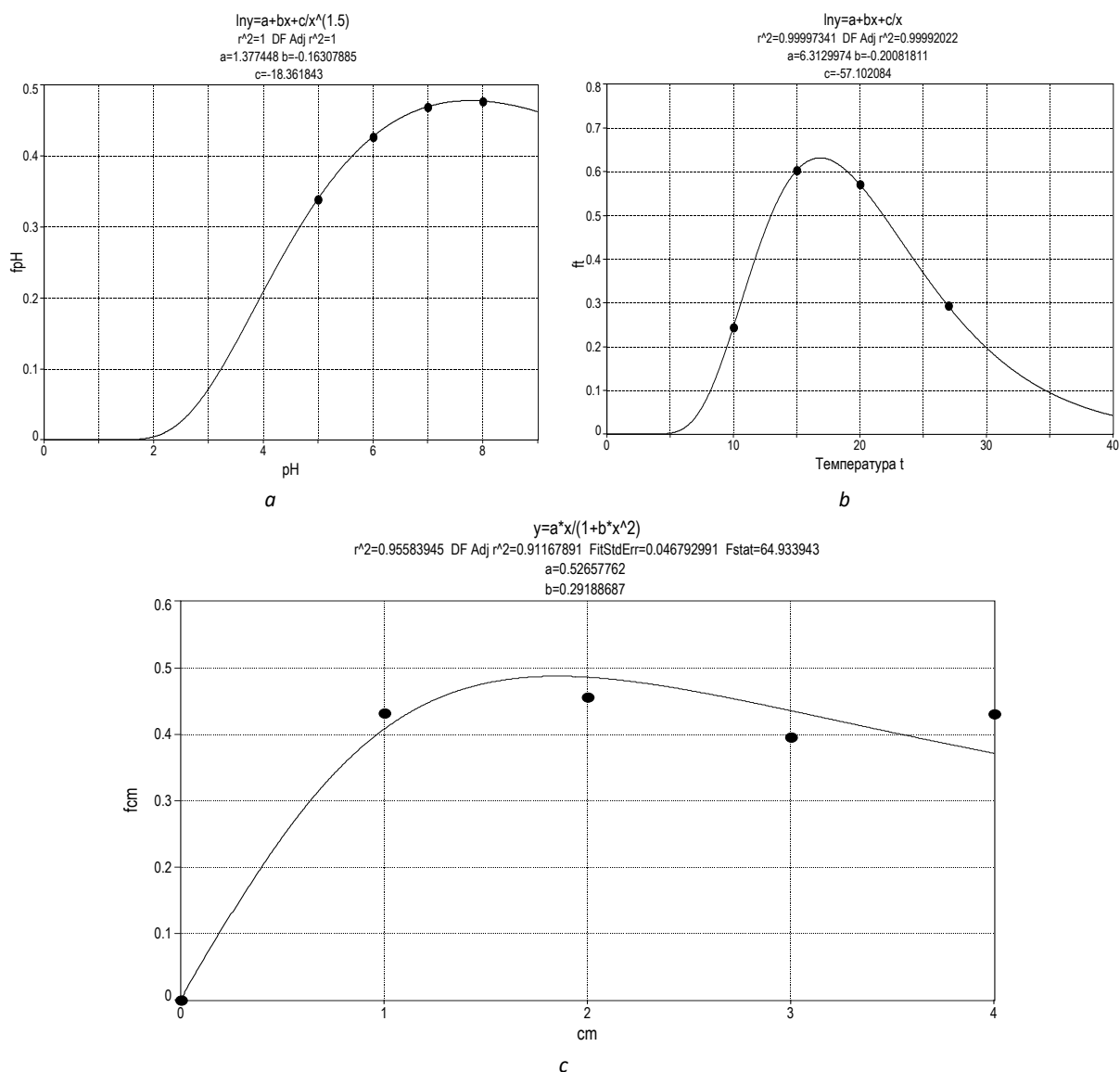
		Показатели / Indicators						
		Углеводы, % от общего количества Carbohydrates, % of the total						
СВ, % DS, %	АВ, % СВ (Nх6,25) NS, % (Nх6,25)	Фруктоза Fructose	Глюкоза Glucose	Мальтоза, сахароза Maltose, sucrose	Галактоза Galactose	Раффиноза Raffinose	Стахиоза Stachiose	ВМС HMC
<b>Гороховая сыворотка / Pea whey</b>								
<b>3,00</b>	13,94±	10,99±	41,45±	1,32±	-	2,91±	3,14±	35,12±
	5,32	0,61	1,12	0,04		0,10	0,09	2,01
<b>Нуттовая сыворотка / Chickpea whey</b>								
<b>3,80</b>	14,95±	14,06±	4,28±	4,40±	4,35±	9,52±	3,68±	47,21±
	7,53	0,84	0,45	0,36	0,55	1,42	0,47	1,93
<b>Картофельная сыворотка / Potato whey</b>								
<b>3,80</b>	29,75±	12,11±	18,30±	3,74±	-	-	-	64,22±
	2,25	0,56	0,93	0,41				1,02

Примечание: СВ – сухие вещества; ВМС – высокомолекулярные соединения; АВ – азотистые вещества  
Note: DS – dry substances; HMC – high molecular compounds; NS – nitrogenous substances



**Рисунок 2.** Продуктивность дрожжей *R. mucilaginosa* 111 на сыворотке: 1 – гороховой; 2 – нуттовой; 3 – картофельной

**Figure 2.** Yeast productivity *R. mucilaginosa* 111 on serum: 1 – pea; 2 – chickpea; 3 – potato



**Рисунок 3.** Частные эмпирические зависимости эффекта влияния: *a* –  $fpH$  от  $pH$ ; *b* –  $ft$  от температуры  $t$ ; *c* –  $fcm$  от количества посевного материала  $cm$   
**Figure 3.** Partial empirical dependences of the influence effect: *a* –  $fpH$  on  $pH$ ; *b* –  $ft$  on temperature  $t$ ; *c* –  $fcm$  from seed quantity  $cm$

С повышением  $pH$  от 5 до 7–8, температуры от 10 до 15–17°C и количества посевного материала от 1 до 2% выход биомассы повышался, после чего он плавно или резко понижался. Коэффициенты корреляции ( $R$ ) уравнений, описывающих данные зависимости, равнялись, соответственно, для  $pH$  (рис. 3А) – 1,0000;

температуры (рис. 3В) – 0,98600 и количества посевного материала  $cm$  (рис. 3С) – 0,99997, что указывало на адекватное описание уравнением полученных экспериментальных данных. Искомое уравнение зависимости выхода массовой доли биомассы ( $md$ ) от влияющих факторов имело вид:

$$md = \frac{21698.726 \cdot cm \cdot e^{-\frac{18.362}{pH^{1.5}} - 0.1631 pH - \frac{57.1}{t} - 0.2008 t}}{3.4341 + cm^2}$$

где:  $pH$  –  $pH$  среды,  $t$  – температура,  $cm$  – количество посевного материала.

Коэффициент корреляции уравнения  $R$  равнялся 0,8715, что также указывало на адекватное описание им экспериментальных данных (рис. 4). На рисунке 5 отображена зависимость выхода биомассы  $md$  (г/10  $cm^3$ ) от  $pH$  и температуры  $t$ , °C при количестве посевного материала  $cm = 2\%$ . Зависимость количества

биомассы от исследуемых факторов имела четко выраженные максимумы. Из листинга решения уравнений вытекали оптимальные значения факторов, обеспечивающие максимальный выход биомассы ( $md$ ), (0,81 г/дм<sup>3</sup>). В процессе накопления биомассы усваивались глюкоза и фруктоза.

Для гороховой и картофельной сыворотки в культуральной жидкости количество глюкозы закономерно уменьшалось: у гороховой сыворотки – до

нуля, у картофельной – в 6 раз, по сравнению с началом процесса. У нутовой сыворотки количество глюкозы практически не изменялось (табл. 2). У всех видов сыворотки количество фруктозы в культуральной

жидкости к концу выращивания биомассы уменьшилось в 2,2–3,9 раза. Следовательно, дрожжи из гороховой и картофельной сыворотки усваивали глюкозу, фруктозу, из нутовой сыворотки – фруктозу.

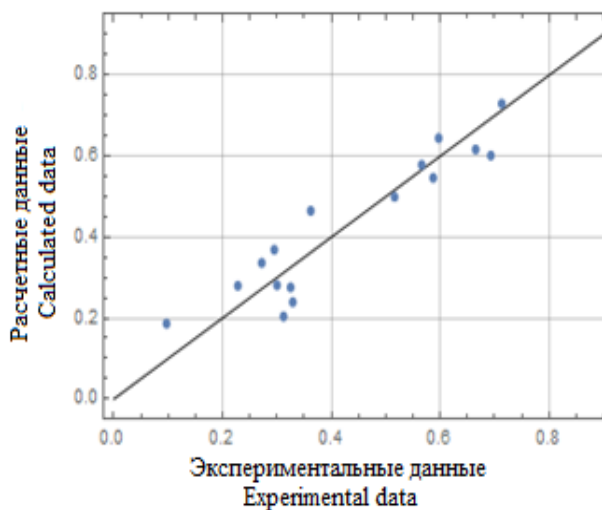


Рисунок 4. Корреляционный график  
Figure 4. Correlation chart

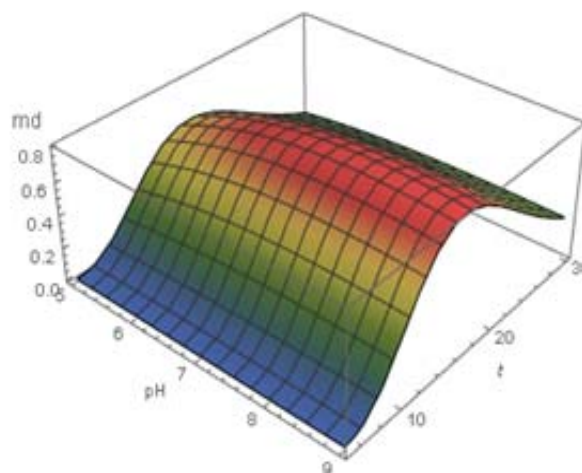


Рисунок 5. Зависимость выхода биомассы (md) от pH и температуры (t)  
Figure 5. Dependence of biomass yield on pH and temperature

Таблица 2. Углеводный состав сыворотки и культуральной жидкости в процессе роста дрожжей *R. mucilaginosa* 111  
Table 2. Carbohydrate composition of serum and culture liquid during the growth of the yeast *R. mucilaginosa* 111

Состав Composition	Сыворотка / Whey											
	Гороховая Pea				Нутовая Chickpea				Картофельная Potato			
	С W	Сутки роста Days of growth			С W	Сутки роста Days of growth			С W	Сутки роста Days of growth		
		1	2	3		1	2	3		1	2	3
СВ, %	3,00±	3,00±	2,80±	1,60±	3,80±	3,80±	3,00±	2,50±	3,80±	4,00±	2,20±	2,00±
ДС, %	0,65	0,02	0,43	0,49	0,37	0,12	0,89	0,85	0,38	0,44	0,75	0,60
Глюкоза Glucose	41,45± 2,54	32,17± 1,96	11,93± 0,66	0	6,61± 0,73	4,28± 0,28	5,86± 1,61	7,73± 0,15	18,30± 1,85	10,56± 2,01	2,67± 0,88	3,10± 0,81
Фруктоза Fructose	11,99± 1,95	13,85± 1,38	12,46± 1,72	5,29± 2,97	12,68± 0,95	14,06± 1,99	8,63± 1,75	3,34± 1,39	12,11± 1,25	9,40± 2,40	8,41± 2,34	4,03± 1,22
Галактоза Galactose	1,32± 0,08	1,04± 0,05	0	0	4,35± 0,17	4,19± 0,13	4,40± 0,16	5,28± 0,09	2,80± 0,20	3,17± 0,92	3,45± 0,80	3,11± 0,06
Мальтоза, сахароза Maltose, sucrose	1,32± 0,69	1,75± 0,99	4,35± 0,57	12,85± 0,82	4,40± 0,43	3,88± 0,38	4,80± 0,21	7,40± 0,55	3,74± 0,04	3,04± 0,36	3,68± 0,12	3,42± 0,15
Раффиноза Raffinose	2,91± 0,07	1,14± 0,05	1,93± 0,07	2,28± 0,02	9,52± 0,09	10,44± 0,13	15,82± 0,40	19,59± 0,24	–	–	–	1,15± 0,03
Стахиоза Stachiose	3,14± 0,47	2,85± 0,78	3,23± 0,12	4,20± 0,34	3,68± 0,94	4,25± 0,54	4,17± 0,19	3,48± 0,38	–	–	–	–
ВМС НМС	32,80± 0,98	38,57± 1,05	58,96± 2,92	75,38± 2,07	47,21± 1,71	46,97± 1,94	52,07± 1,99	50,71± 1,48	61,42± 1,72	69,45± 2,77	74,15± 0,54	80,4± 3,38

Примечание: СВ – сухие вещества; ВМС – высокомолекулярные соединения; С – сыворотка  
Note: DS – dry substances; HMC – high molecular compounds; W – whey

Данные отличия незначительно повлияли на выход биомассы из нутовой сыворотки по сравнению с гороховой. Достоверных данных по уменьшению в культуральной жидкости количества мальтозы и сахарозы не выявлено. Увеличение количества дисахаридов к концу роста биомассы, как и количества ВМС, в культуральной жидкости можно объяснить

количественным перераспределением фракционного состава углеводов за счет усвоения моносахаридов дрожжами в процессе роста

С оптимальными режимами выращивания культуры получены лабораторные образцы КМПК (рис. 6), изучен их химический состав и токсичность. Концентрат имел розово-оранжевый цвет, посторонние

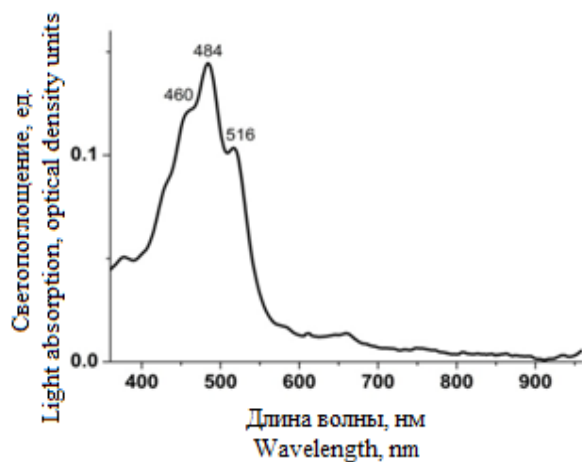


запахи отсутствовали. Спектрофотометрическим анализом экстрактов из биомассы дрожжей получили спектр поглощения каротиноидов в петролейном эфире (рис. 7) и хроматограмму ВЭЖХ-анализа пигментов (рис. 8) с различными максимумами поглощения (табл. 3). В биомассе обнаружены фитоин и его производные, торулен,  $\beta$ -каротин, торулародин и фитоин. При этом известно, что первым продуктом

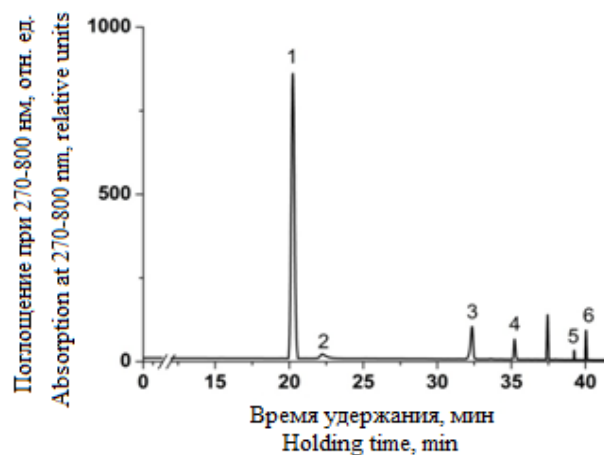
биосинтеза каротиноидов в растениях является фитоин [53], который через ряд реакций превращается в окрашенный  $\beta$ -каротин,  $\gamma$ -каротин [54], торулин и торулародин [55]. Провитаминная активность каротиноидов в нашем случае убывала в следующем порядке: производные фитоина > торулен >  $\beta$ -каротин > торулародин > фитоин.



**Рисунок 6.** Внешний вид КМПК, полученного на гороховой сыворотке: *a* – сырая биомасса; *b* – сухой концентрат  
**Figure 6.** Appearance of the FMVC obtained on pea serum: *a* – wet biomass; *b* – dry concentrate



**Рисунок 7.** Спектр поглощения экстракта пигментов в петролейном эфире  
**Figure 7.** Absorption spectrum of pigment extract in petroleum ether



**Рисунок 8.** Хроматограмма ВЭЖХ-анализа пигментов: 1, 6 – производные фитоина; 2 – торулародин; 3 – торулен; 4 –  $\beta$ -каротин; 5 – фитоин  
**Figure 8.** Chromatogram of HPLC analysis of pigment: 1, 6 – phytoin derivatives; 2 – torularodin; 3 – torulene; 4 –  $\beta$ -carotene; 5 – phytoin

Наряду с каротиноидами, КМПК содержал белки, жиры, минеральные элементы (показатель зольности), растворимые и нерастворимые волокна (табл. 3). В состав его белков входили 18 аминокислот (АК) (рис. 9), среди которых преобладали иммуноактивные аспарагиновая, глутаминовая кислоты, аланин. Скор для всех незаменимых АК у КМПК был выше 100%, что указывало на высокую биологическую ценность белков. Общая сумма незаменимых АК у горохового КМПК равнялась 21,86%, у нуттового КМПК – 27,03%, от общего

их количества. Скор этих АК на 12–25% выше, чем у КМПК, полученного на той же гороховой сыворотке, но с консорциумом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 121 и гриба *Geotrichum candidum* 977 (табл. 4), для нуттовой сыворотки – на 6–17%, при том, что белки у обоих КМПК были биологически полноценные.

Жирнокислотный состав липидов КМПК включал 20% насыщенных и 78% ненасыщенных жирных кислот (табл. 5), соотношение жирных кислот (насыщенные: моноеновые: полиеновые) равнялось 20:33:45, что

приравнивало их к липидам арахиса, томатов, кунжута и оливкового рафинированного масла. Среди ненасыщенных жирных кислот присутствовали линолевая кислота ( $\omega=6$ ), олеиновая ( $\omega=9$ ) и пальмитолеиновая кислота ( $\omega=7$ ). Среди насыщенных жирных кислот большая доля приходилась на пальмитиновую кислоту (13,70%), меньшая – на лауриновую кислоту с антибиотической активностью и стеариновую кислоту:  $1,56 \pm 0,45\%$  и  $1,41 \pm 0,21\%$ , соответственно. На долю душистых веществ (альдегид, эфир, кетон) приходилось в сумме 1,27%. Таким образом, липиды и каротиноиды КМПК в организме животных могут принимать активное участие в обмене веществ не только как энергетический материал, но и как компоненты, включающиеся в синтез гормонов,

витаминов и других биологически активных соединений.

Токсикологическая оценка КМПК, выполненная биотестированием с биологическими моделями из одноклеточной инфузории *Tetrahymena pyriformis* [52], показала, что в течение 24 часов концентрат стимулировал ее рост. На это указывало большее на 29,1% значение коэффициента роста микроорганизма, по сравнению с коэффициентом роста на дистиллированной воде (рис. 10). Нуттовая сыворотка также являлась стимулирующей средой для дрожжей, коэффициент роста инфузорий выше на 18,6%, по сравнению с контролем. Картофельная сыворотка, наоборот, угнетала рост клеток инфузорий, возможно из-за гликоалколоидов.

Таблица 3. Каротиноидный состав горохового КМПК

Table 3. Carotenoid composition of pea FMPC

№	Каротиноиды Carotenoids	Время удержания с колонок, мин Column retention time, min	Absorption maxima, nm	Площадь пика Peak area	Mol %
1	Производное фитоина Phytoin derivative	20,241	272/281/293	261842	90,6
2	Торулародин Torularodine	22,224	470/491/527	2746	1,0
3	Торулен Thorulen	32,340	458/487/519	9821	3,4
4	$\beta$ -Каротин $\beta$ -carotene	35,213	429/452/479	3664	1,3
5	Фитоин Phytoin	39,240	270/282/293	1912	0,7
6	Производное фитоина Phytoin derivative	40,038	271/282/293	8998	3,1

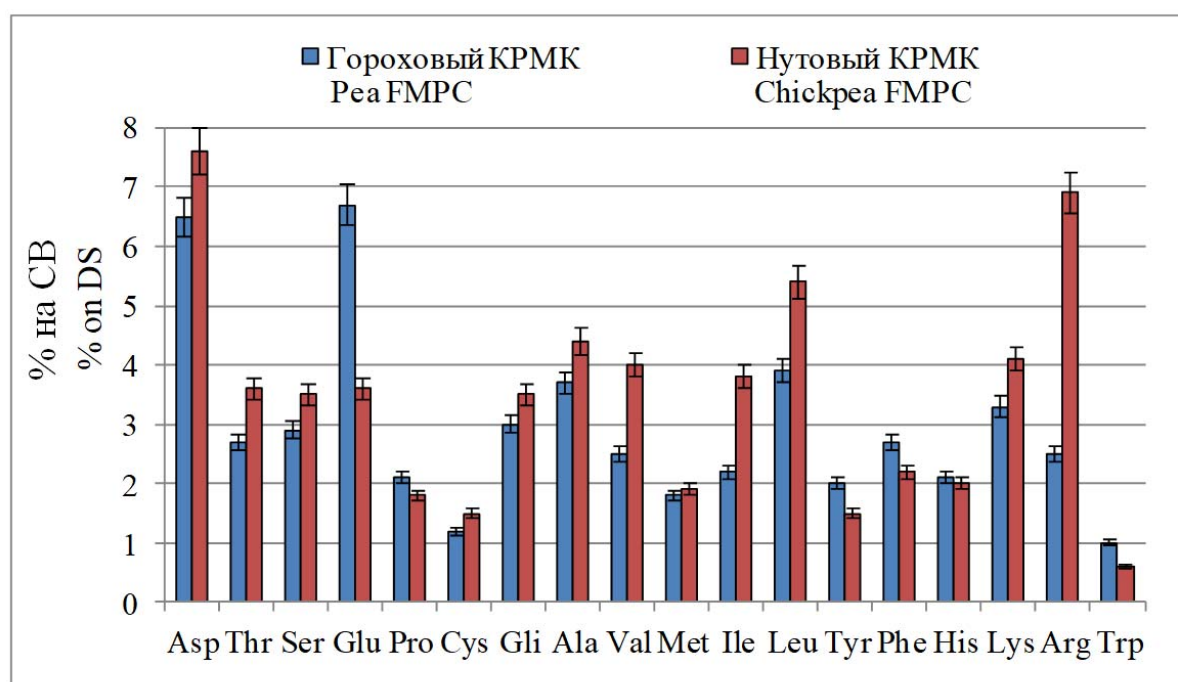


Рисунок 9. Аминокислотный состав горохового и нуттового КМПК

Figure 9. Amino acid composition of pea and chickpea FMPCs

Таблица 4. Химический состав горохового и нутового КМПК

Table 4. Chemical composition of pea and chickpea FMPCs

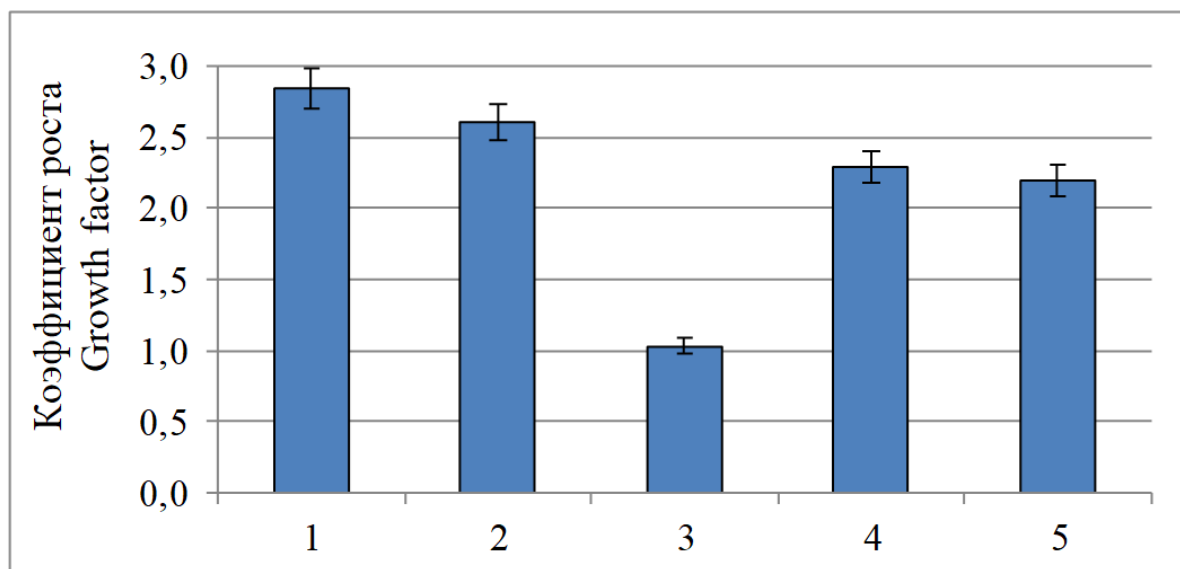
Массовая доля влаги, % Moisture, %		Массовая доля, % на СВ / Mass fraction, % on DS						
		Белок (Nx6,25) Protein	Жир Lipids	Зола Ash	Волокна / Fiber			
Растворимые Soluble					Нерастворимые Insoluble			
6,76±0,11		58,90±3,03	1,20±0,06	4,53±0,23	9,33±0,46			26,04±0,26
Аминокислотный скор КМПК, % / Amino acid score of the FMPC, %								
Val	His	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Thr	Trp	Phe+Tyr
Гороховый / Pea								
<i>R. mucilaginosa</i>								
120	243	136	119	129	240	201	272	221
<i>S. cerevisiae</i> + <i>G. candidum</i>								
107	219	124	107	116	226	179	247	197
Нутовый / Chickpea								
<i>R. mucilaginosa</i>								
162	200	203	145	135	242	236	147	143
<i>S. cerevisiae</i> + <i>G. candidum</i>								
151	188	197	136	127	225	221	137	135

Таблица 5. Состав жирных кислот КМПК, полученного с дрожжами *R. mucilaginosa* 111Table 5. Fatty acid composition of FMPCs obtained with the yeast *R. mucilaginosa* 111

№	Жирные кислоты Fatty acids	% к сумме кислот % to the amount of acids	№	Жирные кислоты Fatty acids	% к сумме кислот % to the amount of acids
2	Decanoic acid Capric acid C <sub>10:0</sub>	0,25±0,10	11	Hexadecanoic acid Palmitic acid C <sub>16:0</sub>	13,70±0,81
3	Octanedioic acid Suberic acid C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	0,06±0,02	12	10-Heptadecenoic acid C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1,50±0,12
4	Dodecanoic acid Lauric acid C <sub>12:0</sub>	1,56±0,45	13	Heptadecanoic acid Margaric acid C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,39±0,09
5	Benzophenone Diphenylketone (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CO	0,07±0,03	14	2-Hydroxyhexadecanoic acid   α-Hydroxypalmitic acid C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	0,63±0,07
6	Nonanal dimethyl acetal Cinnamic acid butyl ester C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	0,07±0,03	15	9,12-Octadecadienoic acid Linoleic acid C <sub>18:2(9,12)</sub>	45,26±0,10
7	Tetradecanoic acid Myristic acid C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,98±0,26	16	9-Octadecenoic acid Oleic acid C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	24,04±0,76
8	Pentadecanoic acid Pentadecylic acid C <sub>15:0</sub>	1,62±0,30	17	6-Octadecenoic acid Petroselic acid C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,88±0,22
9	Heptyl benzoate C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> Benzoic acid, heptyl ester	1,03±0,18	18	Octadecanoic acid Stearic acid C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1,41±0,21

Известно, что сухая сыворотка гороха может быть использована с грибами для производства веган-микопroteина [56]. Нами же показано, что с для штамма *R. mucilaginosa* 111, как и с консорциума *S. cerevisiae* 121 и *G. candidum* 977 [40], жидкая гороховая сыворотка, остающаяся после получения БК, также являлась эффективной питательной средой для синтеза биомассы, что может удешевлять производство. Несмотря на одинаковую массовую долю белка в биомассе в нашем случае с разными модификаторами (58,90±3,0% и 61,68±0,40% на СВ), преимуществом исследуемой биомассы являлось наличие каротиноидов. Биосинтез каротиноидов, как белков и липидов, в биомассе *R. mucilaginosa* 111 протекал при относительно низкой температуре, что соответствовало

данным, показывающим, что некоторые штаммы *Rhodotorula* растут не только при 28–32°C [55; 56], но и при температуре – 20–24°C (*R. gracilis*, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa*) [31; 56; 57]. Исследуемый штамм *R. mucilaginosa* 111 наиболее эффективно развивался при температуре еще более низкой (16,9°C), что подтвердило тот факт, что вид питательной среды влияет не только на количественные показатели биомассы [26], но и на температуру ее накопления. Пониженная температура выращивания гриба защитит желудочно-кишечный тракт животных от нежелательных микробиологических процессов, которые, по каким-то причинам, могут возникнуть с данным видом биомассы.



**Рисунок 10.** Коэффициент роста культуры *Tetrahymena pyriformis* на биомассе различной природы:

1 – гороховая сыворотка, 2 – нутовая сыворотка, 3 – картофельная сыворотка;  
4 – консорциум *S. cerevisia* 121 и *G. candidum* 977; 5 – дистиллированная вода

**Figure 10.** Growth coefficient of *Tetrahymena pyriformis* culture on biomasses of different natures:

1 – pea serum, 2 – chickpea serum, 3 – potato serum; 4 – consortium of *S. cerevisia* 121 and *G. candidum* 977; 5 – distilled water

Гороховая сыворотка – более эффективная питательная среда для роста биомассы, чем нутовая, и особенно – картофельная сыворотка. Продуктивность биомассы *R. mucilaginosa* 111 на гороховой сыворотке выше, чем, например, у дрожжей *R. rubra*, выращенных на фруктовых отходах (7,8 мг/см<sup>3</sup>) [19], или дрожжей *R. mucilaginosa* ССУ 20-7-31 и *P. glutinis* ССУ 20-2-26 (35–40 г/дм<sup>3</sup>), произрастающих на картофельных отходах [28]. Активное усвоение глюкозы штаммом *R. mucilaginosa* 111 из гороховой сыворотки согласовывалось с данными для других дрожжей. Так, каротиногенные дрожжи *R. toruloides* и *R. glutinis* использовали глюкозу, ксилозу, арабинозу [58–60], глюкоза больше повышала содержание липидов [59]. На важность присутствия глюкозы для увеличения биомассы *R. toruloides* Y4 и количества липидов указано и в работе [60]. Усвоение нашим штаммом дрожжей фруктозы и глюкозы совпадало с данными для культуры *R. glutinis* [51; 61]. Однако, из гороховой сыворотки исследуемый штамм усваивал и галактозу, что также не противоречило данным для базидиомицетных дрожжей *R. toruloides*, выделенных из хвойных пород деревьев [62]. Источником энергии для синтеза биомассы и ее компонентов могла быть и сахароза [63], но ее усвоение не наблюдали.

Профиль жирных кислот биомассы *R. mucilaginosa* 111 соотносился с профилем состава других питательных сред и дрожжей. Полиненасыщенные жирные кислоты биомассы дрожжей *Rhodotorula*, *Cystofilobasidium* и *Sporobolomyces* sp., выращенных на отходах животного жира, также большей частью были представлены линолевой кислотой (C<sub>18:2</sub>) [64], из насыщенных жирных кислот обнаружили пальмитиновую (C<sub>16:0</sub>), стеариновую кислоты (C<sub>18:0</sub>). При ферментации дрожжей на лигноцеллюлозной среде при температуре 25°C в течение 48–72 часов доминирующими жирными кислотами являлись олеиновая (C<sub>18:1</sub>), пальмитиновая (C<sub>16:0</sub>) и линолевая (C<sub>18:2</sub>) кислоты. Жирные кислоты

биомассы нашего штамма по количеству располагались аналогичным образом: больше всего линолевой кислоты (45,26%) и олеиновой кислоты (24,04%); обнаружены пальмитиновая и стеариновые кислоты, как и у *R. toruloides* Y4 [65]. В данной биомассе не было линоленовой кислоты, однако присутствовали также ненасыщенные пальмитолеиновая и 10-гептадеценная кислоты. Общее количество ненасыщенных жирных кислот для штамма было несколько выше (78,14%), чем, например, у штамма *R. toruloides* Y4 (63,5%), выращенном ферментацией на питательной среде с глюкозой [66].

Основное количество каротиноидов в КМПК приходилось на фитоин и его производные (94,4%), остальное количество – на торулародин, торулен и β-каротин, тогда как, например, дрожжи штаммов *R. glutinis* и *R. rubra* способны синтезировать больше торулародина, торулена и β-каротина. Другим был состав и при использовании, свекловичной мелассы [67]. Это подтвердило то, что состав каротиноидов в значительной степени зависит от вида питательной среды. До настоящего времени нет единого мнения относительно путей синтеза каротиноидов в дрожжах. По мнению Simpson с соавторами [68], вначале из фитоина образуется его производное нейроспорин, который под влиянием ингибиторов или стрессовых факторов трансформируется в ликопен или β-зеакаротин; при циклизации ликопена или дегидрировании β-зеакаротина образуется γ-каротин, а при циклизации γ-каротина, катализируемого β-ликопинциклазой, синтезируется окрашенный β-каротин [54]. В присутствии фитоендезауразы из молекулы γ-каротина образуется торулин, который превращается в торулародин по реакции гидросилирования и оксигенации [55]. Фитоин и его производные обнаружены в печени, легких, толстой кишке человека, они защищают кожу от ультрафиолета, действуют как антиоксиданты и противовоспалительные агенты.

Полученная биомасса содержала все описанные здесь компоненты.

Коэффициент роста, определенный для КМПК из гороховой и нутовой сыворотки с инфузурией *Tetrahymena pyriformis* методом, по которому биотестируют корма [69], пищевые добавки [47] и лекарства [70], показал, что концентрат, полученный с *R. mucilaginosa* 111, для одноклеточной инфузурии нетоксичный, что позволило сделать вывод об экологической чистоте нового штамма дрожжей и целесообразности дальнейшего тестирования продукта в целях получения его в виде кормовой добавки на животных.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывали на возможность использования жидкой гороховой сыворотки в качестве субстрата для производства КМПК с новым экологически безопасным штаммом *R. mucilaginosa* 111. Сыворотку получали как вторичный продукт переработки гороховой муки на пищевой концентрат, белки которого из ферментативного экстракта осаждали в изоэлектрической точке. Для синтеза нетоксичной биомассы, содержащей полноценный белок со скором незаменимых АК выше 100%, биологически эффективные липиды и каротиноиды, может использоваться штамм *R. mucilaginosa* 111, выделенный из вод Антарктиды. Провитаминная активность каротиноидов убывала следующим образом: производные фитоина > торулен > β-каротин > торулародин > фитоин. Относительно низкие концентрации каротиноидов в растительном сырье, дефицит полноценного белка для кормления животных и положительные результаты биоконверсии вторичного продукта переработки гороховой муки на белковый концентрат с новым безопасным штаммом *R. mucilaginosa* 111 позволили заключить, что данный процесс может стать перспективным путем для производства микробно-растительного концентрата, а новый штамм из рода *Rhodotorula* – эффективным модификатором для трансформации жидкой сыворотки в биологически активные кормовые добавки и фактором, способствующим снижению нежелательной нагрузки на биосферу в виде производственных стоков.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Matilde C., Lippolis A., Fava F., Rodolfi L. Microbes: Food for the Future // *Foods*. 2021. V. 10. N 5. P. 971 DOI: 10.3390/foods10050971
- Shurson G.C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients animal feed science and technology // *Animal Feed Science and Technology*. 2018. V. 235. P. 60–76. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010
- Martiniano S., Philippini R., Franco-Marcelino P.R. Effect of selenium uptake on growth metabolism in yeasts for the production of enriched single-cell protein using agro-industrial by-products // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022. V. 12. P. 3975–3983. DOI:10.1007/s13399-020-00885-w
- Kieliszek M., Kot A., Bzducha-Wróbel A., Stanisław Błażej S. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review // *Fungal Biology Reviews*. 2017. V. 31. N 4. P. 185–198. DOI: 10.1016/j.fbr.2017.06.001
- Колодина Е.Н., Артемьева О.А., Котковская Е.Н., Павлюченкова О.В., Переселкова Д.А. Изучение биологической безопасности дрожжей рода *Candida* как

- потенциального источника кормового белка // *Вестник ОрелГАУ*. 2016. Т. 5. N 62. С. 72–78. DOI:10.15217/48484
- Серба Е.М., Соколова Е.Н., Фурсова Н.А., Волкова Г.С., Борщова Ю.А., Курбатова Е.И., Куксова Е.В. Получение биологически активных добавок на основе обогащенной дрожжевой биомассы // *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2018. Т. 2. С. 74–79.
  - Frengova G.I., Beshkova D.M., Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of Biotechnological Importance // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009. V. 36. N 2. P. 163–180. DOI: 10.1007/s10295-008-0492-9
  - Young A.J., Lowe G.M., Young A.J. and Lowe G.M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001. V. 385. N 1. P. 20–27. DOI: 10.1006/abbi.2000.2149
  - Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Роль каротиноидов в профилактике наиболее распространенных заболеваний. Лекарственная терапия // *Российский биотерапевтический журнал*. 2010. Т. 9. N 1. С. 77–86.
  - Кузьмина Е.В., Семененко М.П., Коцаев А.Г., Трошин А.Н. Биологические функции каротиноидов при воспроизводстве крупного рогатого скота // *Научный журнал КубГАУ*. 2017. Т. 129. С. 1124–1136. DOI: 10.21515/1990-4665-129-080
  - Lowe G.M., Booth L.A., Young A.J., Bilton R.F. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses // *Free Radical Research*. 1999. V. 30. N 2. P. 141–151. DOI: 10.1080/10715769900300151
  - Saini R.K., Keum Y.-S., Daglia M., Rengasamy K.R. Dietary carotenoids in cancer chemoprevention and chemotherapy: A review of emerging evidence // *Pharmacological Research*. 2020. V. 155. Article Number: 104730. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104730
  - Zhao B., Ren B., Guo R., Zhang W., Ma S., Yao Y., Yuan T., Liu Z., Liu X., Zhao B., et al. Supplementation of lycopene attenuates oxidative stress induced neuroinflammation and cognitive impairment via Nrf2/NF-κB transcriptional pathway // *Food and Chemical Toxicology*. 2017. V. 109. Pt 1. P. 505–516. DOI: 10.1016/j.fct.2017.09.050
  - Kaulmann A., Bohn T., Kaulmann A., et al. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress-implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention // *Nutrition Research*. 2014. V. 34. N 11. P. 907–929. DOI: 10.1016/j.nutres.2014.07.010
  - Juhyun Shin, Min-Ho Song, Jae-Wook Oh, Young-Soo Keum, Ramesh Kumar Saini, Pro-oxidant Actions of Carotenoids in Triggering Apoptosis of Cancer Cells: A Review of Emerging Evidence // *Antioxidants*. 2020. V. 9. N 6. p. 532. DOI: 10.3390/antiox9060532
  - Оразова С.Б., Карпенюк Т.А., Шарипов К.О., Азимханова Б.Б., Гончарова А.В. Изучение жирнокислотного состава и антимикробной активности суммарных экстрактов липидов зеленых микроводорослей // *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. 2017. Т. 3. С. 240–242.
  - Saini R.K., Keum Y.-S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: An updated review of critical issues // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2019. V. 46. N 5. P. 657–674. DOI: 10.1007/s10295-018-2104-7
  - Коцаев А.Г., Калюжный С.А., Коцаева О.В., Гавриленко Д.В., Елисеев М.А. Функциональные кормовые добавки из каротинсодержащего растительного сырья для птицеводства // *Научный журнал КубГАУ*. 2013. Т. 93. С. 334–343.
  - Korumilli T., Susmita M. Carotenoid production by *Rhodotorula sp.* on fruit waste extract as a sole carbon source and optimization of key parameters // *Iranian Journal of*



- Chemistry & Chemical Engineering-International. 2014. V. 33. P. 89–99.
20. Tang W., Wang Y., Zhang J., Cai Y., He Z. Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production // Applied microbiology and biotechnology. 2019. V. 29. N 4. P. 507–517. DOI: 10.1007/s00440-018-01022
21. Moliné M., Flores M.R., Libkind D., del Carmen D.M., Fariás M.E., van Broock M. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin // Photochemical & Photobiological Sciences. 2010. V. 9. P. 1145–1151. DOI: 10.1039/c0pp00009d
22. Buzzini P., Innocenti M., Turchetti B., Libkind D., van Broock M., Mulinacci N. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus* // Canadian Journal of Microbiology. 2007. V. 53. P. 1024–1031. DOI: 10.1139/W07-068
23. Matselyukh B.P., Matselyukh D.Ya., Golembiovska S.L., Gural S.V. Isolation of *Phaffia rhodozyma* yeasts mutants under increased carotenoid content // Biotechnologia Acta. 2014. V. 7. N 4. P. 49–53. DOI: 10.15407/biotech7.04.049
24. Alakra F., Saygün A., Yeşilçubuk N.S. Biotechnological production of lipids and carotenoids from *Rhodospiridium toruloides* Y27012 // European Journal of Science and Technology. 2020. V. 19. P. 156–164. DOI: 10.31590/ejosat.708556.
25. Wu C.C., Ohashi T., Kajiura H., Sato Y., Misaki R., Honda K., Limtong S., Fujiyama K. Functional characterization and overexpression of Delta 12-desaturase in the oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* for production of linoleic acid-rich lipids // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2021. V. 131. N 6. P. 631–639. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2021.02.002
26. Caporusso A., Capece A., De Bari I. Oleaginous Yeasts as Cell Factories for the Sustainable Production of Microbial Lipids by the Valorization of Agri-Food Wastes // Fermentation-Basel. 2021. V. 7. N 2. p. 50. DOI: 10.3390/fermentation7020050
27. Papaniklaou S., Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production // European Journal of Lipid Science and Technology. 2011. V. 113. N 8. P. 1031–1051. DOI: 10.1002/ejlt.201100014
28. Marova I., Carnecka M., Haličková A., Certík M., Dvoráková T., Haroniková A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production // Journal of Environmental Management. 2012. V. 95. P. 338–342. DOI: 10.1016/j.jenvman.2011.06.018
29. Гавриленко Д.В., Кощаев А.Г. Биотехнология получения комплексной кормовой добавки для птицы // Сборник научных трудов КНЦЗВ. 2019. Т. 8. N 3. С. 165–168. DOI: 10.34617/tdf5-y729
30. Abramova I.M., Soloviev A.O., Turshatov M.V., Krivchenko V.A., Kononenko V.V. Protein feedstuff production based on microbial biomass // IOP Conference Series-Earth and Environmental Science. 2020. V. 548. Article number: 082080. DOI: 10.1088/1755-1315/548/8/082080
31. Ng H.S., Kee P.E., Yim H.S., Chen P.-T., Wei Yu-H., Lan J.C.-W. Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts // Bioresource Technology. 2020. V. 302. Article number: 122889. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122889
32. Usmani Z., Sharma M., Sudheer S., Gupta V.K., Rajeev Bhat. R. Engineered Microbes for Pigment Production Using Waste Biomass // Current Genomics. 2020. V. 21. N 2. P. 80–95. DOI: 10.2174/1389202921999200330152007
33. Kot A.M., Błażej S., Kieliszek M., Gientka I., Bryś J., Reczek L., Pobiega K. Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019. V. 35. N 10. P. 157. DOI: 10.1007/s11274-019-2732-8
34. Kot A., Błażej S. Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes // Biocatalysis and agricultural biotechnology. 2020. V. 26. N 4. Article id: 101634. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101634
35. Bertacchi S., Pagliari S., Cantù C., Bruni I., Labra M., Branduardi P. Enzymatic Hydrolysate of Cinnamon Waste Material as Feedstock for the Microbial Production of Carotenoids // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021. V. 18. N 3. Article id: 1146. DOI: 10.3390/ijerph18031146
36. Frengova G., Simova E., Beshkova D. Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra* // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2004. V. 112. N 3. P. 133–141. DOI: 10.1385/abab:112:3:133
37. Qi F., Shen P., Hu R., Xue T., Jiang X., Qin L., Chen Y., Huang J. Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate // Biotechnology for Biofuels. 2020. V. 13. N 74. DOI: 10.1186/s13068-020-01712-0
38. Schneider T., Graeff-Hönninger P.S. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents // Energy. 2013. V. 61. N 1. P. 34–43. DOI: 10.1016/j.energy.2012.12.026
39. Libkind D., van Broock M. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006. V. 22. N 7. P. 687–692. DOI: 10.33448/rsd-v9i4.3057
40. Куликов Д.С., Колпакова В.В., Уланова Р.В., Чумикина Л.В., Бессонов В.В. Биологическая переработка зерна гороха с получением пищевых и кормовых белковых концентратов // Биотехнология. 2020. Т. 36. N 4. С. 49–58. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-49-58
41. Гольдштейн В.Г., Коваленок В.А., Кривцун Л.В. и др. Изучение параметров, влияющих на коагуляцию белка картофельного сока // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. N 5. С. 78–80. DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10520
42. Семенов Г.В. Вакуумная сублимационная сушка. Москва: Дели плюс, 2013. 264 с.
43. ГОСТ 10846-91. Зерно и продукты его переработки. Метод определения белка. М.: Стандартинформ, 2009, 8 с.
44. ГОСТ 13586.5-93. Зерно. Метод определения влажности. М.: Стандартинформ, 2009. 6 с.
45. ГОСТ Зерно. Метод определения зольности. Стандартинформ, 2019. 20 с.
46. ГОСТ 29033-91. Зерно и продукты его переработки. Метод определения жира. Стандартинформ, 2004. 5 с.
47. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А. и др. Пищевая химия: Лабораторный практикум. Пособие для вузов / под ред. А.П. Нечаева. СПб: ГИОРД, 2006, 304 с.
48. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation, Rome: FAO, 2013. 66 p.
49. ISO 13903:2005. Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот. Стандарт информ, 2020. 20 с.
50. Ashikhmin A., Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Incorporation of spheroidene and spheroidenone into light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2017. V. 170. P. 99–107. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.03.020
51. Gall A., Henry S., Takaichi S., Robert B., Cogdell R.J. Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions // Photosynthesis Research. 2005. V. 86. P. 25–35. DOI: 10.1007/s11220-005-3481-0
52. Черемных Е.Г., Кулешин А.В., Кулешина О.Н. Биотестирование пищевых добавок на инфузориях // Вестник РУДН, серия Экология и безопасность жизнедеятельности. 2011. Т. 3. С. 5–12.

53. Latha B.V., Jeevaratnam K., Murali H.S., Manja K.S. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source // *Indian Journal of Biotechnology*. 2005. V. 4. P. 353–357.
54. Kot A.M., Błażej S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis* –potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. V. 100. N 14. P. 6103–6117. DOI: 10.1007/S00253-016-7611-8
55. Goodwin T.W. Biosynthesis of carotenoids. The biochemistry of the carotenoids, vol. 1. Chapman and Hall / In: Goodwin TW (ed), 1980. P. 33–76. DOI: 10.1007/978-94-009-5860-9\_2
56. Souza Filho P.F., Nair R.B., Andersson D., Lennartsson P.R., Taherzadeh M.J. Vegan-mycoprotein concentrate from pea-processing industry byproduct using edible filamentous fungi // *Fungal Biology and Biotechnology*. 2018. V. 2. N 5. pp. 5. DOI: 10.1186/s40694-018-0050-9
57. Zhang Z., Zhang X., Tan T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation // *Bioresource Technology*. 2014. V. 157. P. 149–153. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.039
58. Vijayalakshmi G., Shobha B., Vanajakshi V., Divakar S., Manohar B. Response surface methodology for optimization of growth parameters for the production of carotenoids by a mutant strain of *Rhodotorula gracilis* // *European Food Research and Technology*. 2001. V. 213. N 3. P. 234–239. DOI: 10.1007/s002170100356
59. Bhosale P., Gadre R.V. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced beta-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis* // *Letters in Applied Microbiology*. 2002. V. 34. N 5. P. 349–353. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01095.x
60. Cescut J., Fillaudeau L., Molina-Jouve C., Uribelarrea J.-L. Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation // *Biotechnology for Biofuels*. 2014. V. 7. pp. 164. DOI: 10.1186/s13068-014-0164-0
61. Wiebe M.G., Koivuranta K., Penttilä M., Ruohonen L. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates // *BMC Biotechnology*. 2012. V. 12. N 1. pp. 26. DOI: 10.1186/1472-6750-12-26
62. Yaegashi J., Kirby J., Ito M., Sun J., Dutta T., Mirsiaghi M., Sundstrom E.R., Rodriguez A., Baidoo E., Tanjore D., Pray T. *Rhodospiridium toruloides*: a new platform organism for conversion of lignocellulose into terpene biofuels and bioproducts // *Biotechnology for Biofuels*. 2017. V. 10. N 1. pp. 241. DOI: 10.1186/s13068-017-0927-5
63. Tkachenko A., Tiginova E., Schulga S. Microbial lipids are an alternative raw material for biofuel // *Microbiology and Biotechnology*. 2012. V. 3. P. 17–33. DOI: 10.18524/2307-4663.2012.3(19).92616
64. Sotkowski M., Byrtusova D., Haronikova A., Vysoka M., Rape M., Shapaval V., Marova I. Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate // *Microorganisms*. 2019. V. 7. N 11. pp. 578. DOI: 10.3390/microorganisms7110578
65. Zhao X., Hu C., Wu S., Shen H., Zhao Z. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies // *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 2011. V. 38. P. 627–632. DOI: 10.1007/s10295-010-0808-4
66. Li Y., Zhao Z. (Kent), Bai F., High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture // *Enzyme and Microbial Technology*. 2007. V. 41. P. 312–317. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.02.008
67. Червякова О.П. Получение микробной биомассы, обогащенной каротиноидами // *Успехи в химии и химической технологии*. 2010. Т. 24. N 11(116). С. 51–53.
68. Simpson K.O., Nakayama T.S., Chichester S.O. Biosynthesis of yeast carotenoids // *Journal of Bacteriology*. 1964. V. 88. N 6. P. 1688–1694.
69. Демиденко Г.А., Шуранов В.В. Оценка токсичности кормов с использованием инфузорий *Paramecium caudatum* // *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2015. Т. 10. С. 5–11.
70. Серегина О.Б., Леонидов Н.Б. Простейшие как альтернативный биологический тест-объект в фармации // *Фармация*. 2003. Т. 4. С. 43–45.

## REFERENCES

1. Matilde C., Lippolis A., Fava F., Rodolfi L. Microbes: Food for the Future. *Foods*, 2021, vol. 10, no. 5, p. 971. DOI: 10.3390/foods10050971
2. Shurson G.C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients animal feed science and technology. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, vol. 235, pp. 60–76. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010
3. Martiniano S., Philippini R., Franco-Marcelino P.R. Effect of selenium uptake on growth metabolism in yeasts for the production of enriched single-cell protein using agro-industrial by-products. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2020, 7 pp. DOI: 10.1007/s13399-020-00885-w
4. Kieliszek M., Kot A., Bzducha-Wróbel A., Stanisław Błażej S. Biotechnological use of Candida yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biology Reviews*, 2017, vol. 31, no. 4, pp. 185–198. DOI: 10.1016/j.fbr.2017.06.001
5. Kolodina E.N., Artem'eva O.A., Kotkovskaya E.N., Pavlyuchenkova O.V., Pereselkova D.A. The study of the biological safety of yeast of the genus Candida as a potential source of feed protein. *Vestnik OreIGA*, 2016, vol. 5, no. 62, pp. 72–78. (In Russian) DOI: 10.15217/48484
6. Serba E.M., Sokolova E.N., Fursova N.A., Volkova G.S., Borshcheva Yu.A., Kurbatova E.I., Kuksova E.V. Obtaining biologically active additives based on enriched yeast biomass. *Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya* [Storage and processing of agricultural raw materials]. 2018, vol. 2, pp. 74–79. (In Russian)
7. Frengova G.I., Beshkova D.M., Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of Biotechnological Importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 36, no. 2, pp. 163–180. DOI: 10.1007/s10295-008-0492-9
8. Young A.J., Lowe G.M., Young A.J. and Lowe G.M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, vol. 385, no. 1, pp. 20–27. DOI: 10.1006/abbi.2000.2149
9. Shashkina M.Ya., Shashkin P.N., Sergeev A.V. The role of carotenoids in the prevention of the most common diseases. Drug therapy. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal* [Russian Journal of Biotherapy]. 2010, vol. 9, no. 1, pp. 77–86. (In Russian)
10. Kuzminova E.V., Semenenko M.P., Koshchayev A.G., Troshin A.N. Biological functions of carotenoids in the reproduction of cattle. *Scientific journal of KubGAU*, 2017, vol. 129, pp. 1124–1136. (In Russian) DOI: 10.21515/1990-4665-129-080
11. Lowe G.M., Booth L.A., Young A.J., Bilton R.F. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radical Research*, 1999, vol. 30, no. 2, pp. 141–151. DOI: 10.1080/10715769900300151
12. Saini R.K., Keum Y.-S., Daglia M., Rengasamy K.R. Dietary carotenoids in cancer chemoprevention and chemotherapy: A review of emerging evidence. *Pharmacological Research*, 2020, vol. 155, article number: 104730. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104730
13. Zhao B., Ren B., Guo R., Zhang W., Ma S., Yao Y., Yuan T., Liu Z., Liu X., Zhao B., et al. Supplementation of lycopene attenuates oxidative stress induced neuroinflammation and cognitive impairment via Nrf2/NF-κB transcriptional pathway. *Food and*

- Chemical Toxicology*, 2017, vol. 109, pt. 1, pp. 505–516. DOI: 10.1016/j.fct.2017.09.050
14. Kaulmann A., Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress-implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*, 2014, vol. 34, no. 11, pp. 907–929. DOI: 10.1016/j.nutres.2014.07.010
  15. Juhyun Shin, Min-Ho Song, Jae-Wook Oh, Young-Soo Keum and Ramesh Kumar Saini, Pro-oxidant Actions of Carotenoids in Triggering Apoptosis of Cancer Cells: A Review of Emerging Evidence. *Antioxidants*, 2020, vol. 9, p. 532. DOI: 10.3390/antiox9060532
  16. Orazova S.B., Karpenyuk T.A., Sharipov K.O., Azimkhanova B.B., Goncharova A.V. Study of the fatty acid composition and antimicrobial activity of total lipid extracts of green microalgae. *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo meditsinskogo universiteta [Bulletin of the Kazakh National Medical University]*. 2017, vol. 3, pp. 240–242. (In Russian)
  17. Saini R.K., Keum Y-S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: An updated review of critical issues. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, vol. 46, no. 5, pp. 657–674. DOI: 10.1007/s10295-018-2104-7
  18. Koschaev A.G., Kalyuzhny S.A., Koschaeva O.V., Gavrilenko D.V., Eliseev M.A. Functional feed additives from carotene-containing vegetable raw materials for poultry farming. *Nauchnyi zhurnal KubGAU [Scientific journal of KubGAU]*. 2013, vol. 93, pp. 334–343. (In Russian)
  19. Korumilli T., Susmita M. Carotenoid production by *Rhodotorula sp.* on fruit waste extract as a sole carbon source and optimization of key parameters. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International*. 2014, vol. 33, pp. 89–99.
  20. Tang W., Wang Y., Zhang J., Cai Y., He Z. Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. *Applied microbiology and biotechnology*, 2019, vol. 29, no. 4, pp. 507–517. DOI: 10.4014/jmb.1801.01022
  21. Moliné M., Flores M.R., Libkind D., del Carmen D.M., Fariás M.E., van Broock M. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2010, vol. 9, pp. 1145–1151. DOI: 10.1039/c0pp00009d
  22. Buzzini P., Innocenti M., Turchetti B., Libkind D., van Broock M., Mulinacci N. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2007, vol. 53, pp. 1024–1031. DOI: 10.1139/W07-068
  23. Matselyukh B.P., Matselyukh D.Ya., Golembiovskaya S.L., Gural S.V. Isolation of *Phaffia rhodozyma* yeasts mutants under increased carotenoid content. *Biotechnologia Acta*, 2014, vol. 7, no. 4, pp. 49–53. DOI: 10.15407/biotech7.04.049
  24. Alakra F., Saygün A., Yeşilçubuk N.S. Biotechnological production of lipids and carotenoids from *Rhodospiridium toruloides* Y27012. *European Journal of Science and Technology*, 2020, vol. 19, pp. 156–164. DOI: 10.31590/ejosat.708556
  25. Wu C.C., Ohashi T., Kajijura H., Sato Y., Misaki R., Honda K., Limtong S., Fujiyama K. Functional characterization and overexpression of Delta 12-desaturase in the oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* for production of linoleic acid-rich lipids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, vol. 131, no. 6, pp. 631–639. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2021.02.002
  26. Caporusso A., Capece A., De Bari I. Oleaginous Yeasts as Cell Factories for the Sustainable Production of Microbial Lipids by the Valorization of Agri-Food Wastes. *Fermentation-Basel*, 2021, vol. 7, no. 2, p. 50. DOI: 10.3390/fermentation7020050
  27. Papaniklaou S., Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, vol. 113, no. 8, pp. 1031–1051. DOI: 10.1002/ejlt.201100014
  28. Marova I., Carnecka M., Haliénova A., Certik M., Dvorakova T., Haronikova A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 2012, vol. 95, pp. 338–342. DOI: 10.1016/j.jenvman.2011.06.018
  29. Gavrilenko D.V., Koshaev A.G. Biotechnology for obtaining a complex feed additive for poultry. *Collection of scientific papers KNTsZV*, 2019, vol. 8, no. 3, pp. 165–168. (In Russian) DOI: 10.34617/tdf5-y729
  30. Abramova I.M., Soloviev A.O., Turshatov M.V., Krivchenko V.A., Kononenko V.V. Protein feedstuff production based on microbial biomass. *IOP Conference Series-Earth and Environmental Science*, 2020, vol. 548, article number: 082080. DOI: 10.1088/1755-1315/548/8/082080
  31. Ng H.S., Kee P.E., Yim H.S., Chen P.-T., Wei Yu-H., Lan J.C.-W. Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts. *Bioresource Technology*, 2020, vol. 302, article number: 122889. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122889
  32. Usmani Z., Sharma M., Sudheer S., Gupta V.K., Rajeev Bhat. R. Engineered Microbes for Pigment Production Using Waste Biomass. *Current Genomics*, 2020, vol. 21, no. 2, pp. 80–95. DOI: 10.2174/1389202921999200330152007
  33. Kot A.M., Błażej S., Kieliszek M., Gientka I., Bryś J., Reczek L., Pobiega K. Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, vol. 35, no. 10, pp. 157. DOI: 10.1007/s11274-019-2732-8
  34. Kot A., Błażej S. Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 2020, vol. 26, no. 4, article number: 101634. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101634
  35. Bertacchi S., Pagliari S., Cantù C., Bruni I., Labra M., Branduardi P. Enzymatic Hydrolysate of Cinnamon Waste Material as Feedstock for the Microbial Production of Carotenoids. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, vol. 18, no. 3, article number: 1146. DOI: 10.3390/ijerph18031146
  36. Frengova G., Simova E., Beshkova D. Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, vol. 112, no. 3, pp. 133–141. DOI: 10.1385/abab:112:3:133
  37. Qi F., Shen P., Hu R., Xue T., Jiang X., Qin L., Chen Y., Huang J. Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, vol. 13, no. 74. DOI: 10.1186/s13068-020-01712-0
  38. Schneider T., Graeff-Hönninger P.S. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, 2013, vol. 61, no. 1, pp. 34–43. DOI: 10.1016/j.energy.2012.12.026
  39. Libkind D., van Broock M. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 22, no. 7, pp. 687–692. DOI: 10.33448/rsd-v9i4.3057
  40. Kulikov D.S., Kolpakova V.V., Ulanova R.V., Chumikina L.V., Bessonov V.V. Biological processing of pea grain to obtain food and feed protein concentrates. *Biotechnology*, 2020, vol. 36, no. 4, pp. 49–58. (In Russian) DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-49-58
  41. Goldstein V.G., Kovalenok V.A., Krivtsov L.V. et al. Investigation of parameters influencing coagulation of protein in potato juice. *Achievements of science and technology of the agro-industrial complex*, 2018, vol. 32, no. 5, pp. 78-80. (In Russian) DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10520
  42. Semenov G.V. *Vakuumnaya sublimatsionnaya sushka [Vacuum freeze drying]*. Moscow. DeLi plus Publ., 2013, 264 p. (In Russian)



43. GOST 10846-91. *Zerno i produkty ego pererabotki. Metod opredeleniya belka* [GOST 10846-91. Grain and products of its processing. Protein determination method]. Moscow, Standartinform Publ., 2009, 8 p. (In Russian)
44. GOST 13586.5-93. *Zerno. Metod opredeleniya vlazhnosti* [GOST 13586.5-93. Corn. Moisture determination method]. Moscow, Standartinform Publ., 2009, 6 p. (In Russian)
45. GOST Zerno. *Metod opredeleniya zol'nosti* [GOST 10847-2019. Corn. Ash content determination method]. Moscow, Standartinform Publ., 2019, 20 p. (In Russian)
46. GOST 29033-91. *Zerno i produkty ego pererabotki. Metod opredeleniya zhira* [GOST 29033-91. Grain and products of its processing. Fat determination method]. Standards Publ., 2004, 5 p. (In Russian)
47. Nechaev A.P., Traubenberg S.E., Kochetkova A.A. et. al. *Pishchevaya khimiya: Laboratornyy praktikum. Posobiye dlya vuzov* [Food Chemistry: Laboratory Workshop. Allowance for universities]. St. Petersburg, GIORP Publ., 2006, 304 p. (In Russian)
48. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation, Rome: FAO. 2013, 66 p.
49. ISO 13903:2005. *Korma, kombikorma. Metod opredeleniya sodержaniya aminokislot* [ISO 13903:2005. Feeds, compound feeds. Method for determination of amino acids]. Moscow, Standartinform Publ, 2020, 20 p. (In Russian)
50. Ashikhmin A., Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Incorporation of spheroidene and spheroidenone into light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, vol. 170, pp. 99–107. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.03.020
51. Gall A., Henry S., Takaichi S., Robert B., Cogdell R.J. Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions. *Photosynthesis Research*, 2005, vol. 86, pp. 25–35. DOI:10.1007/s11120-005-3481-0
52. Cheremnykh E.G., Kuleshin A.V., Kuleshina O.N. Biotesting of food additives on ciliates. *Vestnik RUDN, seriya Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti* [Bulletin of RUDN University, series Ecology and life safety]. 2011, vol. 3, pp. 5–12. (In Russian)
53. Latha B.V., Jeevaratnam K., Murali H.S., Manja K.S. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. *Indian Journal of Biotechnology*. 2005, vol. 4, pp. 353–357.
54. Kot A.M., Błażej S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis* –potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, vol. 100, no. 14, pp. 6103–6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8
55. Goodwin T.W. Biosynthesis of carotenoids. The biochemistry of the carotenoids, vol 1. Chapman and Hall. In: Goodwin T.W. (ed). 1980, pp. 33–76. DOI: 10.1007/978-94-009-5860-9\_2
56. Souza Filho P.F., Nair R.B., Andersson D., Lennartsson P.R., Taherzadeh M.J. Vegan-mycoprotein concentrate from pea-processing industry byproduct using edible filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2018, vol. 2, no. 5, p. 5. DOI: 10.1186/s40694-018-0050-9
57. Zhang Z., Zhang X., Tan T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, 2014, vol. 157, pp. 149–153. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.039
58. Vijayalakshmi G., Shobha B., Vanajakshi V., Divakar S., Manohar B. Response surface methodology for optimization of growth parameters for the production of carotenoids by a mutant strain of *Rhodotorula gracilis*. *European Food Research and Technology*, 2001, vol. 213, no. 3, pp. 234–239. DOI: 10.1007/s002170100356
59. Bhosale P., Gadre R.V. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced beta-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, vol. 34, no. 5, pp. 349–353. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01095.x
60. Cescut J., Fillaudeau L., Molina-Jouve C., Urbelarrea J.-L. Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, vol. 7, no. 164. DOI: 10.1186/s13068-014-0164-0
61. Wiebe M.G., Koivuranta K., Penttila M., Ruohonen L. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology*, 2012, vol. 12, no. 1, pp. 26. DOI: 10.1186/1472-6750-12-26
62. Yaegashi J., Kirby J., Ito M., Sun J., Dutta T., Mirsiaghi M., Sundstrom E.R., Rodriguez A., Baidoo E., Tanjore D., Pray T. *Rhodospiridium toruloides*: a new platform organism for conversion of lignocellulose into terpene biofuels and bioproducts. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 241. DOI: 10.1186/s13068-017-0927-5
63. Tkachenko A., Tigonova E., Schulga S. Microbial lipids are an alternative raw material for biofuel. *Microbiology and Biotechnology*, 2012, vol. 3, pp. 17–33. DOI: 10.18524/2307-4663.2012.3(19).92616
64. Sztokowski M., Byrtusova D., Haronikova A., Vysoka M., Rape M., Shapaval V., Marova I. Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 11, pp. 578. DOI: 10.3390/microorganisms7110578
65. Zhao X., Hu C., Wu S., Shen H., Zhao Z. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 2011, vol. 38, no. 5, pp. 627–632. DOI: 10.1007/s10295-010-0808-4
66. Li Y., Zhao Z., Kent, Bai F., High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, vol. 41, pp. 312–317. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.02.008
67. Chervyakova O.P. Obtaining microbial biomass enriched with carotenoids. *Uspekhi v khimii i khimicheskoi tekhnologii* [Advances in chemistry and chemical technology]. 2010, vol. 24, no. 11(116), pp. 51–53. (In Russian)
68. Simpson K.O., Nakayama T.S., Chichester S.O. Biosynthesis of yeast carotenoids. *Journal of Bacteriology*. 1964, vol. 88, no. 6, pp. 1688–1694.
69. Demidenko G.A., Shuranov V.V. Evaluation of feed toxicity using *Paramecium caudatum* ciliates. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University]. 2015, vol. 10, pp. 5–11. (In Russian)
70. Seregina O.B., Leonidov N.B. Protozoa as an alternative biological test object in pharmacy. *Farmatsiya* [Pharmacy]. 2003, vol. 4, pp. 43–45. (In Russian)

#### КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Валентина В. Колпакова спланировала научную работу, обработала и проанализировала данные, написала рукопись. Рузалия В. Уланова получила экспериментальные данные, написала рукопись. Дмитрий С. Куликов получил экспериментальные

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Valentina V. Kolpakova planned, processed and analysed the material and participated in writing the manuscript. Ruzaliya V. Ulanova obtained experimental and participated in writing the manuscript. Denis S. Kulikov obtained experimental data, designed the tables, graphic material

данные, оформил таблицы, графический материал, литературу. Валентина А. Гулакова провела опыты и получила результаты. Лина В. Васильева описала методики выращивания штамма, оформила результаты. Юлия Ю. Берестовская, Елена Г. Черемных, Александр А. Ашихмин получили экспериментальные данные. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

and sourced literature. Valentina A. Gulakova conducted experiments and obtained results. Lina V. Vasilyeva described methods for growing the strain and undertook presentation of the results. Yulia Yu. Berestovskaya, Elena G. Cheremnykh and Alexander A. Ashikhmin obtained experimental data. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism or other ethical transgressions.

**NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION**

The authors declare no conflict of interest.

**ORCID**

Валентина В. Колпакова / Valentina V. Kolpakova <https://orcid.org/0000-0002-7288-8569>

Рузалия В. Уланова / Ruzaliya V. Ulanova <https://orcid.org/0000-0002-6315-721>

Денис С. Куликов / Denis S. Kulikov <https://orcid.org/0000-0003-2171-0522>

Валентина А. Гулакова / Valentina A. Gulakova <https://orcid.org/0000-0001-8393-9256>

Лина В. Васильева / Lina V. Vasilyeva <https://orcid.org/0000-0002-9811-9602>

Юлия Ю. Берестовская / Yulia Yu. Berestovskaya <https://orcid.org/0000-0002-6185-820X>

Елена Г. Черемных / Elena G. Cheremnykh <https://orcid.org/0000-0001-5166-4462>

Александр А. Ашихмин / Alexander A. Ashikhmin <https://orcid.org/0000-0001-6978-8017>