ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *CRYPTOCOCCUS FLAVESCENS* И *RHODOTORULA SPECIES* – ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Кулиш С.А.¹, Уласень Е.Ю.², Сапунова Л.И.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск,
leonida@mbio.bas-net.by

²Белорусский государственный университет, Минск,
ulasen_liza@mail.ru

Спрос на белок животного происхождения, связанный с ростом народонаселения, постоянно повышается, что обуславливает увеличение производства кормов и кормовых добавок. Особое место в их ряду занимают активные (живые) дрожжи, которые усиливают пролиферацию бифидо- и лактофлоры, предотвращают расстройства функции ЖКТ, улучшают пищеварение, снижают стресс-восприимчивость, усиливают физический, иммунный и репродуктивный статус животных, повышают их сохранность и продуктивность [1, 5, 7, 8, 10, 11]. Для усиления эффективности в состав кормовых добавок на основе одной или более дрожжевых культур включают пробиотики, ферменты, витамины, поли- и олигосахариды, пептиды, каротиноиды, минеральные или органические наполнители, несущие дополнительную функциональную нагрузку. Именно такой подход, сочетающий в себе биотехнологическое получение микробной составляющей и дополнение ее разнообразными биологически активными компонентами, чаще всего реализуется при получении кормовых добавок комплексного действия.

Цель настоящей работы состояла в обосновании условий совместного культивирования дрожжевых грибов *Cryptococcus flavescens* и *Rhodotorula* sp. – продуцентов комплекса биологически активных веществ для создания новой кормовой добавки полифункционального действия.

Штаммы *C. flavescens* и *Rhodotorula* sp. выращивали совместно глубинным способом в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (150–180 об/мин) при температуре 10–35 °С в течение 48 ч. Питательная среда для совместного культивирования дрожжевых культур содержала сухое обезжиренное молоко (8 масс. %), сухую молочную сыворотку (5 масс. %) или смесь молока и молочной сыворотки (соответственно 3,75 масс. % + 2,0 масс. % или 4,0 масс. % + 2,5 масс. %). Инокуляцию среды проводили суспензией дрожжевых культур (6 об. %, ОП₆₀₀ = 0,2±0,02), взятых в различных соотношениях.

Титр жизнеспособных дрожжевых клеток устанавливали методом предельных разведений и выражали количеством колониеобразующих единиц в 1 мл культуральной жидкости (КОЕ/мл). Содержание биологически активных метаболитов определяли общепринятыми методами [2–4, 6, 9, 12].

Результаты представлены средним значением показателей не менее двух опытов, выполненных в трех повторностях.

Установлено, что при использовании посевного материала с содержанием в нем культур *C. flavescens* и *Rhodotorula* sp., составляющим соответственно 80 и 20 об. % (объемное соотношение 4 : 1), наибольший уровень продукции поли- и олигосахаридов, каротиноидов наблюдается в среде, содержащей молочную сыворотку (2,5 масс. %) и молоко (4,0 масс. %). Высокий суммарный титр жизнеспособных клеток при совместном выращивании дрожжей отмечается в любой из исследованных питательных сред и варьируется в пределах от $4,7 \cdot 10^8$ до $8,7 \cdot 10^8$ КОЕ/мл (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние посевного материала и состава питательной среды на рост дрожжевых грибов и образование биологически активных метаболитов

Доля культур в посевном материале, об. %		Углеводный состав питательной среды для культивирования дрожжевых грибов, масс. %:			
<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>C. flavescens</i>	молочная сыворотка, 5,00	молочная сыворотка + молоко		молоко, 8,00
			3,75+2,00	2,50+4,00	
<i>Суммарный титр жизнеспособных дрожжевых грибов, КОЕ/мл</i>					
10	90	$4,9 \cdot 10^8$	$6,9 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^8$
20	80	$7,5 \cdot 10^8$	$7,7 \cdot 10^8$	$8,7 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^8$
50	50	$5,5 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^8$	$4,7 \cdot 10^8$
0	100	$4,4 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^9$
100	0	$3,7 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$
<i>Относительное содержание полисахаридов, %</i>					
10	90	165	145	138	148
20	80	153	148	183	170
50	50	145	145	145	168
0	100	178	130	148	138
100	0	100	105	110	130
<i>Относительное содержание олигосахаридов, %</i>					
10	90	104	108	110	126
20	80	127	130	134	124
50	50	110	112	113	118
0	100	100	103	105	108
100	0	0	0	0	0
<i>Относительное содержание каротиноидов, %</i>					
10	90	760	750	880	830
20	80	910	995	1100	890
50	50	940	920	950	910
0	100	100	110	120	150
100	0	1000	950	970	920

Согласно полученным данным (табл. 2), при совместном культивировании дрожжевые грибы *C. flavescens* и *Rhodotorula* sp. растут в

диапазоне температуры от 10 до 35 °С с оптимумом при 20–30 °С, что подтверждается высоким выходом жизнеспособных клеток ($8,2\text{--}8,7 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) и внеклеточных биологически активных веществ.

Таблица 2 – Влияние температуры на рост дрожжевых грибов и образование биологически активных метаболитов

Температура культивирования, °С	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Относительное содержание метаболитов, %:					
		полисахариды	олигосахариды	каротиноиды	бета-галактозидаза	протеаза	липаза
10	$2,2 \cdot 10^3$	100	100	100	100	100	100
15	$7,6 \cdot 10^5$	122	148	120	157	131	118
20	$8,3 \cdot 10^8$	156	256	135	282	178	133
25	$8,7 \cdot 10^8$	158	260	139	298	182	135
30	$8,2 \cdot 10^8$	152	253	134	296	177	130
35	$5,4 \cdot 10^6$	150	121	125	116	128	111

Отмечено, что в отсутствие консервантов жизнеспособность *C. flavescens* и *Rhodotorula* sp. в составе консорциума сохраняется не менее 3 мес при 6–8 °С и не более 1 мес при 20–25 °С (табл. 3).

Таблица 3 – Жизнеспособность дрожжевых грибов в составе консорциума

Температура хранения, °С	Длительность хранения, мес	Суммарный титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл
20–25	0	$8,9 \cdot 10^8$
	1	$2,8 \cdot 10^8$
	2	—*
6–8	0	$8,7 \cdot 10^8$
	3	$4,5 \cdot 10^8$
	6	$1,6 \cdot 10^4$
	12	—

Примечание: * - автолиз дрожжевых клеток

Таким образом, полученные результаты указывают на возможность совместного глубинного культивирования дрожжевых грибов *C. flavescens* и *Rhodotorula* sp., принадлежащих к различным таксономическим группам, для синтеза комплекса биологически активных метаболитов, представленных поли- и олигосахаридами, каротиноидами, ферментами. Дальнейшие исследования будут направлены на оценку про- и пребиотического, иммуномодулирующего, гепатопротекторного, антиоксидантного действия консорциума дрожжевых культур *C. flavescens* и *Rhodotorula* sp. и их метаболитов.

Литература

1. Лобанок А.Г., Сапунова Л.И., Шарейко Н.А., Долженкова Е.А. Дрожжи как основа биологически активных кормовых добавок про- и пребиотического действия // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2014. № 1. С. 17–22.
2. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности: ГОСТ 20264.2-88 / Государственный Комитет СССР по стандартам. – М.: Изд-во стандартов, 1988. 11 с.
3. Сапунова Л.И., Костеневич А.А., Лобанок А.Г., Шарейко Н.А., Жалнеровская А.В., Долженкова Е.А. Получение и оценка эффективности кормовой добавки, содержащей галактоолигосахариды // Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2013. Т. 8. Ч. 1. С. 224–229.
4. Чечета О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8. Вып. 2. С. 320–326.
5. Kiros T.K., Agyekum A.K., Wang J., D'Inca R., Beaulieu D.A., Auclair E., Van Kessel A.G. Supplementation with live yeast increases rate and extent of *in vitro* fermentation of nondigested feed ingredients by fecal microbiota // J. Anim. Sci. 2019. V. 97 (4). P. 1806–1818.
6. Kuby S.A., Lardy H.A. Purification and kinetics of β -galactosidase from *E. coli*, strain K-12 // J. Amer. Chem. Soc. 1953. V. 75 (4). P. 890–896.
7. Lu H., Wilcock P., Adeola O. Effect of live yeast supplementation to gestating sows and nursery piglets on postweaning growth performance and nutrient digestibility // J. Anim. Sci. 2019. V. 97 (6). P. 2534–2540.
8. Nelson J.R., McIntyre D.R., Pavlidis H.O., Archer G.S. Reducing stress susceptibility of broiler chickens by supplementing a yeast fermentation product in the feed or drinking water // Animals (Basel). 2018. V. 8 (10). pii: E173.
9. Pirog T.P., Voronenko A.A., Ivakhniuk M.O. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan biosynthesis on mixture of molasses and sunflower oil // Biotechnol. Acta. 2017. V. 10 (4). P. 25–33.
10. Suarez C., Guevara C.A. Probiotic use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in animal feed // Res. J. Zool. 2018. Vol. 1:1.
11. Yalcin S. The nutritive value of live yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and its effect on milk composition and some blood parameters of dairy cows // Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2011. V. 24 (10). – P. 1377–1385.
12. Yang G., Wu J., Xu G., Yang L. Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. by encapsulation in hydrophobic sol-gel materials // Bioresour. Technol. 2009. V. 100 (19). P. 4311–4316.