

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(НИУ «БелГУ»)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ И СТАБИЛИЗАЦИЯ КАРОТИНОИДОВ,
ПОЛУЧЕННЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 04.04.01 Химия
очной формы обучения, группы 11001840
Сенченкова Владислава Юрьевича

Научный руководитель
д.б.н., доцент, заведующая
кафедрой биотехнологии и
микробиологии Батлуцкая И.В.

Консультант:
Д.б.н, профессор
Соляникова И.П.

Рецензент:
к.х.н., директор по качеству ООО
«Новистем», Г.В. Прохорова

БЕЛГОРОД 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.....	5
1.1 Общая характеристика каротиноидов.....	5
1.2 Оценка производства каротиноидов в России и мире.	10
1.3 Источники получения каротиноидов. Достоинства и недостатки.....	13
1.4. Дрожжи и дрожжеподобные грибы как продуценты каротиноидов.....	17
1.5 Биосинтез каротиноидов у дрожжей рода <i>Rhodotorula</i>	21
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	25
2.1 Изучение культуральных, морфологических, физиолого-биохимических свойств дрожжей	25
2.2 Культивирование дрожжей	33
2.3 Определение содержания каротиноидов в биомассе дрожжей.....	35
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	55
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	56
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	64

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время всё большую актуальность приобретают методы получения биологически активных веществ природного происхождения с высоким энергетическим и экономическим потенциалами, применяемых для нужд сельскохозяйственной, пищевой и фармацевтических отраслей. Данные вещества оказывают благоприятный физиологический эффект на организм, начиная от биохимических процессов синтеза и распада белков, гормонов, нуклеиновых кислот и других веществ в тканях самого организма, заканчивая влиянием данных БАВ на настроение, чувства и эмоции. Особый интерес представляют собой каротиноиды, являющиеся распространенной и многочисленной группой природных пигментов, потребность в которых с каждым годом становится всё больше.

Основным источником получения каротиноидов большое количество времени являлось растительное сырье. Однако, такие факторы, как сезонность, неблагоприятные погодные условия, большие площади и антропогенное влияние (например, использование искусственных пестицидов и агрохимикатов) привели к тому, данный способ получения стал экономически невыгодным, что также повлияло на цену продукта. Поэтому кроме химического синтеза и экстракции из растений и водорослей, также стал часто применим биотехнологический метод получения каротиноидов [1].

Применение бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов хоть и является еще менее эффективным способом получения данных БАВ по сравнению с направленным химическим синтезом и переработкой растительного сырья, но позволяет использовать в качестве сырья побочные продукты и отходы производства пищевых предприятий и объектов сельского хозяйства. При этом, управляя условиями культивирования и составом питательного субстрата, можно не только достигать различных концентраций определенного каротиноида в получаемой биомассе, но и получать в качестве

побочных продуктов другие ценные вещества (витамины, белки, ферменты) [2,3].

Окислительная и ферментативная деструкция, разрушение при длительной сушке и термической обработке каротиноидов обуславливают затруднения при их производстве. Исходя из этого, становится актуальным поиск эффективного способа стабилизации получаемого продукта.

Перспективными продуцентами β -каротина являются пигментообразующие дрожжи *Rhodotorula sp.*

Цель исследования заключалась в определении суммы каротиноидов в биомассе дрожжей *Rhodotorula sp.*, культивируемой на различных питательных субстратах.

Задачи исследования:

1. Изучить комплекс образуемых каротиноидных пигментов у дрожжей *Rhodotorula sp.* и отобрать штаммы с повышенным каротиногенезом;
2. Исследовать особенности процесса биосинтеза каротиноидов отобранными штаммами под влиянием различных условий культивирования и изменения состава питательных сред;
3. Осуществить анализ полученных экстрактов на наличие суммы каротиноидов.

«хвост -хвост». Молекула β -каротина состоит из восьми изопреноидных фрагментов:

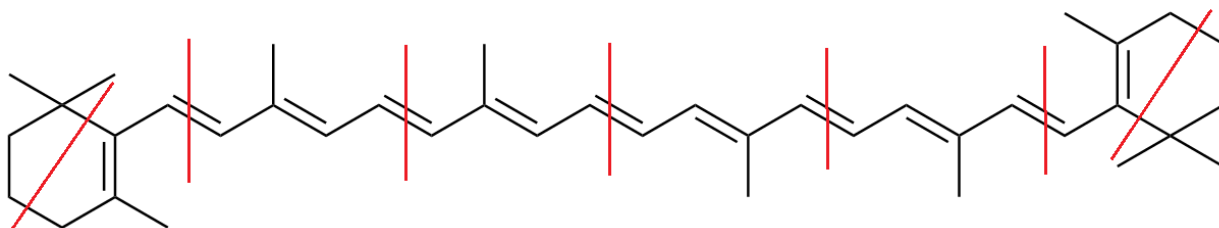


Рис. 2. Разделение молекулы β -каротина на изопреноидные фрагменты

Именно благодаря системе двойных связей, выполняющих функции хромофора, определяются спектральные характеристики индивидуальных каротиноидов.

На концах одних молекул обычно располагаются шестичленные циклы, у других могут находиться пятичленные или алифатические углеводородные группы и другие модификации молекул. Также могут содержать в своем составе, преимущественно в циклах, альдегидные, карбоксильные, эпоксидные, гидроксильные и другие группы. Кислородные производные каротиноидов называются ксантофиллами.

Для каротиноидов характерна геометрическая изомерия, проявляющаяся в существовании *цис*- и *транс*-изомеров по всем и/или по отдельным двойным связям.

Такие каротиноиды, как фитоин и фитофлюин, являются бесцветными и относятся к алифатическим полиенам, но к этой группе принадлежит большое количество природных пигментов, окраска которых варьируется от желтой до красной. Обусловлено это количеством конъюгированных двойных связей в гидрокарбоновой цепи, более того, с их увеличением абсорбционный максимум сдвигается в сторону больших длин волн.

Растворимость каротиноидов в органических растворителях различна и жестко зависит от строения молекулы, наличия определенных

функциональных групп и различна для каротинов и ксантофиллов, например, растворимость β -каротина и лютеина, указанная в таблице 1 [4].

Таблица 1. Растворимость лютеина и β -каротина в органических растворителях [4]

Растворитель	Растворимость*, мг/л	Растворитель	Растворимость*, мг/л
Ацетон	800/200	Этанол	300/30
Ацетонитрил	100/10	Этилацетат	800/500
Бензол	600/4000	Диэтиловый эфир	2000/1000
Хлороформ	6000/2000	н-Гексан	20/600
Циклогексан	50/2000	2-Пропанол	400/40
Циклогексанон	4000/2000	Метанол	200/10
Дихлорметан	800/6000	МТБЕ	2000/1000
ДМФА	1000/200	Тetraгидрофуран	800/10000
ДМСО	1000/30	Толуол	500/4000

* - Растворимость лютеина / растворимость β -каротина

Каротиноиды в воде нерастворимы, а при добавлении воды в растворы и экстракты каротиноидов, полученные на основе органических растворителей, смешивающихся с водой, они образуют коллоидные частицы. Слабое связывание молекул каротиноидов в данных коллоидных частицах объясняется образованием водородных связей, дисперсионных и ориентационных, гидрофобных взаимодействий. Образующиеся коллоидные частицы в водных полярных растворителях приводят к сильным изменениям спектральных характеристик анализируемого образца с гипсохромным или батохромным смещением.

Классификация каротиноидов довольно разнообразна. По химическому составу их делят на каротины и ксантофилы. Каротины – углеводороды состава $C_{40}H_{56}$, различающиеся типом концевых групп, одна из которых чаще всего бывает циклической. Самым типичным представителем является β -

каротин, изображенный на рисунке 1. Каротинами являются α -каротин, β -каротин, γ -каротин, δ -каротин, ϵ -каротин.

Ксантофиллы – каротиноиды, содержащие гидроксильные (-ОН) или карбонильные (=O) заместители. Данная группа каротиноидов обширна и включает в себя основное количество разнообразных каротиноидов, которых трудно классифицировать внутри данной группы из-за различного числа и положения заместителей и потому, что ксантофиллы могут содержать различные типы концевых C_9 фрагментов. Типичными представителями этой группы могут являться ликопин ($C_{40}H_{56}$), нейроспорин ($C_{40}H_{58}$), ζ -каротин ($C_{40}H_{60}$), фитофлуин ($C_{40}H_{62}$), фитоин ($C_{40}H_{64}$). Структурная формула ликопина изображена на рисунке 3 [4].

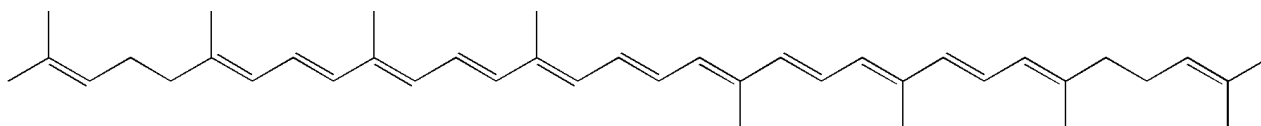


Рис. 3. Структурная формула ликопина

Существуют также эпокси-соединения каротиноидов, которые могут образовывать как каротины, так и ксантофиллы. C_{45} - и C_{50} - каротиноиды были выделены из галофильных бактерий класса архей рода *Halobacterium*. У *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884) был обнаружен стафилоксантин (C_{30}), а в клетках *Corynebacterium glutanicum* (Kinoshita et al., 1958) Abe et al., 1967 – декапреноксантин (C_{50}). Также существуют апокаротиноиды, гидрофильные каротиноиды (образующие гликозиды). В настоящее время обнаружены, исследованы и описаны около 600-700 различных каротиноидов.

Каротиноиды могут выполнять функции вспомогательных пигментов в фотосинтезе, увеличивая поглощение энергии света каротиноидами, которое переводит их в высокоэнергетическое возбужденное состояние, при этом происходит $\pi \rightarrow \pi$ переход, в котором один из π -электронов двойной связи транслоцируется на π -орбиталь более высокой энергии. π -электроны сильно делокализованы и в возбужденном состоянии их энергия относительно мала, так что энергия, необходимая для перехода в состояние возбуждения

относительно невелика и соответствует энергии фотонов видимого диапазона в области 400-500 нм. Таким образом, каротиноиды имеют желтый, оранжевый или красный цвет. Связь между структурой хромофора и спектром его поглощения широко используется для идентификации каротиноидов. Но способность иметь окраску не является единственной функцией каротиноидов. Они имеют определенные фотохимические свойства, которые являются основой для выполнения более важных функций. Уникальные фотохимические свойства этих соединений состоят в особой организации возбужденных синглетных и триплетных орбиталей низких энергий. Характерное для них высокое поглощение света видимого диапазона, как считается, обеспечивается сильно расширенным переходом из состояния S_0 в другой синглетный возбужденное состояние S_2 . Энергетические уровни этого возбужденного состояния (и состояния S_1 , в которое молекула может переходить в результате внутренней конверсии), расположенные выше, чем у молекул хлорофилла, так что в такой системе может происходить синглет-синглетный перенос энергии с возбужденных молекул каротиноидов в результате чего молекулы хлорофилла будут возбуждаться до состояния S_1 , играющего ключевую роль в процессе фотосинтеза.

Прямое формирование триплетного состояния (T_1) из возбужденного синглетного (S_1 и S_2) маловероятно. Но его формирования с помощью процесса переноса энергии из других молекул в триплетном состоянии может быть очень эффективным. Причем такой перенос с хлорофилла и других порфиринов каротиноидами происходит гораздо быстрее, чем альтернативный перенос энергии на кислород, который приводит к образованию синглетного кислорода, высокорекреационного соединения, способного повредить клетки. Также каротиноиды могут быть акцепторами возбужденного состояния кислорода, если такой будет сформирован. Триплетное состояние каротиноидов имеет настолько низкую энергию, эти молекулы не способны генерировать свободные радикалы и энергия их возбужденного состояния просто рассеивается в виде тепла. Именно

вышеописанные свойства каротиноидов позволяют им участвовать в защите комплексов реакционного центра фотосинтеза от комбинированного воздействия света и синглетного кислорода, а также будет способствовать эффективной терапии пациентов, у которых наблюдается аккумуляция свободных порфиринов в коже (эритропоэтическая протопорфирия). Для того чтобы такой перенос энергии было высокоэффективным, необходимо, чтобы молекулы находились на близком расстоянии и были ориентированы определенным образом друг относительно друга, например, с помощью соединяющих их белков [5]

1.2 Оценка производства каротиноидов в России и мире.

Важнейшими компонентами питания для нормального функционирования организма являются витамины и другие биологически активные вещества, в том числе каротиноиды. Как известно, недостаток витаминов также приводит к нарушению многих процессов в организме, в частности, изменению активности ферментов, возникновению многих заболеваний, уменьшению продолжительности жизни.

В промышленном птицеводстве каротиноиды используют для увеличения пигментации желтков и кожи бройлеров, а в рыбоводстве их используют для увеличения пигментации лососевых. В пищевой промышленности каротиноиды используются в качестве натуральных пищевых красителей для окраски молочной, кисломолочной, масложировой продукции, фруктово-ягодных наполнителей, кондитерских изделий, напитков и биологически активных добавок к пище. Также каротиноиды могут входить в состав косметики и парфюмерии – красок для волос, шампуней, помад, кремов, зубных паст.

Исследования ученых США, Японии и Канады свидетельствуют о прямой зависимости между уровнем потребления астаксантина и снижением уровня онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [6]. Ежегодно

раком болеет около 10 млн человек, из них умирает 6,2 миллиона человек, при этом 80% онкологических заболеваний зависит от образа жизни. 30-50% опухолей возникает из-за несбалансированного питания, в частности с низким содержанием каротиноидов. Обогащение рациона питания каротиноидами (β -каротином – 6-8 мг в день) позволяет снизить риск рака легких в 2-3 раза, рака пищевода в 3-5 раз, шейки матки в 3-5 раз [7,8].

Согласно последним исследованиям ВВС, мировой рынок каротиноидов составил \$ 1500000000 в 2014 году, этот рынок достиг почти \$ 1800000000 в 2019 году, со средним темпом годового прироста (CAGR) 3,9%. Из государственного реестра от 12 января 2015 года на российском рынке каротиноидов представлен 21 поставщик: 5 из Китая, 5 из Германии, 4 из России, 3 из Франции, 2 из Перу и 2 из Испании. Все четыре российских каротиноида производятся компанией «Аббат-Сервис»: «Фидактив красный», «Фидактив желтый», «Биофон красный», «Биофон желтый» [10].

Широкое производство каротиноидных кормовых добавок осуществляют концерны BASF и DSM Nutritional Products, а также Kaesler Nutrition, ITPSA, Zheciанg ZMC-Europe, Foshan Bio-Technology Co. и др. Среди отечественных производителей кормовых добавок также можно выделить «Петрохим», «ЭКО РЕСУРС» и «БИОКОЛ» [11].

Прогнозируется, что рынок каротиноидов вырастет с 1,5 млрд. долл. США в 2019 году до 2,0 млрд. долл. США к 2026 году, зафиксировав среднегодовой темп роста в 4,2% в течение прогнозируемого периода. Это связано с растущим использованием природных каротиноидов в качестве пищевых красителей и инновациями в технологиях, используемых для экстракции каротиноидов [12].

Лютеиновый сегмент рынка будет расти самыми высокими совокупными темпами роста спроса. Связано это со способностью лютеина лечить возрастные нарушения зрения (катаракта и дегенерация желтого пятна). На сегмент кормов на 2020 год до сих пор приходится большая доля рынка каротиноидов, так как применение кормов, содержащих каротиноиды,

повышает жизнеспособность и плодовитость домашнего скота, соответственно, повышается качество получаемых пищевых продуктов.

На доминирующих позициях на рынке каротиноидов остается и производство бидлетов. Каротиноидные бидлеты – сыпучие сферические частицы, получаемые с применением технологий распылительной сушки. Они упаковываются в мешки алюминиевой фольги и хранятся в холодном и сухом месте далеко от света, жары и кислорода. Преимуществами использования бидлетов являются стабильность и увеличенный срок годности [13].

Согласно глобальному прогнозу до 2026 года, на Европу будет приходиться наибольшая доля рынка каротиноидов. Связано это не только с присутствием ведущих европейских производителей, описанных выше, но и с увеличением количества стареющего населения в регионах, что сильно влияет на рост спроса на лютеин, ликопин, β -каротин в медицинских и профилактических целях. Хотя и синтетические аналоги каротиноидов занимают большую долю рынка, население предпочитает выбирать натуральные и экологически чистые продукты, что дает дополнительный толчок на развитие «зеленых» технологий получения каротиноидов [14].

В результате формируется следующая сегментация рынка:

1. В зависимости от типа производимых каротиноидов – астаксантин, β -каротин, лютеин, ликопин, кантаксантин, зеаксантин, другие типы каротиноидов;
2. Основываясь на применении – корма для сельскохозяйственных видов деятельности, производство пищи и напитков, БАДы, косметика и парфюмерия, фармацевтика;
3. По формам производимых каротиноидов – масляные суспензии, порошки, бидлеты, эмульсии;
4. По источникам получения каротиноидов – натуральные и синтетические;

5. Согласно регионам, производящих каротиноиды – Северная Америка, Европа, Азиатско-Тихоокеанский регион, Южная Америка и другие (Ближний Восток и Африка).

1.3 Источники получения каротиноидов. Достоинства и недостатки

Рынок каротиноидов находится в полном развитии, и большинство этих пигментов, используемых в промышленности, синтезируются химически, например, астаксантин, кантаксантин и β -каротин. Природные альтернативы изучаются из-за растущей озабоченности по поводу безопасности пищевых продуктов и негативных аспектов производства красителей, таких как каротиноиды, в результате химического синтеза [15].

Природные источники. Все фрукты и овощи являются хорошими источниками каротиноидов, но поскольку они являются жирорастворимыми веществами, поглощение в значительной степени зависит от их приготовления с маслами или жирами. Формы каротина провитамина А встречаются в темно-зеленых и желто-оранжевых листовых растениях. Более темные цвета связаны с более высоким уровнем провитамина [16]. Среди каротиноидов β -каротин является наиболее распространенным в продуктах, обладающих наибольшей провитаминной активностью. Его можно найти в больших количествах в манго [17], некоторых разновидностях тыквы [18], моркови [19], орехах [20], плодах шиповника [21] и масличной пальме [22], которая является отличным источником благодаря отсутствию какого-либо барьера растительного матрикса и, таким образом, повышает биодоступность данного пигмента [23].

Ликопин - это красный пигмент, встречающийся в природе чаще всего в овощах и тканях водорослей. В настоящее время наиболее популярными источниками ликопина являются томаты и их продукты переработки, такие как соки, супы, соусы и кетчупы [24], в том числе отходы переработки [25, 26] и кожура [27]. Однако его можно обнаружить в еще более высоких концентрациях в продуктах из вишни, гуавы, в арбузах [28] и тайской папайе.

Лютеин и зеаксантин присутствуют в зеленых и темно-зеленых листовых овощах, таких как брокколи, брюссельская капуста, шпинат и петрушка [23]. Некоторые сорта тыквы [18], ацеролы [29] и листовых овощей в целом [30] также являются хорошими источниками лютеина и β -каротина. Некоторые микроводоросли также продуцируют лютеин, такие как *Chlorella vulgaris* (Beij. 1889) [31], *Chlorella sorokiniana* (Shihira & Krauss, 1965) MB-1 [32] и микроводоросль *Scenedesmus obliquus* (Turpin, Kütz., 1859) CNWN [33]. Зеаксантин обнаружен в высоких концентрациях в морских микроводорослях *Chlorella saccharophila* (Krug., Migula) [34].

Астаксантин – красновато-розовый пигмент, встречающийся у водных животных, таких как лобстер, краб и креветка [35], включая отходы их переработки [36, 37]. Кроме того, микроводоросли *Phaffia rhodozyma* (M.W.Mill., Yoney. & Soneda, 1976), *Chlorella vulgaris* и *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844) синтезируют большое количество астаксантина [38, 39].

В России перспективными источниками каротиноидов являются лепестки цветков бархатцев, содержащих в себе большое количество ксантофиллов, среди которых лютеин является преобладающим. Богатым источником лютеина зеаксантина являются ягоды и чашечки физалиса декоративного. Так как стоимость зеаксантина значительно выше, а его биодоступность гораздо сложнее, применение физалиса поможет решить проблему недостатка необходимого для пищевой и сельскохозяйственной промышленности зеаксантина. Из сладкого перца оранжевой окраски можно извлечь зеаксантин, а из перцев красного цвета – капсантин. Томаты являются богатым источником ликопина. Богатыми источниками являются также сорта моркови, тыкв, облепихи.

Перспективной технологией получения каротиноидов в ближайшее время может стать клональное микроразмножение растений, позволяющая производить безвирусные селекционные сорта растений, устойчивые к заболеваниям и вредителям. Она позволит получать большое количество

саженцев с одного растения и размножить его в больших количествах, используя каллусные клетки растения-донора. Пока технология несовершенна из-за применения дорогих компонентов питательной среды [40].

Биопроизводство. Биотехнологическое производство каротиноидов увеличивается из-за таких факторов, как возможность использования недорогих субстратов; обозначение природных веществ; небольшая площадь, необходимая для биопродукции; не зависит от условий окружающей среды, таких как климат, время года или состав почвы; и контроль условий культуры.

Каротиноиды могут быть биосинтезированы фотосинтезирующими организмами, как, например, водоросли и сине-зеленые цианобактерии, а также нефотосинтетическими микроорганизмами, такими как бактерии, грибы и дрожжи [41].

Производство каротиноидов биотехнологическим процессом было широко исследовано, в том числе коммерческое производство каротина грибом *Blakeslea trispora* (Thaxt., 1914) [42], морскими микроводорослями рода *Dunaliella* [96], продукцией астаксантина пресноводной микроводорослью *Haematococcus sp.* и дрожжами *Phaffia rhodozyma* [43].

Микроводоросли рода *Dunaliella* богаты β -каротином и другими крупными каротиноидами. В Индии самая большая индустрия производства этих микроводорослей, где β -каротин предназначен для фармацевтического использования. Другие крупные производители находятся в Австралии, США, Китае, Монголии и Японии; мелкие растения встречаются также в Мексике, Чили, на Кубе, в Иране и на Тайване [44].

Промышленное производство астаксантина представителями рода *Haematococcus* также представляет большой интерес из-за его высокой коммерческой ценности этого пигмента и высокого роста рынка аквакультуры. Основные мировые производители находятся в Соединенных Штатах, Японии и Индии [44].

Производство натуральных пигментов в промышленных масштабах и высокая ценность продуктов делают биотехнологический процесс

каротиноидов областью интенсивного изучения. Продуктивность биопроцесса в данной системе зависит от питательных и физических условий микроорганизма, влияющих не только на рост клеток, как производство пигмента. Поэтому микроорганизмы накапливают различные каротиноиды в ответ на стрессовые условия окружающей среды [45].

Повышение эффективности биосинтеза каротиноидов может увеличить производство. Помимо условий выращивания, биосинтез каротиноидов контролируется уровнем и активностью биосинтетических ферментов, выходящими за пределы общего потока углерода в синтезирующей системе [45].

Можно достичь лучшего производства каротиноидов при низких затратах, используя стимуляторы в культуральной среде и регулируя внешние условия культивирования. Сильва [46] изучал влияние различных химических веществ (кислоты, β -иона, мевалоновой кислоты, дифениламина и других аминокислот) на биосинтез каротиноидов дрожжами рода *Rhodotorula* с целью увеличения и направления каротиногенеза. Уксусная кислота не влияла на рост и выработку пигмента, но β -ион ингибировал рост и каротиногенез. Мевалоновая кислота стимулировала образование каротиноидов на 120% для *Rhodotorula mucilaginosa* (A.Jörg., F.C.Harrison, 1928) и на 35% для *Rhodotorula glutinis* (Fresen., F.C.Harrison, 1928), не влияя на продукцию клеток этими микроорганизмами.

Способность дрожжей к культивированию в средах с высоким содержанием сахара делает эти микроорганизмы промышленно интересными. Дрожжи, такие как *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev, 1995) [47], *R. glutinis* [48], *R. mucilaginosa* [48], *Sporobolomyces sp.* [49] и *Phaffia sp.* [50], изучаются с целью максимизации биопродукции каротиноидов для их промышленного использования.

Микроорганизмы, представляющие технологический интерес и обладающие высоким потенциалом для использования при биопродукции каротиноидов, включают цианобактерии *Anabaena variabilis* (Kütz., 1874),

Aphanizomenon flosaquae (J.Ralfs Ex Bornet & Flah., 1861) и *Nostoc commune* (Vaucher, 1948) при производстве кантаксантина [37]; водоросли *Chlorella pyrenoidosa* (Chick), *Dictyococcus cinnabarinus*, *Dunaliella salina* (Dunal, Teodoresco, 1905), *Dunaliella tertiolecta* (Butcher, 1959), *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844) и *Spongiococcum excetricum* (Deason, 1959) при производстве лютеина, кантаксантина [41], β -каротина [51], соответственно; грибы и дрожжи *Blakeslea trispora* при производстве β -каротина и ликопина [41]; *Dacrymyces deliquescens* (Bull., Duby, 1882) в производстве лютеина [41]; *Phaffia rhodozyma* при производстве астаксантина и β -каротина [50]; *Rhodospiridium toruloides* (I.Banno, 1967), *Rhodotorula glutinis* (Di Menna, 1958) и *Rhodotorula graminis* для получения торулина и β -каротина [41]; *Sporidiobolus salmonicolor* (Fell & Tallman, 1981) при производстве β -каротина [52]; и бактерии *Mycobacterium brevicaille* (Lehmann & Neumann, 1896), *Mycobacterium lacticola* (Lehmann & Neumann, 1896), *Streptomyces chrestomyceticus* (Canevazzi & Scotti, 1959) и *Rhodococcus maris* (Nesterenko et al., 1982) при производстве кантаксантина, астаксантина, кантаксантина и ксантофиллов [41] соответственно.

В настоящее время микробиологический синтез каротиноидов является одной из отраслей биотехнологии, которая наиболее интенсивно развивается. Его преимущество заключается в том, что он может быть осуществлен в контролируемых условиях, в отличие от растений. Микроорганизмы легко культивируются и быстро размножаются, часто на дешевых питательных средах, а содержание пигментов относительно устойчивое и не зависит от географического положения и климатических условий.

1.4. Дрожжи и дрожжеподобные грибы как продуценты каротиноидов

Как было описано выше, среди дрожжей и дрожжеподобных грибов перспективными источниками получения каротиноидов.

Phaffia rhodozyma – штамм дрожжей, первоначально выделенный из древесных экссудатов, полученных в горных районах Аляски и Японии, также недавно были выделены в южных регионах Чили, аргентинской Патагонии и Антарктических районах. В настоящее время часть дрожжей, ранее определенными как *Phaffia rhodozyma*, с помощью генетических исследований были определены как отдельный вид – *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Имеют красный цвет, значительно отличающийся в отношении продукции каротиноидов, среди которых преобладающим является астаксантин, обладающим наибольшей антиоксидантной активностью по сравнению с другими каротиноидами. При росте на мальтозном агаре при 20°C клетки эллипсоидальные, размера – 3,8-7,5 x 5,5-10,5, чаще всего одиночные или в парах, реже – в виде коротких цепочек. Почкуются в одних и тех же местах. Хламидиоспоры сфероидальные, с выраженными гранулами. Образуют пленку и взвешенный осадок. Колонии красного цвета, выпуклые и шероховатые, край неровный. В качестве источника углерода могут использовать глюкозу и сахарозу, органические кислоты, глицерин. Как источник азота использует аммоний, аммиак, пептон, дрожжевой экстракт и мочевины. В состав питательных сред для данных дрожжей также вносят фосфаты калия, сульфат, сульфаты цинка, железа и марганца, хлорид кальция. Оптимальный pH – 4,5-6,0. Могут сбраживать глюкозу сахарозу, мальтозу, раффинозу, не сбраживает галактозу, лактозу и мелибиозу. Ассимилирует сахарозу, мальтозу, целлобиозу, трегалозу, крахмал, ксилозу, раффинозу, арабинозу, янтарную кислоту, не способен ассимилировать галактозу, лактозу, рибозу, рамнозу, лимонную кислоту, эритрит, рибитол, инозитол и нитраты. Обладает уреазной активностью. Не образует крахмалоподобных соединений [53].

Rhodotorula – род несовершенных одноклеточных базидиомицетных пигментированных дрожжей, относящихся к семейству *Cryptococcaceae*. Широко распространены в окружающей среде, обнаруживаются на растительных материалах, в воздухе, пресной и морской воде. У людей

выделяют с ногтей, кожи, кала, мочи. Микозная инфекция может развиваться у пациентов со слабым иммунитетом на фоне трансплантации органов и тканей. Некоторые виды данных дрожжей являются условно патогенными, вызывая заболевание – туберкулезный менингит [54]. В статье Борзовой Ю.В. «Менингиты, обусловленные *Rhodotorula mucilaginosa*: клиническое наблюдение и обзор» описывается клиническая картина развития инвазивного микозного заболевания, вызванного определенным видом дрожжей, у ВИЧ-инфицированной больной. В результате была проведена антимикотическая терапия с применением сильных антимикотиков (флуцитозин и амфотерицин В), так как стал развиваться менингоэнцефалит. Культура возбудителя при этом была получена при посеве спинномозговой жидкости больной. Также можно обнаружить в крови, костном мозге и органах.

На агаризованных питательных средах, чаще всего на среде Сабуро, колонии имеют чаще всего гладкую округлую форму, структура края колонии может отличаться, слизистые, цвет колоний варьируется от желто-оранжевого до красного в зависимости от вида. Клетки дрожжей имеют округлую или овальную форму, размер клеток варьируется от 2,5 до 7 мкм в ширину и от 6 до 12 мкм в длину. Почкование является многосторонним, может наблюдаться присутствие примитивного мицелия. Реже наблюдаются хламидиоспоры. Максимальная температура роста – 30-38°C (в зависимости от вида). Оптимум роста для большинства видов – 27-30°C. Углеводы не сбраживают, обладают уреазной активностью. Крахмал не гидролизует. В зависимости от вида ассимилируют различные источники углерода – углеводы, углеводороды, органические кислоты. Образуют слабую капсулу, при культивировании в стационарном режиме в жидкой питательной среде образуют пленку и взвешенный осадок. Не образует крахмалоподобных соединений [54].

Изученными представителями продуцентов каротиноидов являются такие виды, как *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* (ранее *rubra*), *Rhodotorula aurantiaca* (Saito Lodder, 1934), *Rhodotorula gracillis* (Rennerf.,

1937), *Rhodotorula graminis*, но их может быть гораздо больше. Чаще всего продуцируют β -каротин, торулин и торулародин

Rhodospiridium toruloides – вид маслянистых базидиомицетных дрожжей, выделенных из хвойных пород деревьев. На мальтозном экстракте цвет колоний варьируется от красного до ярко-оранжевого цвета, имеют вязкую структуру, гладкие, блестящие, край ровный. Клетки растут по отдельности или парами. Ассимилируют галактозу, сахарозу, целлобиозу, трегалозу, ксилозу, арабинозу, рибозу, янтарную и лимонную кислоты. Медленно гидролизует крахмал. Углеводы не сбраживает. Оптимум роста – 29-30°C. Оптимум pH – 5,0-5,5. Не образует крахмалоподобных соединений [55].

Sporidiobolus salmonicolor – дрожжевой базидиомицетный гриб, известные своим бесполом типом размножения (вследствие которого также называются *Sporobolomyces salmonicolor*) в виде гаплоидных одноклеточных дрожжей, но иногда может возникать половое состояние, происходящее в результате конъюгации совместимых дрожжевых клеток. Является безопасным грибом, хотя некоторые изоляты были получены из спинномозговой жидкости человека, инфицированной кожи, полипа носоглотки [56]. Являются продуцентами каротиноидных пигментов, образующих колонии лососево-розового цвета. Поверхность колоний гладкая, имеет пастообразную текстуру. Растущие клетки, образующиеся при бесполом размножении, имеют форму эллипсоида размером 2-5,5x8-25 мкм. Образуют баллистоконидии, имеющие форму почек и размеры от 2,5-7x6-18 мкм. Могут присутствовать как псевдогифы, так и настоящие гифы. Оптимум роста – 25-35°C. Углеводы не сбраживает. Обладает уреазной активностью. Ассимилируют глюкозу, сахарозу, мальтозу, целлобиозу, трегалозу, арабинозу, этанол, глицерин, маннит, сукцинат, нитраты и уреазу, не ассимилирует миоинозитол и D-глюкуронат [56]. Не образует крахмалоподобных соединений и крахмал не гидролизует.

1.5 Биосинтез каротиноидов у дрожжей рода *Rhodotorula*

Дрожжи рода *Rhodotorula* чаще всего синтезируют такие каротиноиды, как β -каротин, торулин и торулародин.

Концепции биосинтеза дрожжевых каротиноидов были предложены еще в XX веке на основе изучения семи мутантов дрожжей *Rhodotorula rubra*, цвет которых варьировался от красного до бесцветного, которые продуцировали торулин, γ -каротин, фитофлуин. Исходя из полученных результатов, ученые выдвинули предположение о параллельном пути образования торулина и желтых каротиноидов, общим предшественником которых являлся фитофлуин. Также была проведена работа по выделению каротиноидов из мутантов *Rhodotorula mucilaginosa*, в результате которой из семи исследованных мутантов пять содержали торулародин, один – спириллоксантин, один – ликопин, четыре – торулин, пять – нейроспорин, шесть – γ -каротин, шесть β -каротин, три – фитофлуин, пять – ζ -каротин [57].

Путь превращения нейроспорина долгое время был под вопросом. Были высказаны предположения, что в некоторых системах синтеза каротиноидов он циклизуется либо в α -зеакаротин, либо в β -зеакаротин, когда в остальных он до дегидрогенизации превращается в ликопин, который преобразовывался после циклизации в γ -каротин. Позднее было выяснено, что в одном и том же организме может происходить как циклизация, так и дегидрирование нейроспорина. Именно присутствие β -зеакаротина является доказательством циклизации нейроспорина. Однако, обработка дрожжей триэтиламиноом вызывает выработку и накопление ликопина [57,58].

Механизм биосинтеза каротиноидов состоит из нескольких стадий. Первая стадия – превращение ацетил-КоА в 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (ГМГ-КОА) в присутствии фермента гидроксиметилглутарил-КоА-синтазы. Затем ГМГ-КоА под действием специфической редуктазы преобразовывается в мевалоновую кислоту, которая затем подвергается фосфорилированию в реакции, катализируемой специфическими киназами, а

после – декарбоксилированию с образованием изопентенилдифосфата (ИПФ). Реакция изомеризации ИПФ приводит к образованию диметилаллилпирофосфата (ДМАПФ), к которому в результате реакции присоединения трех молекул ИПФ. Полученный геранилгеранилпирофосфат (ГГПФ), содержащий 20 атомов углерода, конденсируется с такой же молекулой под действием фитоинсинтазы, что приводит к образованию фитоена, первого продукта биосинтеза с 40 атомами углерода [58].

Фитоен превращается в нейроспорин с участием фитоендезатуразы, которая затем может быть трансформирована в ликопин или β -зеакаротин. Образование β -зеакаротина может происходить из-за присутствия ингибиторов, вроде дифениламина, или в случае стресса окружающей среды. γ -каротин образуется в результате циклизации ликопена или дегидрирования β -зеакаротина. При этом, циклизация самого γ -каротин, катализируемая β -ликопинциклазой, приводит к образованию молекулы β -каротина [59].

Торулин образуется из молекулы γ -каротин в присутствии фитоендезатуразы. Торулародин является продуктом дальнейших превращений торулина благодаря реакциям гидроксирования и оксигенации [60]. Полная схема биосинтеза изображена на рисунке 4.

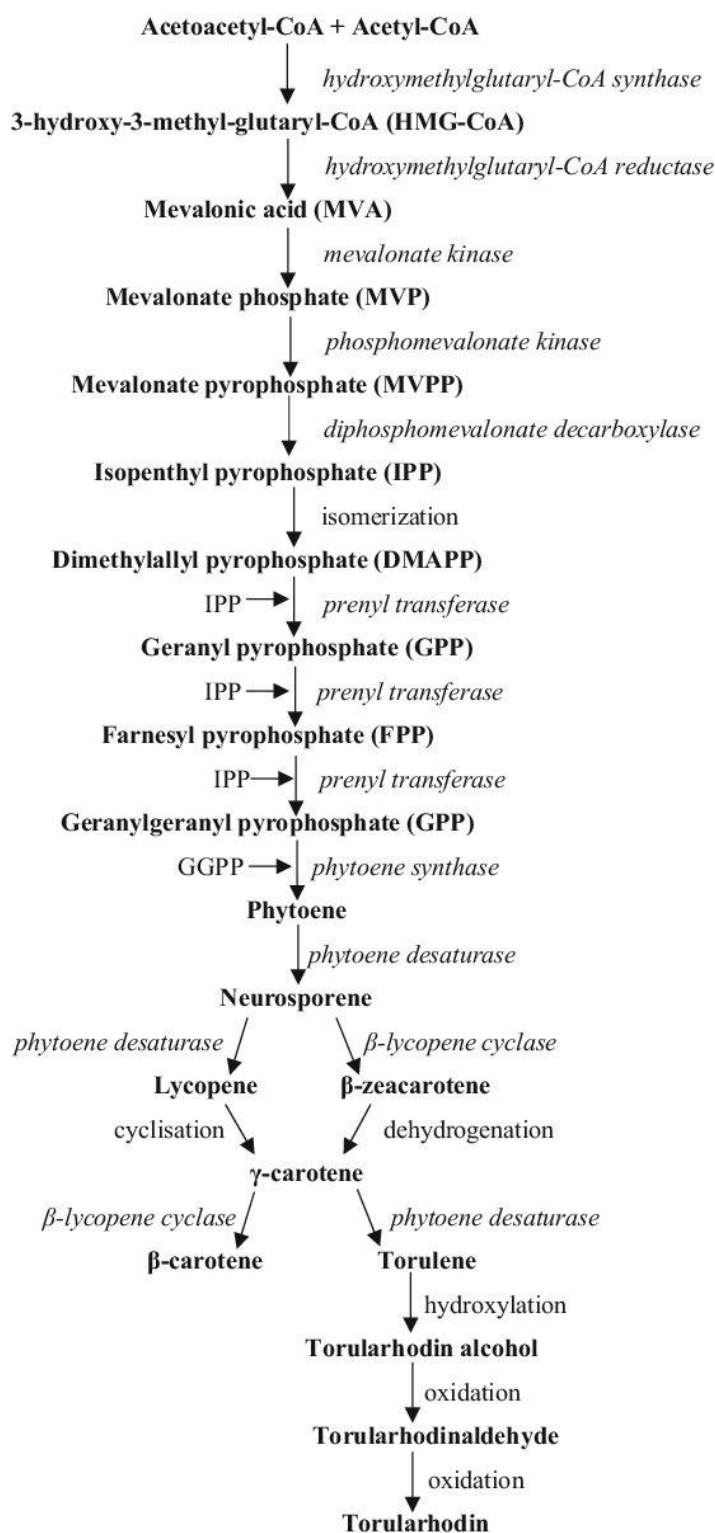


Рис. 4. Общая схема биосинтетического пути каротиноидов у дрожжей рода *Rhodotorula* [59]

Также, на интенсивность каротиногенеза дрожжами влияют такие физико-химические факторы, как аэрация, температура, свет, реакция питательной среды. В работах ученых РХТУ им. Д.И. Менделеева было изучено влияние освещения на биосинтез каротиноидов у культуры дрожжей

Rhodotorula rubra. В ходе исследований применялись светодиодные лампы синего (470 нм), зеленого (525 нм), желтого (595 нм) и белого холодного цвета. Исходя из полученных результатов, ими было выяснено, что наилучший эффект оказывало освещение синим светом, при котором выход β -каротина и торулародина был выше, чем у остальных образцов. Высокого содержания торулина удалось достичь при освещении зеленым светом [1,61].

Теми же учеными был изучен фактор окислительного стресса с применением перекиси водорода в качестве агрессивного агента, повреждающего клеточные структуры. В результате этого клетка реализует свои собственные силы антиоксидантной защиты, повышая синтез каротиноидов в ответ на окислительные повреждения клеток активными формами кислорода. Согласно описанным в статье результатам, добавление перекиси водорода на 11 час культивирования в концентрации 4 г/л, общий выход каротиноидов возрос в 1,5 раза больше, чем при культивировании без перекиси водорода [61]. При применении различных концентраций перекиси водорода к другим видам рода *Rhodotorula* также удалось увеличить выработку каротиноидов [61].

Белорусскими учеными изучено влияние таких добавок в питательную среду, как растительное масло и органических кислот – фумаровой, лимонной, яблочной. Полученные результаты позволили установить, что наибольшее накопление биомассы наблюдалось при добавлении яблочной кислоты. Каротиногенез возрастал в 1,5 раза при добавлении растительного масла [62].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Весной 2020 года со смывов зерна на твердой питательной среде Сабуро были обнаружены пигментообразующие микроорганизмы желто-оранжевого цвета. Путем многократных пересевов методом истощающего штриха получили несколько штаммов пигментообразующих микроорганизмов, названные как FZPM (H) 4.2.1, FZPM (C) 1.2.1, FZPM (F) 7.2.1, FZPM (C) 6.2.1, по внешнему виду и характеру роста которых предположено, что они могут относиться к дрожжам рода *Rhodotorula*. Определение таксономической принадлежности культур дрожжей проводили на основе выявленных индивидуальных свойств и приведенных в литературе

2.1 Изучение культуральных, морфологических, физиолого-биохимических свойств дрожжей

Культуральные свойства определяли, наблюдая развитие популяции на жидких и плотных питательных средах. Поверхностные колонии, образуемые на плотном субстрате, разнообразны, и при их описании учитывают следующие характеристики:

1) Форма колонии м/о (рис. №) [63];

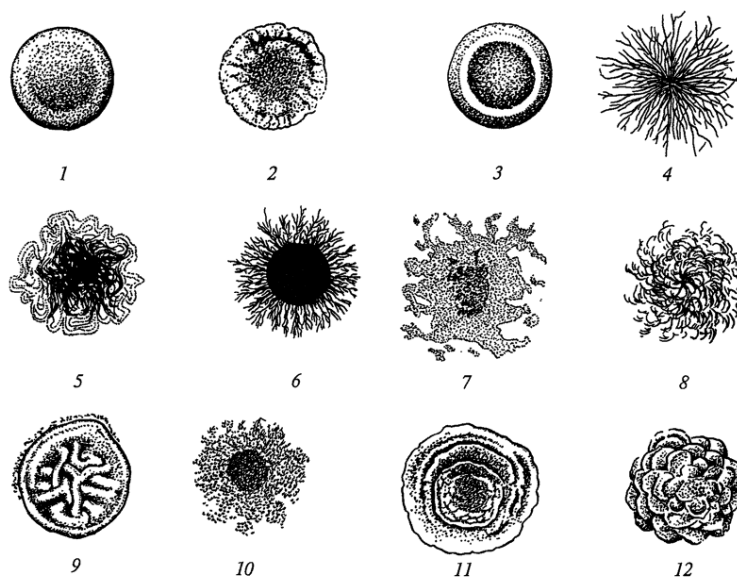


Рис. 5. Форма колонии [63]:

1 – круглая, 2. – круглая с фестончатым краем, 3 – круглая с валиком по краю, 4,5 – ризоидные, 6 – с ризоидным краем, 7 – амёбовидная, 8 – нитевидная, складчатая, 9 – неправильная, 10 – концентрическая, 11 – сложная

2) Профиль колонии;

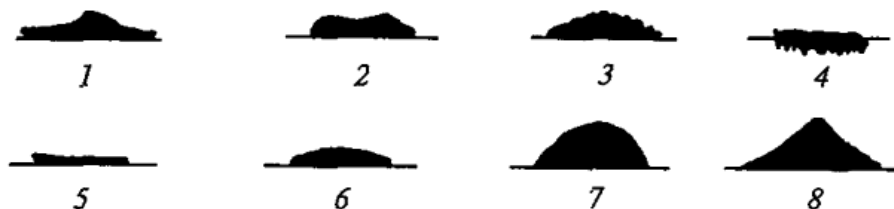


Рис. 6. Профиль колонии [63]:

1 – изогнутый, 2. – кратерообразный, 3 – бугристый, 4 – растущий в субстрат, 5 – плоский, 6 – выпуклый, 7 – каплевидный, 8 – конусовидный

3) Край колонии;

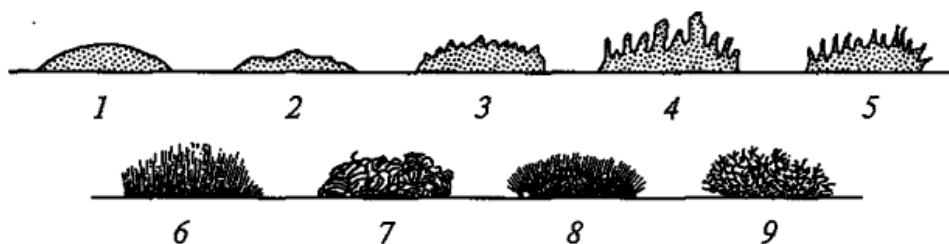


Рис. 7. Край колонии [63]:

1 – гладкий, 2. – волнистый, 3 – зубчатый, 4 – лопастной, 5 – неправильный, 6 – реснитчатый, 7 – нитчатый, 8 – ворсинчатый, 9 - ветвистый

4) Блеск и прозрачность – блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная

5) Цвет – бесцветная или пигментированная;

6) Структура, определяют при малом увеличении микроскопа;

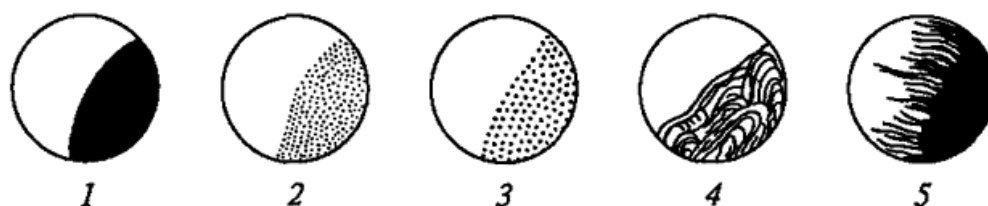


Рис. 8. Структура колонии:

1 – однородная, 2. – мелкозернистая, 3 – крупнозернистая, 4 – струйчатая, 5 – волокнистая

7) Консистенция, определение путем касания поверхности колонии петлей – плотная, мягкая, врастающая в агар, слизистая, тягучая, пленочная, хрупкая;

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. По сравнению с контрольной средой определяют степень помутнения – слабая, умеренная или сильная; особенности пленки – тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая. При образовании осадка описывают – скудный или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Также можно отметить появление запаха во время роста микроорганизмов, пигментацию среды и выделение газа.

Микроскопические исследования позволяют дать морфологическую характеристику клеток, описать их форму и изучить включения. Также определяется степень чистоты выделенной культуры, применяя такие методы окраски препаратов микроорганизма, как:

1. Окраска по Граму. Метод окраски микроорганизмов, позволяющий разделить микроорганизмы согласно биохимическим свойствам их клеточной стенки. Делают фиксированный препарат (приготовление мазка на предметном стекле, высушивание мазка, фиксация мазка над пламенем спиртовки). Затем на 1 минуту на препарат наносят каплю генцианового фиолетового. После истечения времени сливают и заливают раствором Люголя на 1 минуту до почернения мазка. Затем смывают спиртом в течение 30 секунд и высушивают. После высушивания мазок обрабатывают фуксином в течение 1 минуты и смывают стерильной дистиллированной водой. Полученный препарат высушивают и рассматривают с иммерсионной системой [64]. Микроорганизмы, окрашенные в синий цвет, называются грамположительными (Грам(+)) вследствие большого содержания пептидогликана и муреина, входящих в состав клеточной стенки. Грамотрицательные (Грам (-)) окрашиваются в красный цвет, так как из-за низкого содержания пептидогликана и муреина в клеточной стенке

образуемый комплекс генцианового фиолетового с йодом вымывается спиртом, но обработка фуксином позволяет зафиксировать красный цвет клеточной стенки бактерий.

2. Негативный метод Бурри для обнаружения капсул. Каплю туши помещали на обезжиренное предметное стекло и смешивали с каплей суспензии микроорганизма. Предметным стеклом распределяют мазок тонким слоем и высушивают на воздухе, затем рассматривают с иммерсионной системой. На дымчато-темном фоне ясно видны неокрашенные капсулы и клетки [64].

3. Окраска волютина методом Омелянского. Волютин – полифосфат, запасное вещество, производное нуклеиновой кислоты, содержащее фосфор и азот. Характеризуется метахромазией, способностью приобретать иной цвет, чем цвет красителя. Кроме того, волютин плохо растворим в растворах кислот.

Предметное стекло обезжиривают, делают мазок, сушат на воздухе, фиксируют над пламенем и окрашивают карболовым фуксином Циля. Спустя 1 минуту промывают препарат водой, обесцвечивают 30 секунд 1% раствором H_2SO_4 , промывают, окрашивают 30 секунд метиленовым синим, промывают, промокают мазок фильтровальной бумагой, смотрят с иммерсионной системой. Получаются окрашенные в красный цвет гранулы волютина на фоне синей цитоплазмы [63].

Также окраску фиксированных препаратов можно проводить путем их обработки в течение 30 секунд метиленовым синим Леффера или 1% раствором толуидинового синего. Полученный препарат промывают водой, промокают фильтровальной бумагой и микроскопируют. В первом случае гранулы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а во втором – красные на фоне голубой цитоплазмы [64].

4. Окраска производных крахмала (гликоген, гранулеза). Наносят каплю суспензии и каплю раствора йода в йодиде калия (7 г йода и 20 г йодида калия на 100 мл дистиллированной воды). Сверху помещают покровное стекло. Микроскопируют с иммерсионной системой [64].

В клетках дрожжей гликоген запасается в материнских клетках, окраска желтая или коричнево-желтая [65].

5. Окраска жира. На предметное стекло наносят каплю 40% раствора формалина. Петлей вносят культуру микроорганизма и оставляют на 5 минут, чтобы формалин убил клетки и разрыхлил их. Затем добавляют метиленовый синий на 10 минут, спустя 10 минут вносят каплю судана III. Общую каплю накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости и микроскопируют с иммерсией. Цитоплазма клетки окрашивается в синий цвет, включения жира – в розово-оранжевый [64].

Физиолого-биохимические свойства популяции проявляются в способности роста культур на разных специфических питательных средах, вызывая определенные превращения входящих в состав сред веществ (прил.№3).

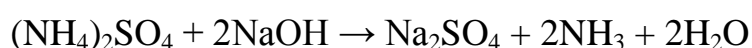
Тест на наличие фермента каталазы проводили путем добавления 1 мл 3%-ной перекиси водорода к колониям на чашке или зонам обильного роста. Положительная реакция характеризуется образованием пузырьков [63].

Тест на цитохромоксидазу выполняли с использованием ОКСИ-теста Лахема для определения цитохромоксидазы бактерий. Входящий в состав теста N,N диметил-1,4-фенилендиамин вступает в цветную реакцию с α -нафтолом в присутствии цитохромоксидазы, образуя индофеноловый синий. Анализ проводили путем снятия с плотной питательной среды изолированной колонии бактериологической петлей и втирали ее в диагностическую зону полоски. Цветную реакцию учитывают в течение 1 минуты.

Под действием липаз происходит гидролитическое разложение липидов. Наличие липазы у дрожжей определяли, высевая на среду исследуемые штаммы, содержащую определенный липид, но так как жиры не смешиваются с водой, используются твины – эфиры жирных кислот и сорбита. Они хорошо растворимы в воде и имеют нейтральную реакцию. Состав среды (г/л): твин-80 – 10,0; пептон – 10,0; NaCl – 5,0; CaCl₂·H₂O – 0,1, агар – 20,0; pH – 7,4. Твин-80 добавляли в среду стерилизации при 1 атм. Водный раствор твина

соответствующей концентрации стерилизовали отдельно при 0,5 атм и добавляли к стерильной основной среде, перемешивали и разливали в стерильные чашки Петри. На поверхность застывшей питательной среды штрихом засеивали исследуемыми штаммами и инкубировали при 27°C в течение 3 суток. Наличие липазы характеризуется образованием вокруг штриха (или колонии) непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот [64].

Наличие уреазы определяли, используя среду следующего состава (г/л): карбамид – 5,0; цитрат натрия – 5,0, K₂HPO₄ – 0,003. Для стимуляции роста дрожжей вносили сахарозу – 1,0. Карбамид добавляли после приготовления и стерилизации основной среды. Пробирки с жидкой питательной средой засеивали суспензией микроорганизма 0,5 оптической плотности, под пробкой размещали индикаторную бумажку, предварительно смоченную в автоклавированной воде. Положительная реакция характеризовалась щелочной реакцией индикаторной бумажки (синий цвет) вследствие выделения газообразного аммиака, что подтверждает наличие фермента уреазы [54]. В качестве контроля на обнаружение аммиака индикаторной бумажной полоской выступала реакция сернокислого аммония с с 3% раствором гидроксидом натрия:



Выявление амилолитической активности проводили с использованием питательной среды следующего состава (г/л): пептон – 10,0; агар – 2,0; KН₂PO₄, растворимый крахмал – 3,0; рН – 7,0. Крахмал вносили после автоклавирования. Разливали по чашкам Петри, после застывания на каждую чашку высевали «свежую» культуру дрожжей. Затем чашки с посевами инкубировали при 27°C в течение 3 суток. Амилолитическая активность определяли добавлением раствора Люголя на каждую чашку Петри с культурами и, если участок питательной среды с культурой дрожжей остается бесцветным на синем фоне вследствие взаимодействия йода с крахмалом, то тест считался положительным.

Активность фермента лецитиназы определяли при помощи питательной среды Чистовича с пептоном (г/л): пептон – 3,0; суспензия желтка – 10 мл, агар – 2,5. Суспензию желтка получили суспендированием одного отделенного от белка желтка в стерильных условиях в 200 мл стерильного 0,8% раствора NaCl и добавляли после автоклавирования. После тщательного перемешивания, полученную питательную среду разливали по чашкам Петри. После застывания засеивали дрожжи штрихом, инкубировали в течение 3 суток при 27°C. Учет результатов проводили по появлению или отсутствию непрозрачной белой зоны вокруг штриха.

Отношение к кислороду определяли путем посева дрожжей уколом в предварительно подготовленные пробирки со столбиками агаризованного 3% пептона и инкубации в термостате при 27°C. По истечению 3 суток определяли характер роста микроорганизма: облигатный анаэроб – растет только внутри питательной среды с уколом; облигатный аэроб – растет только на поверхности столбика среды; факультативный анаэроб – растет по всей поверхности укола и на поверхности столбика питательной среды [64].

Способность к ассимиляции углеводов определяли следующим образом. Готовили питательную среду Ридера без углевода (г/л): K_2HPO_4 – 6,3; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,7; $MgSO_4 \cdot H_2O$ – 7,4; дрожжевой экстракт – 5,0; агар – 2,5%. Стерильную питательную среду в стерильных условиях разливали по чашкам Петри. Параллельно подготавливались бумажные диски из фильтровальной бумаги «Белая лента», которые стерилизовались в сухожаровом шкафу при 170°C в течение 1,5 часов. Затем готовили пробирки с 1% исследуемых растворов углеводов, по одной пробирке на каждый углевод и добавляли по 0,001 г бромтимолового синего.

Застывшую питательную среду засеивали суспензией, оптическая плотность которой была равна 0,5 ОП. Значение оптической плотности определяли с помощью турбидиметра Microscan Turbidity Meter производства Siemens. Суспензию каждой культуры дрожжей вносили по 100 мкл на агаризованные среды и делали посев газоном шпателем Дригальского,

маркируя чашки номером культуры. Затем на чашки Петри с посеянными культурами распределяли стерильные бумажные диски, пропитанные 30 мкл раствора углевода и бромтимолового синего. На одну чашку Петри распределяли по 6 дисков с исследуемым углеводом, затем чашки инкубировали при 27 С трое суток. После инкубации на чашках учитывали количество бумажных дисков, вокруг которых наблюдался рост дрожжей. Полученные данные статистически обрабатывали методом обработки качественной изменчивости. В ходе анализа определяли ассимиляцию углеводов как стимуляторов роста биомассы в зоне диффузии раствора в среду. Для этого, распределяли данные следующим образом:

Из 6 бумажных дисков, пропитанных раствором сахарозы ($N_1=6$) стимулирующий эффект проявился в 5 случаях (n_1), и т.д.

После распределения результатов, вычисляли долю наличия признака (p):

$$p = \frac{n}{N}$$

А также, долю отсутствия признака (q):

$$q = 1 - p$$

Для определения существенных различий между долями наличия признаков вычисляли критерий достоверности Стьюдента:

$$t = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{\frac{p_1 \cdot q_1}{N_1} + \frac{p_2 \cdot q_2}{N_2}}}$$

Расчетный критерий достоверности Стьюдента сравнивали с табличным по числу степеней свободы ν_p :

$$\nu_p = (N_1 - 1) + (N_2 - 1)$$

О существенности различия судили по равенству расчетного и теоретического значений критерий Стьюдента: если критерии фактические равны теоретическим или больше их, то различие достоверно [66].

Способность дрожжей сбрасывать углеводы определяли с применением окислительно-ферментативного теста. Для этого на питательную среду Хью-

Лейфсона (состав (г/л): пептон – 2,0; тестируемый углевод – 10,0; агар -15,0; бромтимоловый синий – 0,03; NaCl – 5,0; KH_2PO_4 – 0,3) засеивали уколом исследуемые штаммы в пробирки с каждым углеводом. В одну из них вносили 2 мл смеси парафина и вазелинового масла в соотношении 1:1 для создания анаэробных условий под слоем смеси, другую оставляли непокрытой для контакта посева с воздухом. Через трое суток учитывали результаты теста по изменению цвета в самом столбике питательной среды с уколом или только на поверхности контактирующей части укола с воздухом [67].

2.2 Культивирование дрожжей

Для изучения скорости накопления биомассы дрожжей в жидких питательных средах при благоприятных условиях и определения способности культур к каротиногенезу, культивировали дрожжей на благоприятных им питательных средах, содержащих все необходимые питательные вещества, витамины и микроэлементы, состав которых можно регулировать. Также подобрана оптимальная температура инкубации и скорости перемешивания биомассы, способствующей равномерному распределению клеток дрожжей во всем объеме культуральной жидкости и хорошей аэрации.

Культивирование дрожжей осуществляли периодическим способом с применением жидкой питательной среды Ридера состава (г/л): KH_2PO_4 – 6,3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,7; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 7,4; сахароза – 55,0; дрожжевой экстракт – 5,0. Питательные среды готовили объемом 150 мл для культивирования в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, стерилизовали, затем предварительно приготовленной суспензией дрожжей, равной 0,5 ОП, в объеме 1 мл засеивали колбы. Инкубировали при температуре 27°C на платформенном орбитальном шейкере Heidolph Unimax 1010 со скоростью перемешивания 180 об/мин.

Для изучения влияния предшественников на продуктивность и биосинтез каротиноидов было решено ввести в состав питательной среды

лимонную кислоту в количестве 1 г/л. Общее количество колб с питательной средой составило 10 штук, обусловленное тем, что:

4 колбы, из которых 2 со стандартной питательной средой и 2 с добавленной лимонной кислотой, культивировались в течение 2 суток с целью изучения накопления биомассы и определения содержания каротиноидов;

4 колбы, из которых 2 со стандартной питательной средой и 2 с добавленной лимонной кислотой, культивировались в течение 4 суток с той же целью;

1 колба являлась контрольной питательной средой без дрожжей;

1 колба – питательная среда без дрожжей с добавлением лимонной кислоты.

В течение каждых суток культивирования с засеянных колб в стерильных условиях отбирались аликвоты суспензии объемом 1 мл в трехкратной повторности, при этом, при отборе колбу перемешивали для равномерного распределения суспензии клеток. С использованием спектрофотометра Thermo Scientific Genesys 20 vis при длине волны $\lambda = 600$ нм измеряли оптическую плотность суспензии, по значениям которой можно определить динамику накопления биомассы в объеме питательной среды в единицу времени.

Удельную скорость роста культур рассчитывали по формуле []:

$$\mu = \frac{2,303 (\ln X_1 - \ln X_0)}{T_1 - T_0}$$

где, X_0 и X_1 – значения ОП суспензии клеток, соответствующие времени роста T_0 и T_1 в фазе медленного роста микроорганизмов.

Для расчёта достоверности различия динамики роста культур пользовались статистической обработкой усреднённых оптических единиц разностным методом. В данном методе, находят разницу между исследуемыми вариантами (d). После, рассчитывают среднюю арифметическую по разнице вариантов (\bar{d}). Из полученных данных высчитывают отношение d- \bar{d} , сумма которых должна равняться нулю ($\Sigma=0$).

Сумма квадратов разницы используется в расчёте среднеквадратического отклонения:

$$Sd = \sqrt{\frac{\sum (d - \bar{d})^2}{n(n-1)}}$$

где $\sum (d - \bar{d})^2$ – сумма квадратов разницы, n – выборка.

Полученное среднеквадратическое отклонение используется в расчёте критерия достоверности Стьюдента по формуле:

$$t = \frac{(\bar{X}_2 - \bar{X}_1)}{Sd}$$

где $(\bar{X}_2 - \bar{X}_1)$ – разность средних арифметических сравниваемых групп, Sd – среднеквадратическое отклонение.

Различие считается достоверным, если расчётный критерий достоверности Стьюдента превышает табличные значения [66].

Доверительный интервал (определяет возможную погрешность средней арифметической) рассчитывали по формуле:

$$\Delta = t_{st} \cdot m$$

где m – ошибка средней арифметической, t_{st} – стандартное значение критерия Стьюдента при определенной степени свободы $(n-1)$ и пороге вероятности безошибочных прогнозов. Ошибка средней арифметической рассчитывается по формуле:

$$m = \frac{Sd}{\sqrt{n}}$$

где Sd – среднеквадратическое отклонение, рассчитанное разностным методом, а n – объем выборки.

2.3 Определение содержания каротиноидов в биомассе дрожжей

После культивирования в течение 2 и 4 суток полученная биомасса дрожжей отделялась от культуральной жидкости центрифугированием. Для этого культуральную жидкость с биомассой культуры дрожжей разливали по

10 мл в пробирки объемом 15 мл и центрифугировали со скоростью 3000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок собирали в отдельную пробирку, которую также центрифугировали. Затем надосадочную жидкость удаляли и осадок разбавляли дистиллированной водой. Процедуру повторяли 3 раза с целью промывания клеток дрожжей от культуральной жидкости. В итоге получали общее количество биомассы дрожжей с содержимого одной колбы объемом 150 мл.

Затем полученный общий осадок переносили в предварительно высушенную до постоянной массы при 170°C фарфоровую чашку и высушивали при 80°C в течение 3 часов. После высушивания чашку с биомассой взвешивали на аналитических весах. Так как биомасса во время сушки образует пленку, отделить её от чаши для дальнейшего анализа было затруднительно. Для этого сухую биомассу аккуратно отскребали с фарфоровой чашки на часовое стекло и повторно взвешивали.

Для экстракции каротиноидов механическим способом сухую биомассу переносили в фарфоровую ступку. В качестве экстрагента был выбран холодный ацетон, сам процесс экстракции проводили в прохладном, темном участке лаборатории. В ступку к сухой биомассе приливали несколько миллилитров холодного ацетона. Для лучшего растирания также добавляли небольшое количество кварцевого песка. Полученную смесь перетирали пестиком в течение 10 минут и отстаивали в бытовом холодильнике в течение 5 минут. После отстаивания полученный экстракт отбирали автоматическим дозатором по 1 мл и переносили в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл. Экстракцию проводили до полного обесцвечивания экстракта, при этом, удавалось перенести экстракт в 20-25 пробирок.

Пробирки с полученным экстрактом центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 минут. Затем из пробирок надосадочная жидкость отбиралась в мерную колбу объемом 25 мл и до метки доводилась холодным ацетоном. После перемешивания из полученного экстракта отбиралось 3 аликвоты по 2 мл в одноразовые пластиковые кюветы UVette Eppendorf

объемом с длиной светового пути 10 мм на спектрофотометрический анализ при помощи спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan GO в диапазоне длин волн от 350 нм до 700 нм.

Концентрацию каротиноидов в пересчете на β -каротин определяли по формуле:

$$C_1 = \frac{A}{E \times l} \times V \times R \times \frac{M_r}{m} \times 1000000 \text{г}$$

где: C_1 – концентрация каротиноидов в пересчете на β -каротин, мкг/г; A – оптическая плотность максимума поглощения света β -каротина; E – коэффициент экстинкции β -каротина, равный 139500; V – объем экстракта; R – число разведений; M_r – молярная масса β -каротина, m – масса сухой биомассы; 1000000 – пересчет на микрограммы.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе изучения индивидуальных свойств обнаруженных штаммов FZPM (H) 4.2.1, FZPM (C) 1.2.1, FZPM (F) 7.2.1, FZPM (C) 6.2.1, было выявлено, что колонии всех штаммов имеют круглую форму, выпуклый профиль, край колоний гладкий, блестящие, пигментированные, однородной структуры. Клетки овальной формы, одиночные, в парах или коротких цепочках (Рис. 9-12). Почкующиеся. Являются грамположительными (Рис. 13-16). Имеют слабо выраженные капсулы (рис. 17-20), волютин (рис. 21-24), гликоген (рис. 25-28) и жир (рис. 29-32). Полная характеристика индивидуальных свойств штаммов описана в приложении №1.

Исследуемым штаммам свойственна каталазная активность (рис. 33-36). Цитохромоксидазы не образуют (рис. 37,38). Образуют липазу (рис. 39) и лецитиназу (рис. 40). Обладают слабо выраженной уреазной активностью (рис. 41), но амилалитической активности не наблюдается (рис. 42). При культивировании в жидкой 3% пептонной среде без перемешивания образуют пленки и взвешенный осадок (рис. 43-46).

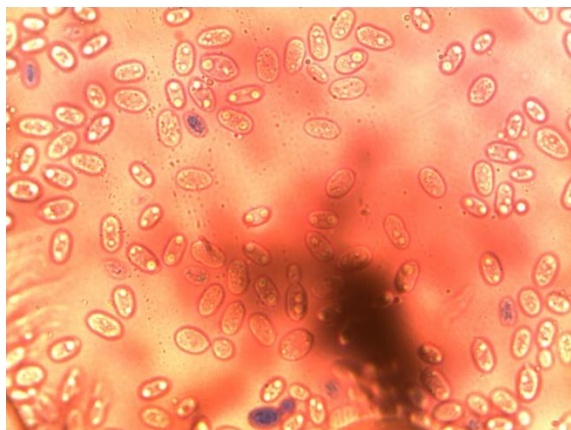


Рис. 9. Временный препарат штамма FZPM (C) 1.2.1 под метиленовым синим

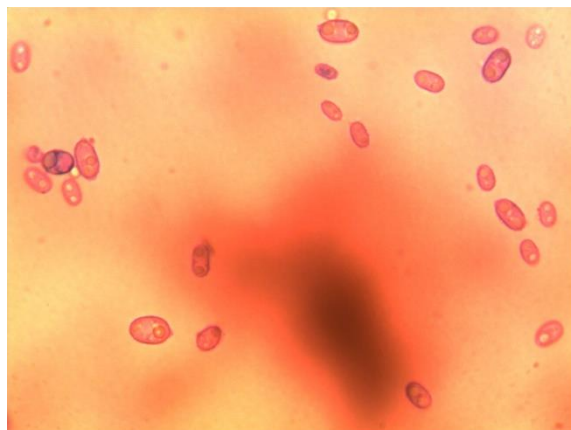


Рис. 10. Временный препарат штамма FZPM (C) 6.2.1 под метиленовым синим

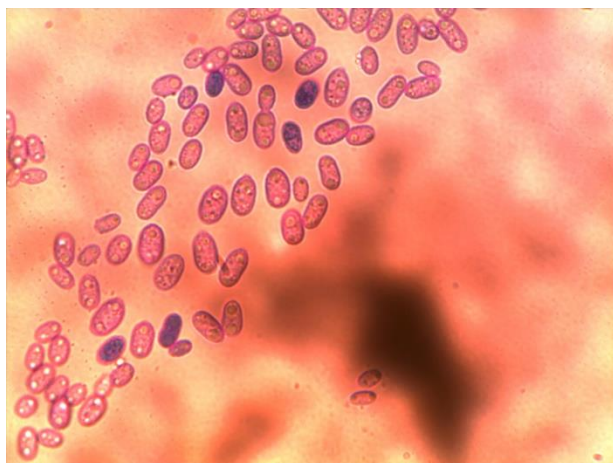


Рис. 11. Временный препарат штамма FZPM (F) 7.2.1 под метиленовым синим

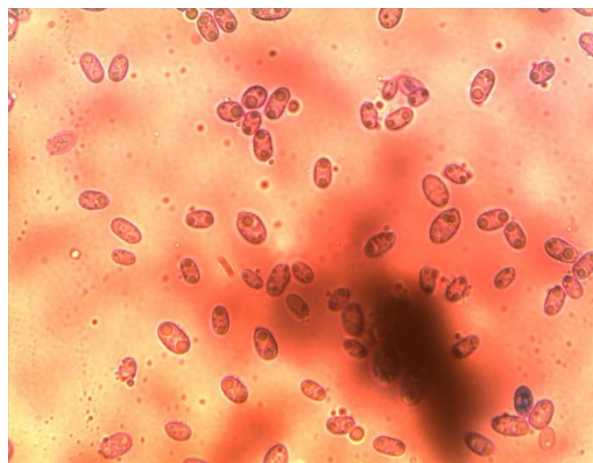


Рис. 12. Временный препарат штамма FZPM (H) 4.2.1 под метиленовым синим

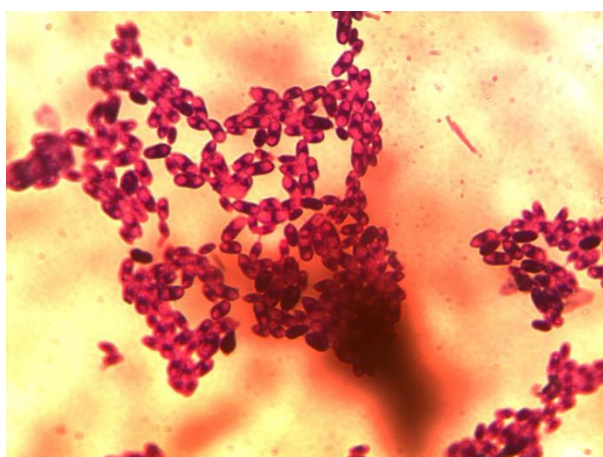


Рис. 13. Окраска по Граму препарата штамма FZPM (C) 1.2.1

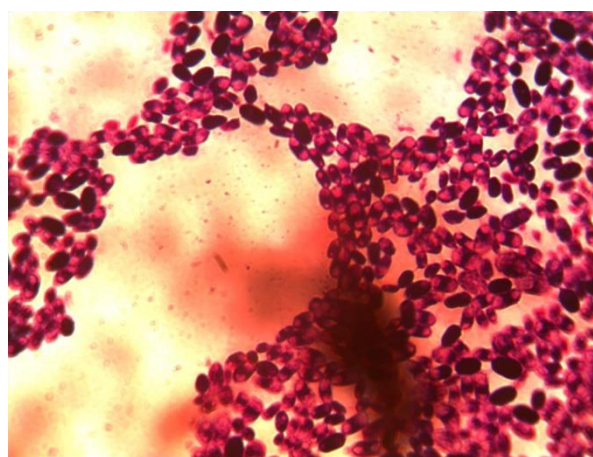


Рис. 14. Окраска по Граму препарата штамма FZPM (C) 6.2.1

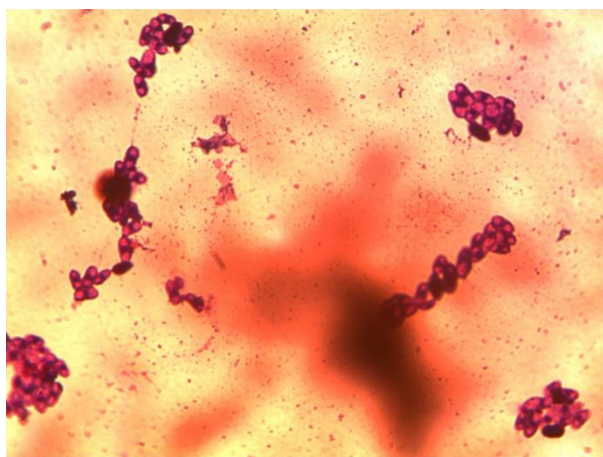


Рис. 15. Окраска по Граму препарата штамма FZPM (F) 7.2.1

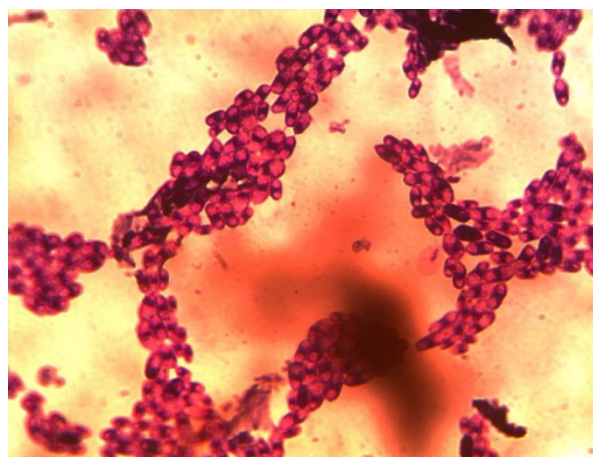


Рис. 16. Окраска по Граму препарата штамма FZPM (H) 4.2.1

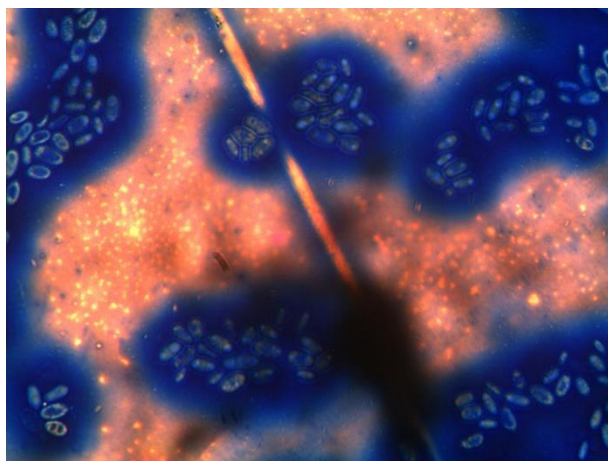


Рис. 17. Окраска капсул препарата штамма FZPM (C) 1.2.1

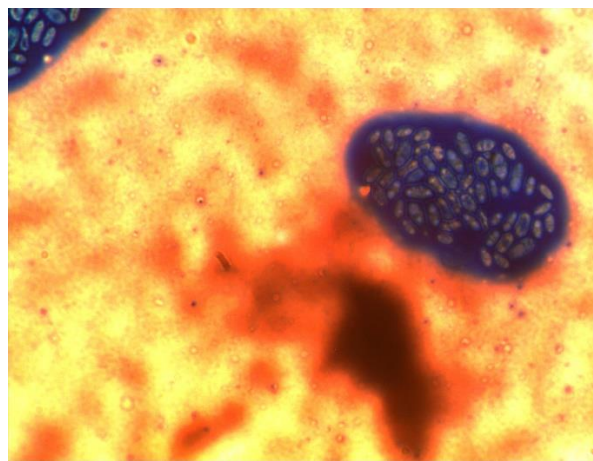


Рис. 18. Окраска капсул препарата штамма FZPM (C) 6.2.1

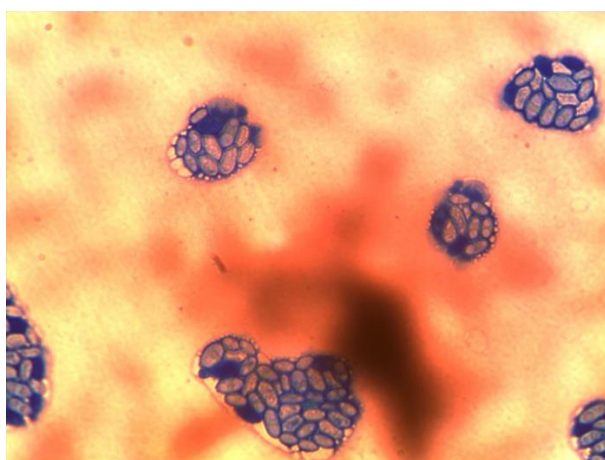


Рис. 19. Окраска капсул препарата штамма FZPM (F) 7.2.1

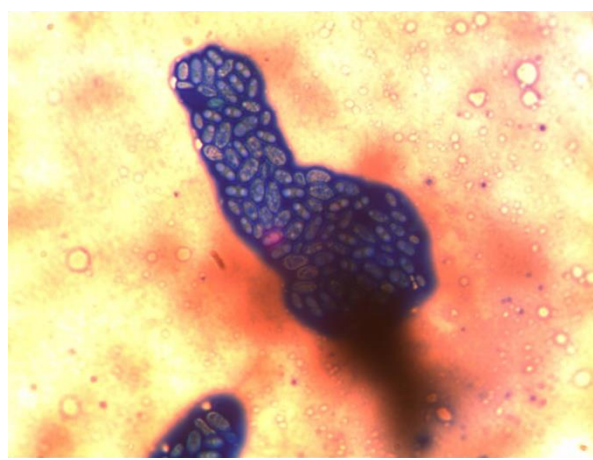


Рис. 20. Окраска капсул препарата штамма FZPM (H) 4.2.1

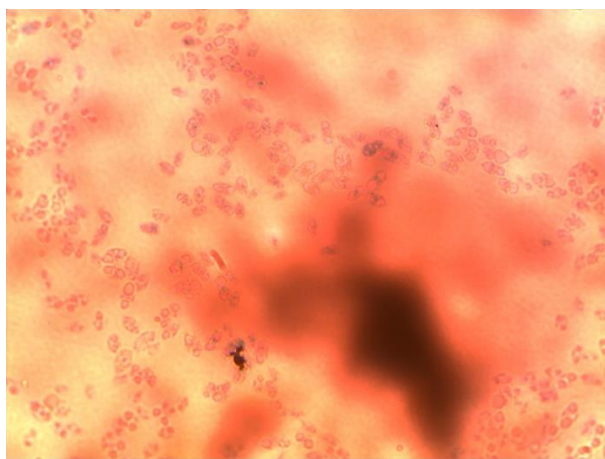


Рис. 21. Окраска волютина препарата штамма FZPM (C) 1.2.1

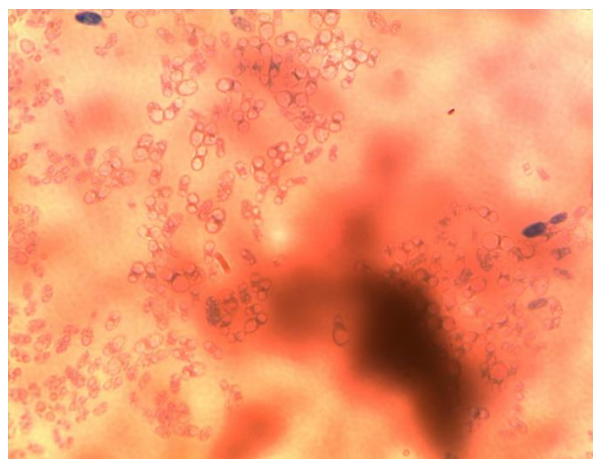


Рис. 22. Окраска волютина препарата штамма FZPM (C) 6.2.1

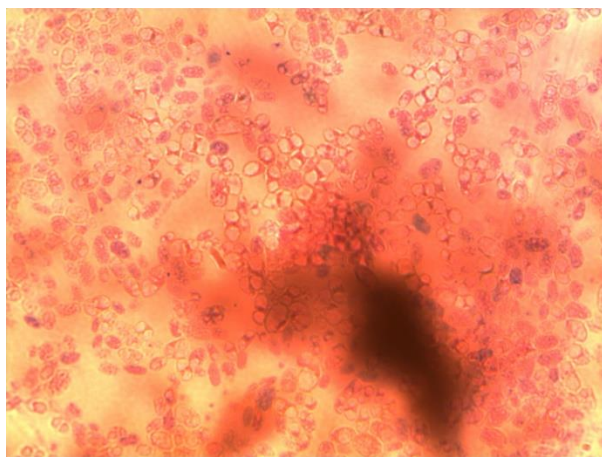


Рис. 23. Окраска волютина препарата штамма FZPM (F) 7.2.1

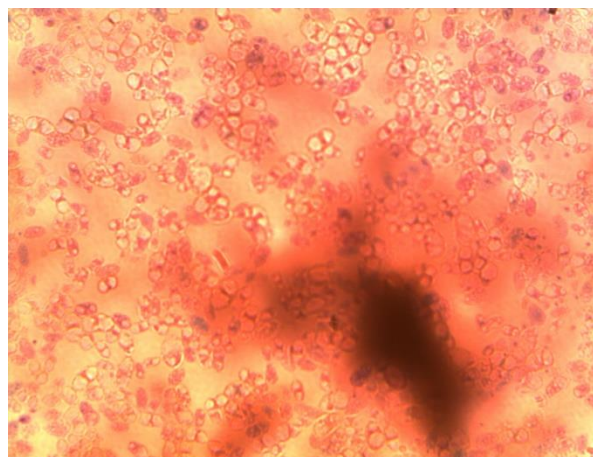


Рис. 24. Окраска волютина препарата штамма FZPM (H) 4.2.1

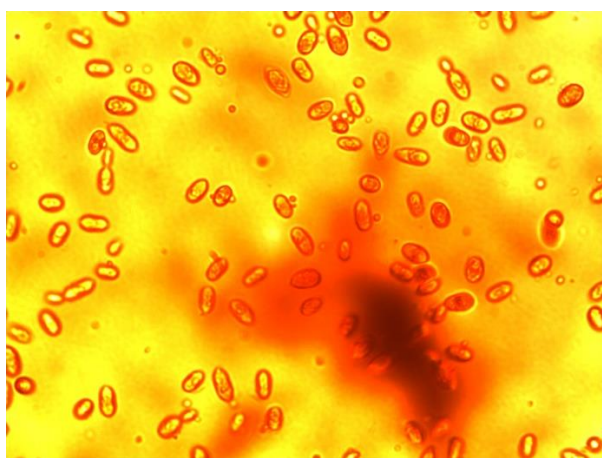


Рис. 25. Окраска гликогена препарата штамма FZPM (C) 1.2.1

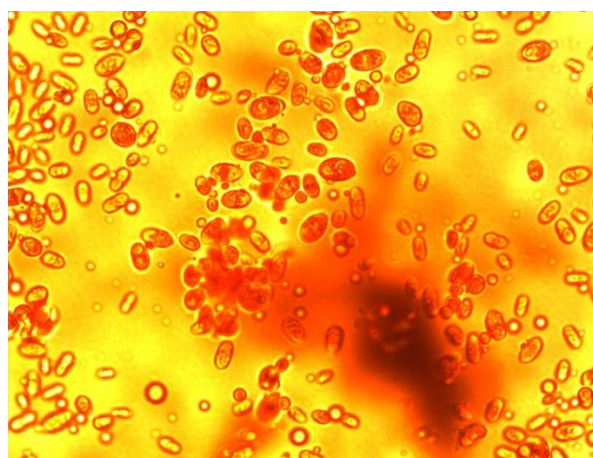


Рис. 26. Окраска гликогена препарата штамма FZPM (C) 6.2.1

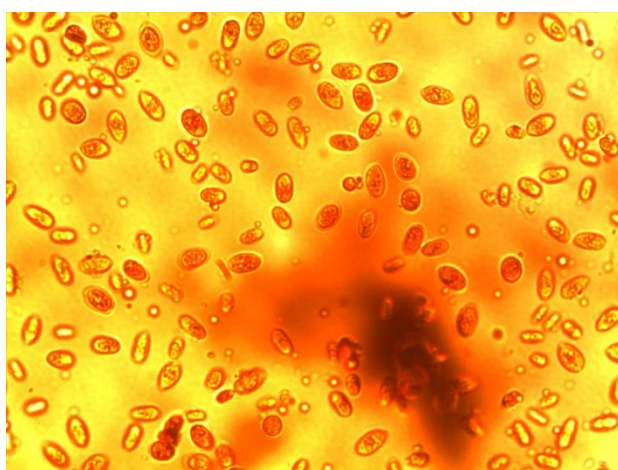


Рис. 27. Окраска гликогена препарата штамма FZPM (F) 7.2.1

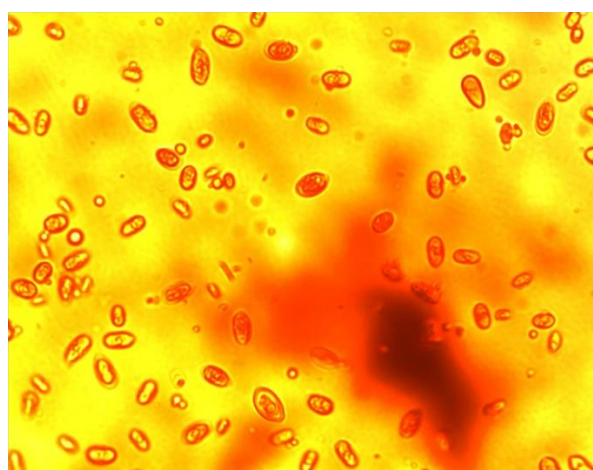


Рис. 28. Окраска гликогена препарата штамма FZPM (H) 4.2.1

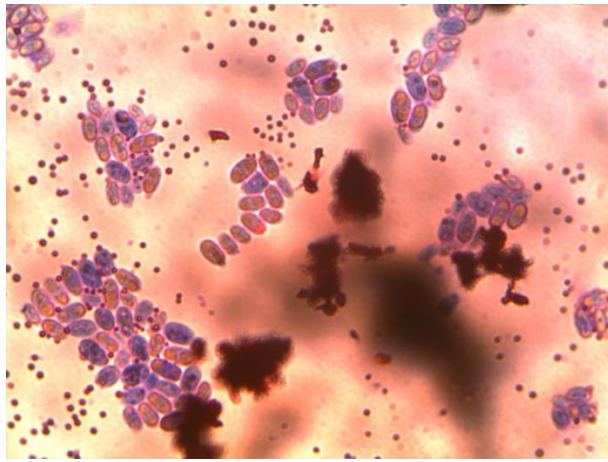


Рис. 29. Окраска жира препарата штамма FZPM (C) 1.2.1

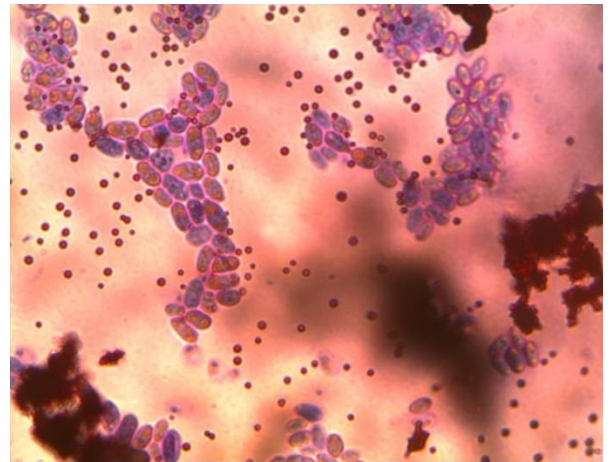


Рис. 30. Окраска жира препарата штамма FZPM (C) 6.2.1

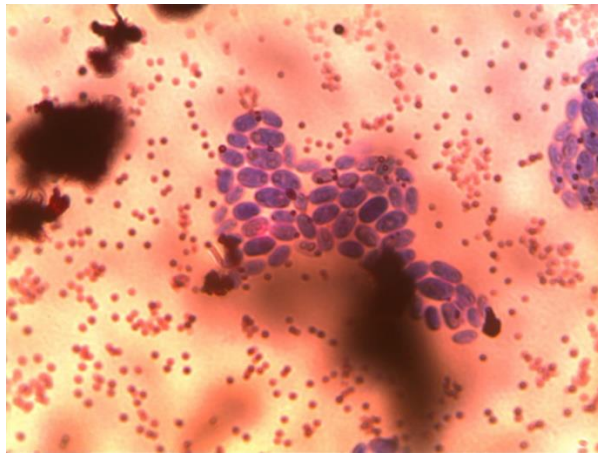


Рис. 31. Окраска жира препарата штамма FZPM (F) 7.2.1

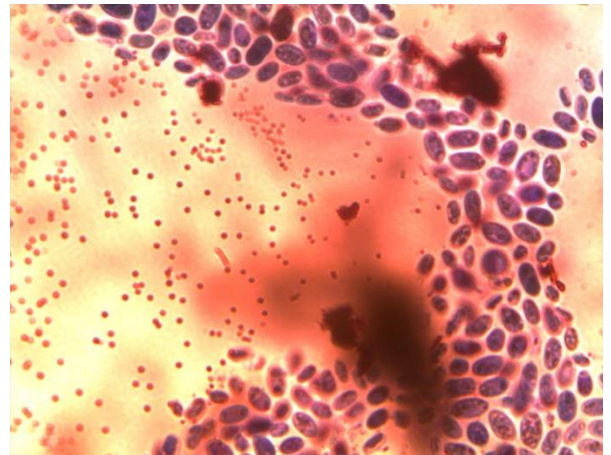


Рис. 32. Окраска жира препарата штамма FZPM (H) 4.2.1



Рис. 33. Проверка каталазной активности штамма FZPM (C) 1.2.1



Рис. 34. Проверка каталазной активности штамма FZPM (C) 6.2.1



Рис. 35. Проверка каталазной активности штамма FZPM (F) 7.2.1

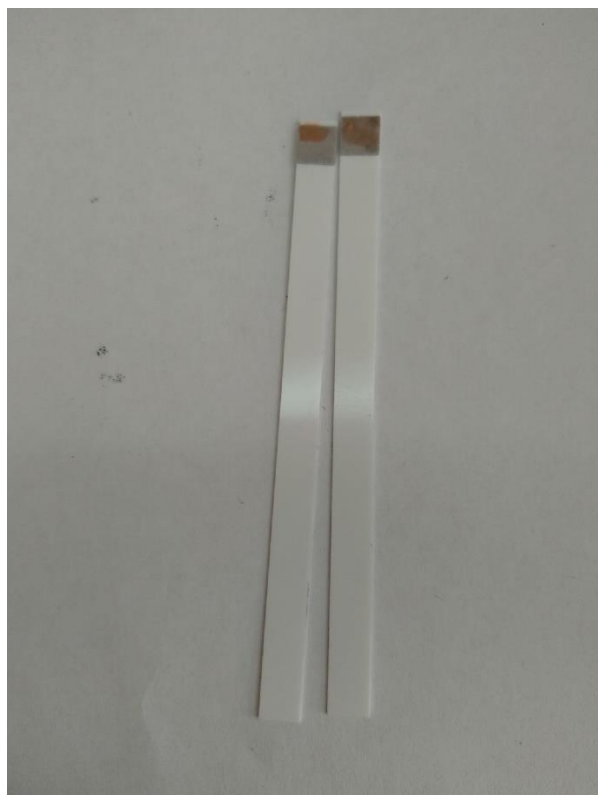


Рис. 36. Проверка каталазной активности штамма FZPM (H) 4.2.1

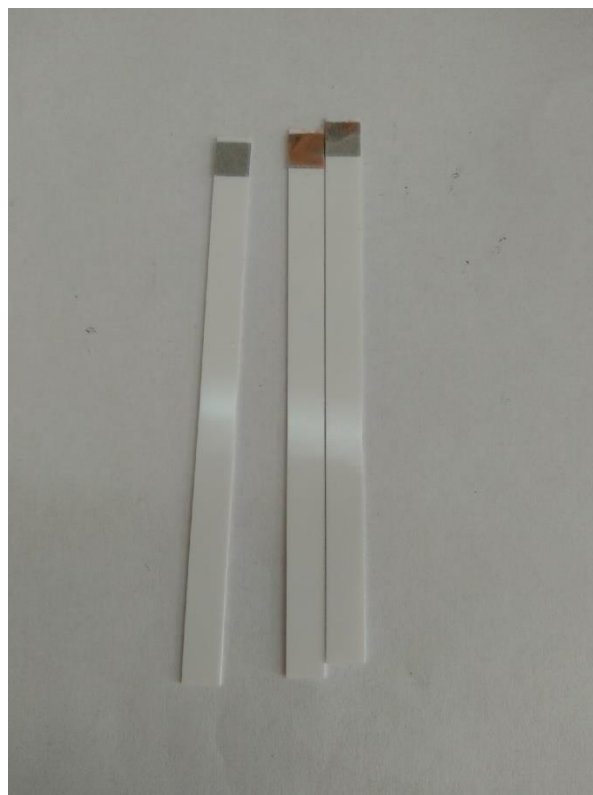


Рис. 37. Проверка цитохромоксидазной активности

Рис. 38. Проверка цитохромоксидазной активности штаммов FZPM (F) 7.2.1 и FZPM

штаммов FZPM (C) 1.2.1 и FZPM (C) 6.2.1

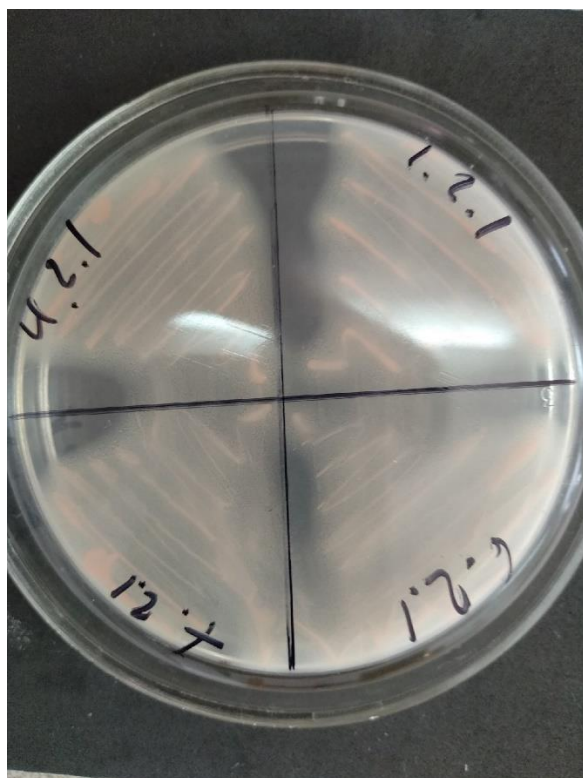


Рис. 39. Проверка липазной активности всех исследуемых штаммов

(H) 4.2.1 (крайняя левая полоска – без культуры)

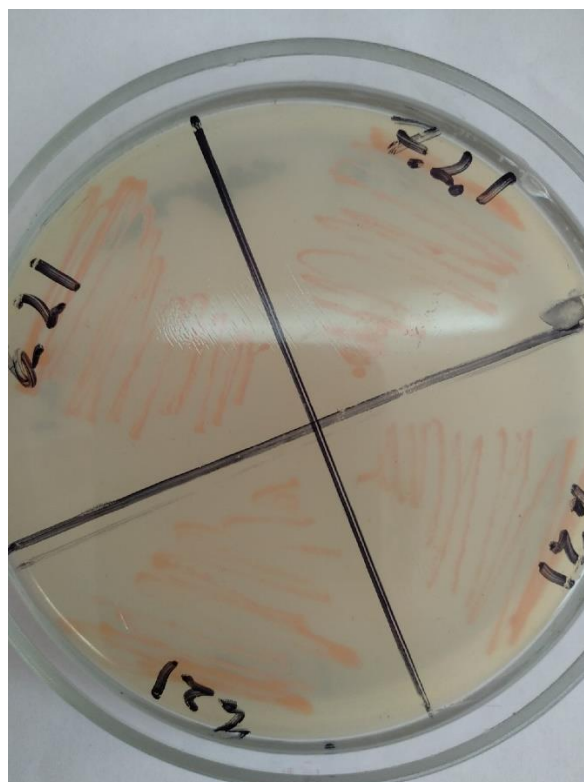


Рис. 40. Проверка лецитиназной активности всех исследуемых штаммов

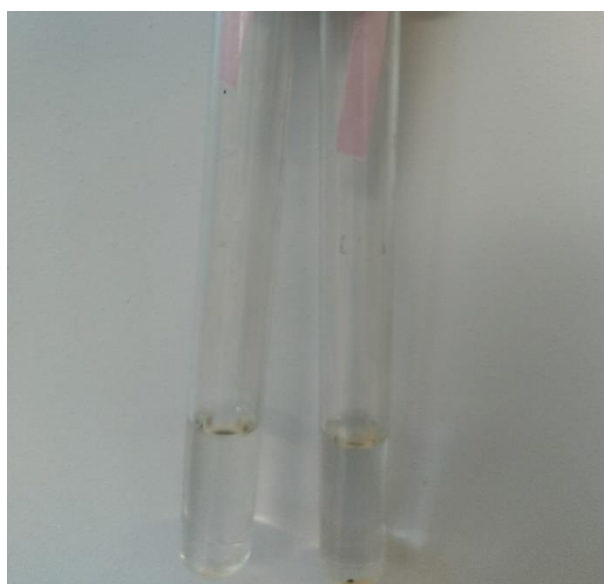


Рис. 41. Проверка уреазной активности на примере штаммов FZPM (F) 7.2.1 и FZPM (H) 4.2.1

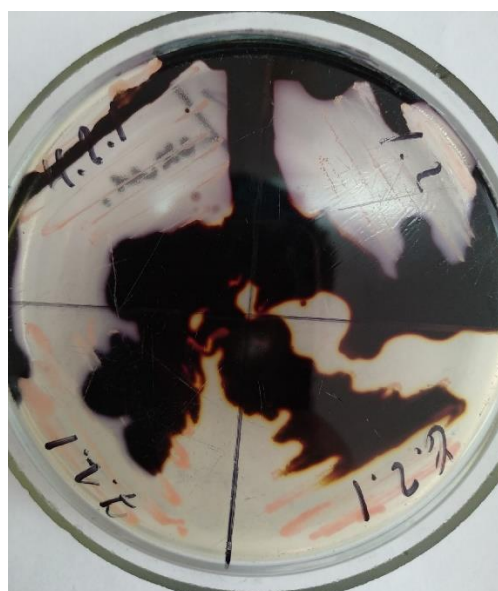


Рис. 42. Проверка амилолитической активности всех исследуемых штаммов

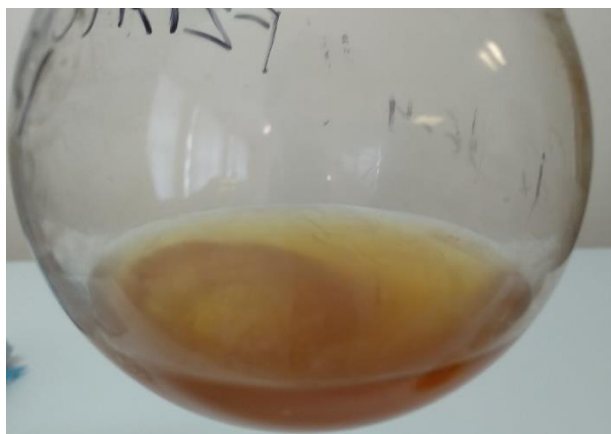


Рис. 43. Образование пленки и взвешенного осадка штамма FZPM (C) 1.2.1

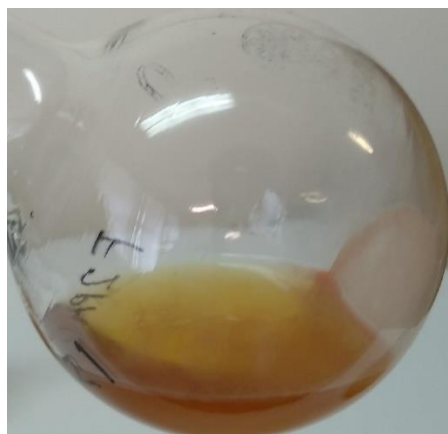


Рис. 44. Образование пленки и взвешенного осадка штамма FZPM (C) 6.2.1

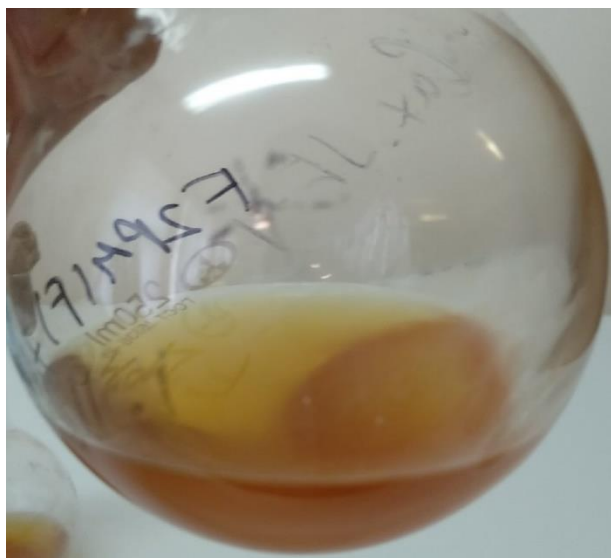


Рис. 45. Образование пленки и взвешенного осадка штамма FZPM (F) 7.2.1

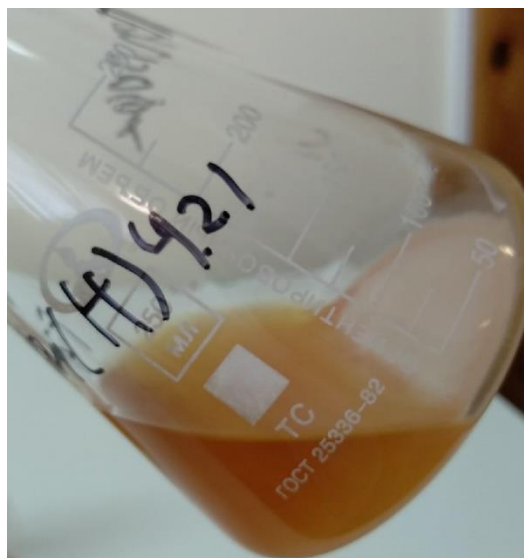


Рис. 46. Образование пленки и взвешенного осадка штамма FZPM (H) 4.2.1

Углеводы не сбраживает.

Исследование способности ассимилировать углеводы у выделенных штаммов показало, что для дрожжей FZPM(C)6.2.1 характерна ассимиляция маннита, лактозы, глюкозы, галактозы, мальтозы, раффинозы и сахарозы (Приложение 3, таблицы 5-8). Различие в степени стимуляции углеводами роста культуры FZPM(C) 6.2.1 статистически незначимое, за исключением маннита и сахарозы, лактозы и раффинозы, так как стимуляция сахарозой и лактозой роста популяции выше, чем раффинозой маннитом, а расчетный

критерий достоверности Стьюдента составил $t_{(1.1-1.7)}=2,449$ и $t_{(1.3-1.6)}=2,449$, что выше табличного значения при $p<0,01$.

Для FZPM(H) 4.2.1 характерна ассимиляция всех исследуемых углеводов в разной степени, различие между которыми статистически незначимо, за исключением маннита и глюкозы, лактозы и мальтозы, так как глюкоза и лактоза проявляли больший стимулирующий эффект, чем маннит и мальтоза, а расчетный критерий достоверности Стьюдента составил $t_{(2.1-2.3)}=3,123$ и $t_{(2.3-2.6)}=3,127$, что выше табличного значения при $p<0,01$.

Для FZPM(F)7.2.1 характерна ассимиляция всех исследуемых углеводов в разной степени, различие между которыми статистически незначимо, за исключением глюкозы и сахарозы, мальтозы и сахарозы, так как сахароза проявила больший стимулирующий эффект, чем глюкоза и мальтоза, а расчетный критерий достоверности Стьюдента составил $t_{(3.4-3.7)}=3,490$ и $t_{(2.3-2.6)}=3,490$, что выше табличного значения при $p<0,01$.

В свою очередь для FZPM(C) 1.2.1 характерна ассимиляция всех исследуемых углеводов в разной степени, различие между которыми статистически незначимо, за исключением глюкозы и раффинозы, так как глюкоза проявила больший стимулирующий эффект, чем раффиноза, а расчетный критерий достоверности Стьюдента составил $t_{(4.3-4.6)}=3,127$, что выше табличного значения при $p<0,01$. Статистическое различие степени стимуляции углеводами роста культур штаммов указана в таблице 2.

Таблица 2. Статистическое различие степени стимуляции углеводами роста культур исследуемых штаммов.

Свойства	Штаммы			
	FZPM(C) 6.2.1 (1.n)	FZPM(H) 4.2.1 (2.n)	FZPM(F) 7.2.1 (3.n)	FZPM(C) 1.2.1 (4.n)
Маннит (N.1)	$t_{p(1.1-1.2)}$ = 0,569	$t_{p(2.1-2.2)}$ = 1,293	$t_{p(3.1-3.2)}$ = 1,109	$t_{p(4.1-4.2)}$ = 0,607
Лактоза (N.2)				
Глюкоза (N.3)	$t_{p(1.1-1.3)}$ = 1,758	$t_{p(2.1-2.3)}$ = 3,123	$t_{p(3.1-3.3)}$ = 1,109	$t_{p(4.1-4.3)}$ = 2,035
Галактоза (N.4)				
Мальтоза (N.5)	$t_{p(1.1-1.4)} = 0$	$t_{p(2.1-2.4)}$ = 1,293	$t_{p(3.1-3.4)}$ = 0,886	$t_{p(4.1-4.4)} = 0$
Раффиноза (N.6)				
Сахароза (N.7)	$t_{p(1.1-1.5)} = 0,69$			

	$t_{p(1.1-1.6)}$ = 0,569	$t_{p(2.1-2.5)} = 0$	$t_{p(3.1-3.5)}$ = 1,719	$t_{p(4.1-4.5)}$ = 0,607
	$t_{p(1.1-1.7)}$ = 1,758	$t_{p(2.1-2.6)}$ = 0,689	$t_{p(3.1-3.6)}$ = 0,886	$t_{p(4.1-4.6)}$ = 0,698
	$t_{p(1.2-1.3)} = 0$	$t_{p(2.1-2.7)} = 0$	$t_{p(3.1-3.7)} = 0$	$t_{p(4.1-4.7)}$ = 1,211
	$t_{p(1.2-1.4)}$ = 0,569	$t_{p(2.2-2.3)}$ = 1,343	$t_{p(3.2-3.3)} = 0$	$t_{p(4.2-4.3)}$ = 1,293
	$t_{p(1.2-1.5)}$ = 1,293	$t_{p(2.2-2.4)} = 0$	$t_{p(3.2-3.4)}$ = 2,035	$t_{p(4.2-4.4)}$ = 0,607
	$t_{p(1.2-1.6)} = 0$	$t_{p(2.2-2.5)}$ = 1,293	$t_{p(3.2-3.5)}$ = 0,651	$t_{p(4.2-4.5)} = 0$
	$t_{p(1.2-1.7)}$ = 2,449	$t_{p(2.2-2.6)}$ = 0,569	$t_{p(3.2-3.6)}$ = 2,035	$t_{p(4.2-4.6)}$ = 1,343
	$t_{p(1.3-1.4)}$ = 1,758	$t_{p(2.2-2.7)}$ = 1,293	$t_{p(3.2-3.7)}$ = 1,109	$t_{p(4.2-4.7)}$ = 0,569
	$t_{p(1.3-1.5)}$ = 1,109	$t_{p(2.3-2.4)}$ = 1,343	$t_{p(3.3-3.4)}$ = 2,035	$t_{p(4.3-4.4)}$ = 2,035
	$t_{p(1.3-1.6)}$ = 2,449	$t_{p(2.3-2.5)}$ = 3,127	$t_{p(3.3-3.5)}$ = 0,651	$t_{p(4.3-4.5)}$ = 1,293
	$t_{p(1.3-1.7)} = 0$	$t_{p(2.3-2.6)}$ = 2,045	$t_{p(3.3-3.6)}$ = 2,035	$t_{p(4.3-4.6)}$ = 3,127
	$t_{p(1.4-1.5)}$ = 0,689	$t_{p(2.3-2.7)}$ = 0,047	$t_{p(3.3-3.7)}$ = 1,109	$t_{p(4.3-4.7)}$ = 0,689
	$t_{p(1.4-1.6)}$ = 0,596	$t_{p(2.4-2.5)}$ = 1,293	$t_{p(3.4-3.5)}$ = 1,252	$t_{p(4.4-4.5)}$ = 0,607
	$t_{p(1.4-1.7)}$ = 1,758	$t_{p(2.4-2.6)}$ = 0,569	$t_{p(3.4-3.6)} = 0$	$t_{p(4.4-4.6)}$ = 0,698
	$t_{p(1.5-1.6)}$ = 1,293	$t_{p(2.4-2.7)}$ = 1,293	$t_{p(3.4-3.7)}$ = 3,490	$t_{p(4.4-4.7)}$ = 1,211
	$t_{p(1.5-1.7)}$ = 1,109	$t_{p(2.5-2.6)}$ = 0,689	$t_{p(3.5-3.6)}$ = 1,252	$t_{p(4.5-4.6)}$ = 1,343
	$t_{p(1.6-1.7)}$ = 2,449	$t_{p(2.5-2.7)} = 0$	$t_{p(3.5-3.7)}$ = 1,719	$t_{p(4.5-4.7)}$ = 0,569
		$t_{p(2.6-2.7)}$ = 0,689	$t_{p(3.6-3.7)}$ = 3,490	$t_{p(4.6-4.7)}$ = 2,045

Изучение динамических характеристик выделенных популяций дрожжей показало, что наибольшее увеличение численности клеток дрожжей FZPM (С) 6.2.1 в питательной среде наблюдается на вторые сутки периодического культивирования, так как ОП на вторые сутки превышает значения первых на 86,16% (расчетный критерий достоверности Стьюдента составил $t_{1.1-1.2} = 20,197$, что выше табличных значений при $p < 0,001$), тогда

различие в оптической плотности между вторыми и третьими сутками составляет 8,16%, третьими и четвертыми – 6,77%. Различия между вторыми и третьими сутками статистически недостоверны, так как расчетные критерии достоверности Стьюдента составили $t_{1.2-1.3} = 1,975$, что ниже табличных значений. В свою очередь, различие между третьими и четвертыми сутками характеризуется достоверностью, так как расчетный критерий Стьюдента $t_{1.3-1.4} = 1,975$ превышает табличные значения. На основании полученных данных можно предположить, что на вторые сутки популяция активно развивается, занимая пространство питательного субстрата. На следующие сутки культура замедляет свое развитие и адаптируется к новым условиям, после чего возобновляет свой рост к четвертым суткам. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 4, таблицах 9-11.

В случае периодического культивирования культуры FZPM(C) 6.2.1 в жидкой питательной среде с добавлением лимонной кислоты, динамические свойства сохраняются, а именно, рост наиболее активен на вторые сутки культивирования (различие от первых суток составляет 40,31%). Различия в оптической плотности культуры между вторыми и третьими сутками составляет 17,9%, а между третьими и четвертыми – 6,02%. Различия оптической плотности статистически достоверно, так как расчетные критерии Стьюдента между первыми и вторыми сутками составляют $t_{1.1-1.2} = 11,145$ и между вторыми и третьими сутками $t_{1.2-1.3} = 5,566$, так как оба превышают табличные значения при $p < 0,001$. Между третьими и четвертыми сутками достоверность наблюдается при $p < 0,01$, так как $t_{1.3-1.4} = 4,364$. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 4, таблицах 12-14.

Статистический анализ цифровых данных оптической плотности культуры FZPM(C) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с добавлением лимонной кислоты и без показал, что внесение в среду кислоты статистически незначимо влияет на динамические характеристики популяции FZPM(C) 6.2.1.

Увеличение численности клеток дрожжей FZPM (F) 7.2.1 в питательной среде наблюдается на первые сутки периодического культивирования, так как

ОП на вторые сутки незначительно превышает значения первых на 10,04% (расчетный критерий достоверности Стьюдента составил $t_{1.1-1.2} = 2,718$, что выше табличных значений при $p < 0,05$), тогда различие в оптической плотности между вторыми и третьими сутками составляет 6,04%, третьими и четвертыми – 2,75 %. Различия между вторыми и третьими сутками статистически достоверны ($t_{1.2-1.3} = 3,975$, что выше табличных значений при $p < 0,01$). В свою очередь, различие между третьими и четвертыми сутками недостоверно, так как расчетный критерий Стьюдента составляет $t_{1.3-1.4} = 1,097$, что ниже табличных значений. На основании полученных данных можно предположить, что в течение первых суток популяция активно развивается, занимая пространство питательного субстрата. На следующие сутки культура замедляет свое развитие и адаптируется к новым условиям, после чего возобновляет свой рост к четвертым суткам. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 4, таблицах 15-17

Такая же картина наблюдается при культивировании культуры дрожжей FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде с лимонной кислотой. Рост активен на первые сутки, в отличие от вторых (различие составляет 13,54%), что является достоверным при критерии Стьюдента, равном $t_{1.1-1.2} = 4,908$, что превышает табличные значения при $p < 0,001$. На третьи сутки культивирования разница составляет 9,9% при $t_{1.2-1.3} = 9,526$, что также является достоверным. Четвертые и третьи сутки различаются на 0,44%, что $t_{1.3-1.4} = 0,234$, что является недостоверным. Полученные результаты позволяют судить, что рост культуры дрожжей на 4 сутки в питательной среде с лимонной кислотой достигает стационарной фазы. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 4, таблицах 18-20.

При сравнении роста культур дрожжей FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде без лимонной кислоты с 1 по 4 сутки, различие первых суток составляет 649,44%, что является достоверным при $p < 0,05$. Объясняется это разным временем начала логарифмической фазы роста

культур, так как на вторые сутки различие составляет всего лишь на 14,12% при достоверности $p < 0,05$. На третьи сутки разница составляет 12,24% при достоверности $p < 0,01$. Разница на четвертые сутки составляет 7,52% при прежней достоверности. На четвертые сутки культивирования объем биомассы сравнивается в связи с началом стационарной фазы роста. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 4, таблицах 20-24.

Сравнение штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде с лимонной кислотой дает понять, что штаммы различаются временем наступления логарифмической фазы роста, так как различие в первые сутки составляет 1763,13% при достоверности $p < 0,001$. Разница между на вторые сутки составляет 25,87% при достоверности $p < 0,05$, на третьи – 16,68% при достоверности $p < 0,05$, на четвертые – 7,12% при достоверности $p < 0,01$. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 4, таблицах 25-28.

При сравнении показателей оптической плотности культуры дрожжей FZPM (C) 6.2.1, культивируемой на питательных средах с добавлением лимонной кислоты и без наблюдается следующая картина: на первые сутки разница составляет 165,67%, но она является недостоверной, на вторые сутки – 12,92% при достоверности $p < 0,01$; на третьи и четвертые сутки разница составляет 0,87% и 1,68%, но, согласно критериям Стьюдента, они являются недостоверными. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 4, таблицах 29-32.

При сравнении показателей оптической плотности культуры дрожжей FZPM (F) 7.2.1, культивируемой на питательных средах с добавлением лимонной кислоты получены такие результаты: на первые сутки разница составляет 5,6%, являющаяся недостоверной, как и показатели вторых, третьих и четвертых суток – 2,38%, 0,24% и 2,07%. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 4, таблицах 33-36.

Сформированная общая картина культивирования в течение 4 исследуемых культур также наблюдается при культивировании в течение 2

суток. Расчетные критерии Стьюдента указаны в приложении 5, таблицах 37-48.

Изучение динамики роста культур FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1, отобранных для культивирования по внешним морфологическим и физиологическим свойствам, путем измерения оптической плотности (Приложение 6, таблица 49), также позволило рассчитать удельную скорость роста культур. На жидкой питательной среде Ридера без лимонной кислоты у FZPM (C) 6.2.1 она составила 0,1787 ОП/сутки, а у FZPM (F) 7.2.1 – 0,1467. На питательных средах с лимонной кислотой удельная скорость роста изменилась: FZPM (C) 6.2.1 она составила 0,2995 ОП/сутки, а у FZPM (F) 7.2.1 – 0,1731 ОП/сутки.

Динамика роста исследуемых штаммов изображена на рисунках 47-50. Удельная скорость роста изображена на рисунке 51.

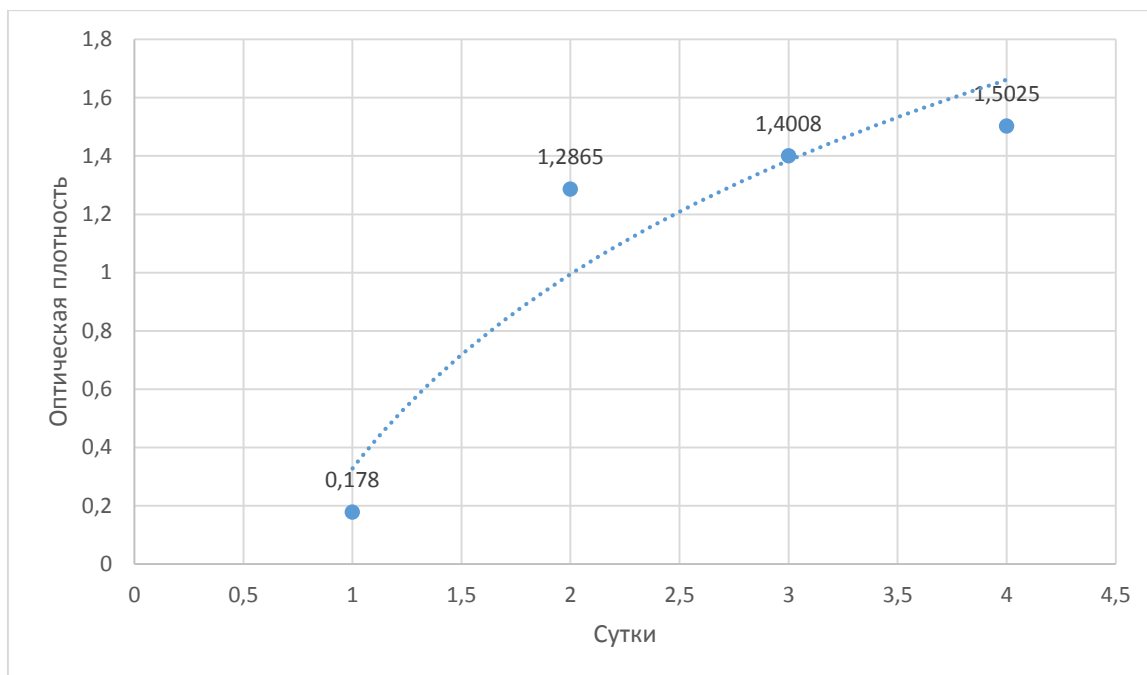


Рис 47. Динамика роста штамма FZPM 6.2.1 при 27°C в жидкой питательной среде Ридера в течение 4 суток

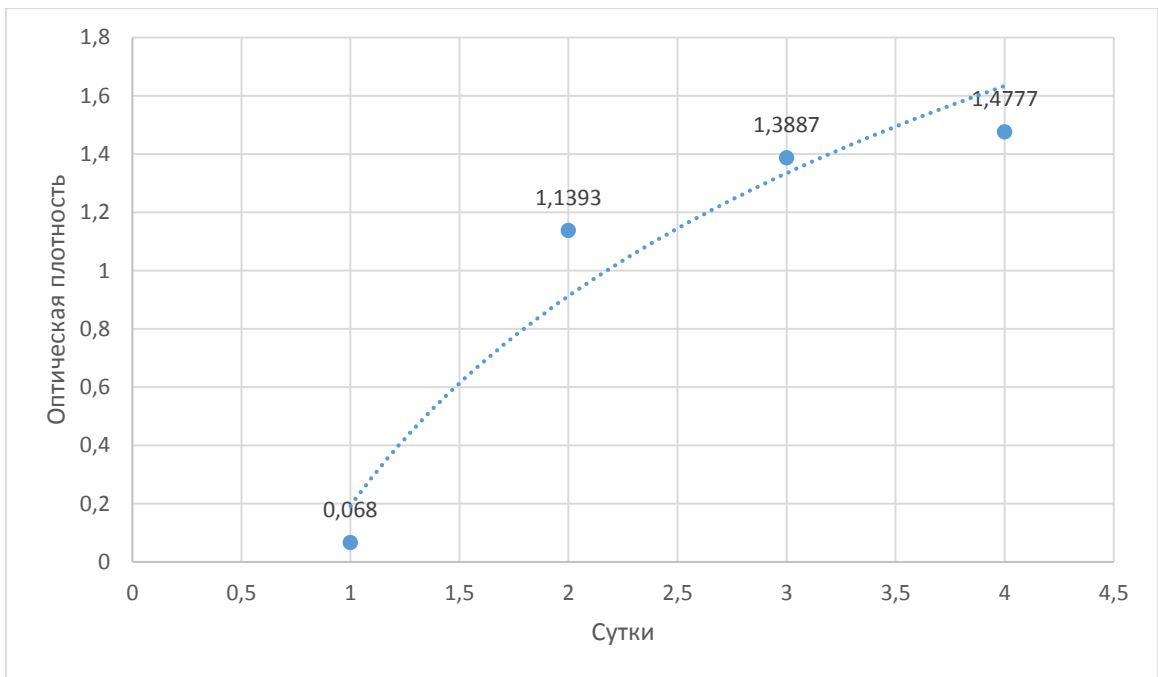


Рис 48. Динамика роста штамма FZPM 6.2.1 при 27°C в жидкой питательной среде Ридера с добавлением лимонной кислоты в течение 4 суток

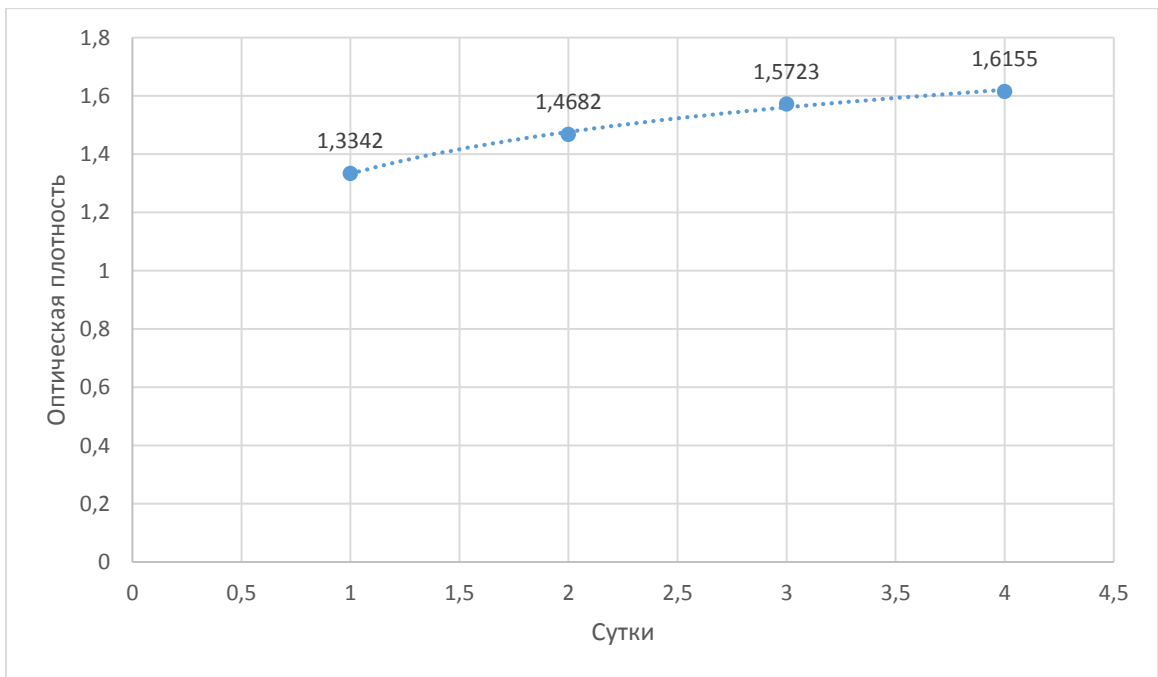


Рис 49. Динамика роста штамма FZPM 7.2.1 при 27°C в жидкой питательной среде Ридера в течение 4 суток

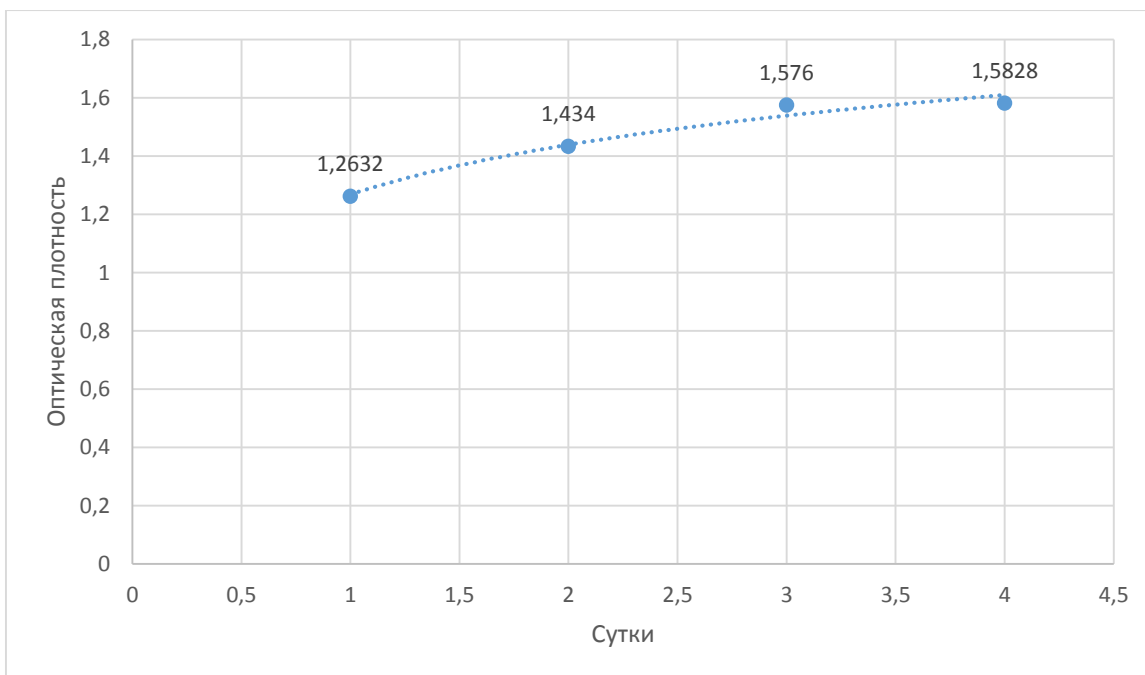


Рис 50. Динамика роста штамма FZPM 7.2.1 при 27°C в жидкой питательной среде Ридера с добавлением лимонной кислоты в течение 4 суток

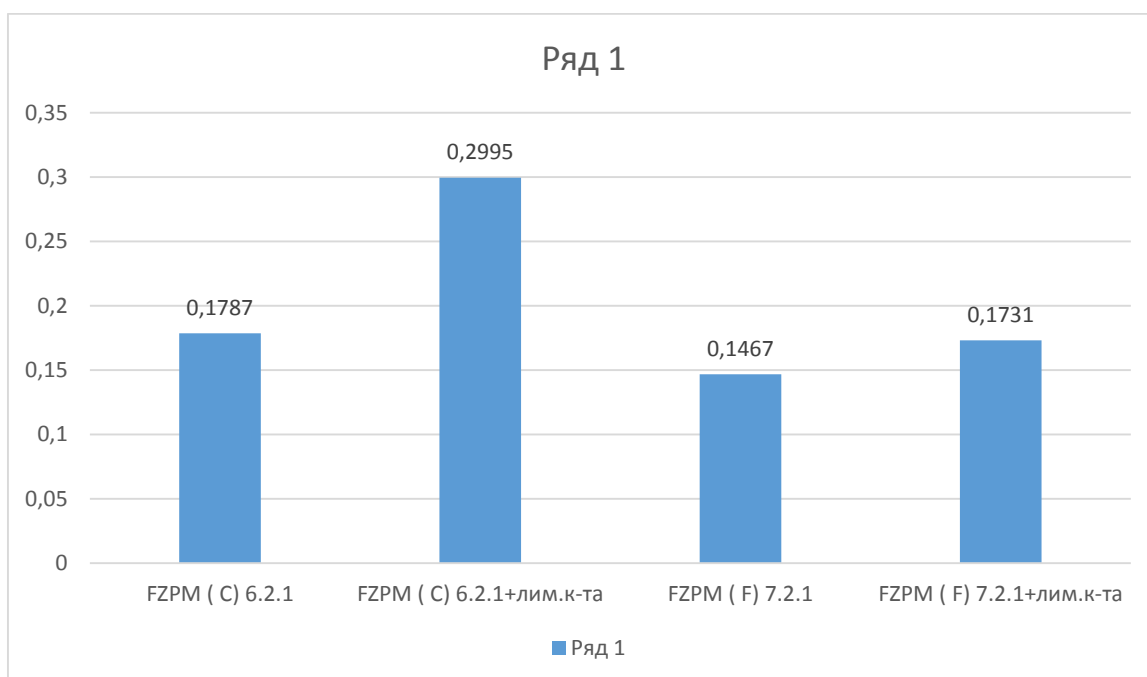


Рис. 51. Удельная скорость роста штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера добавлением лимонной кислоты и без в течение 4 суток

При спектрофотометрическом анализе экстрактов сухой биомассы культур дрожжей FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1, полученных с жидких питательных сред Ридера, в часть которых была добавлена лимонная кислота,

были получены следующие спектры, изображенные в приложении 7. Для измерения условий были взяты две навески сухой биомассы, с которых получаемый экстракт измерялся в 3 параллелях. Согласно определенным значениям оптической плотности по максимумам пиков длин волн, соответствующим, согласно литературным данным, β -каротину, был произведен расчет концентрации суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин.

При исследовании содержания каротиноидов выявлено, что внесение лимонной кислоты в жидкую питательную среду Ридера в количестве 1 г/л не оказывает сильного влияния на продуктивность каротиноидов исследуемыми штаммами, более того, является ингибирующим фактором роста биомассы дрожжей. Кроме этого, значительную роль в снятии показаний сыграли балластные вещества, такие, как белки, жиры, полисахариды, которые очистить не удалось из исходного экстракта по причине отсутствия соответствующего оборудования для проведения таких работ на кафедре биотехнологии и микробиологии. Также проявилась невозможность концентрирования полученных экстрактов традиционными методами, так как это могло повлечь за собой еще большие помехи при снятии показаний, а ротационного испарителя в лаборатории не имелось.

Изучение рассчитанных концентраций каротиноидов в пересчете на β -каротин в экстрактах сухой биомассы культуры дрожжей, полученных путем культивирования в жидкой питательной среде с добавлением лимонной кислоты и без неё, FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 на 2 сутки и 4 сутки путем статистической обработки результатов показало, что практически все сравнения концентраций разностным методом являются статистически недостоверными.

Результаты определенной оптической плотности, рассчитанных концентраций и среднеквадратических отклонений указаны в приложении 8, таблице 50.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, биотехнологическое и микробиологическое получение биологически активных веществ, особенно, каротиноидов, является перспективным направлением развития биотехнологической и микробиологической промышленности в целом.

Исследование, описанное в данной работе, служит началом к углубленному изучению каротиногенеза у дрожжей и дрожжеподобных грибов на различных питательных субстратах с добавлением предшественников, индукторов и других вспомогательных веществ для повышения биосинтеза каротиноидов.

В ходе исследования:

1. был изучен комплекс образуемых каротиноидных пигментов у дрожжей *Rhodotorula sp.* и отобраны штаммы с повышенным каротиногенезом;
2. исследованы особенности процесса биосинтеза каротиноидов отобранными штаммами под влиянием различных условий культивирования и изменения состава питательных сред;
3. Осуществлен анализ полученных экстрактов на наличие суммы каротиноидов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Червякова О.П., Караулова С.С. Исследование каротиногенеза дрожжами *Rhodotorula rubra* / О.П. Червякова, С.С. Караулова // Успехи в химии и химической технологии. – Т.13, 2009. - №10(103) – М.: РХТУ им. Менделеева. – сС 117-119.
2. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И.П. Бабьева, В.И. Голубев. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
3. Каротинсинтезирующие дрожжи /Е. И.Квасников [и др.]; Киев: Наукова думка, 1980. 171 с.
4. Дейнека В.И. Каротиноиды. ч. 1: Номенклатура. Классификация. Синтез / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, И.П. Анисимович; рец.: Н.А. Шаповалов, С.В. Симаков. - Белгород : ИП Остащенко А.А., 2011. - 91 с.
5. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function // The FASEB Journal. 1995. Vol. 9(15). P. 1551–1558.
6. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids // Pure & Appl. Chem. — 1991. — V. 63. — P. 141–146.
7. Ziegler R. G. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer // The Journal of Nutrition. 1989. Vol. 119(1). P. 116–122.
8. Palozza P., Simone R. E., Catalano A., Mele M. C. Tomato lycopene and lung cancer prevention: from experimental to human studies // Cancers. 2011. Vol. 3(2). P. 2333–2357.
9. März U. The global market for carotenoids // BCC Research. Report ID: FOD025E. P. 2015. P. 1–5.
10. Обзор российского рынка каротиноидов [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://soyanews.info/news/obzor_rossiyskogo_rynka_karotinoidov.html
11. Корма и кормовые добавки [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.tsenovik.ru/articles/korma-i-kormovye-dobavki/karotinoidy-v-kormlenii-zhivotnykh/>

12. Carotenoids Market by Type (Astaxanthin, Beta-Carotene, Lutein, Lycopene, Canthaxanthin, and Zeaxanthin), Application (Feed, Food & Beverages, Dietary Supplements, Cosmetics, and Pharmaceuticals), Source, Formulation, and Region - Global Forecast to 2026 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carotenoid-market-158421566.html>

13. Carotenoids Market Size By Source (Natural, Synthetic), By Product (Beta-carotene, Lutein, Astaxanthin, Canthaxanthin, Lycopene), By Application (Food & Beverages, Pharmaceutical, Cosmetics, Animal Feed, Dietary supplements), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2016 – 2024 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/carotenoids-market>

14. Carotenoids Market Size, Share & Trends Analysis Report By Source (Natural, Synthetic), By Product (Beta-Carotene, Lutein, Lycopene, Astaxanthin, Zeaxanthin, Canthaxanthin), By Application, And Segment Forecasts, 2018 – 2025 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/carotenoids-market>

15. Mezzomo N., Ferreira S. R. S. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review, Journal of Chemistry Volume 2016, Article ID 3164312, 16 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3164312>

16. C. L. B. Ambrosio, F. de Arruda Camara e Siqueira Campos, and Z. P. de Faro, “Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A,” Revista de Nutric,ao, vol. 19, no. 2, pp. 233– 243, 2006.

17. H. T. Godoy and D. B. Rodriguez-Amaya, “Carotenoid composition of comercial mangoes from Brazil,” LebensmittelWissenschaft & Technologie, vol. 22, pp. 100–103, 1989.

18. H. K. Arima and D. B. Rodriguez-Amaya, “Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from northeastern Brazil,” Archivos Latinoamericanos de Nutricion, vol. 40, no. 2, pp. 284–292, 1990.

19. H. T. Godoy and D. B. Rodriguez-Amaya, "Occurrence of cis-isomers of provitamin A in Brazilian vegetables," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, no. 8, pp. 3081–3086, 1998.
20. R. B. Assunção and A. Z. Mercadante, "Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.)," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 16, no. 6, pp. 647–657, 2003.
21. A. Stoica, T. Dobre, M. Stroescu, A. Sturzoiu, and O. C. Parvulescu, "From laboratory to scale-up by modelling in two cases of β -carotene extraction from vegetable products," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 94, no. 4, pp. 218–228, 2015.
22. J. A. Trujillo-Quijano, D. B. Rodriguez-Amaya, W. Esteves, and G. F. Plonis, "Carotenoid composition and vitamin A values of oils from Brazilian palm fruits," *Lipid/Fett*, vol. 92, no. 6, pp. 222–226, 1990.
23. C. Thane and S. Reddy, "Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids," *Nutrition & Food Science*, vol. 97, no. 2, pp. 58–65, 1997.
24. C. A. Tavares and D. B. Rodriguez-Amaya, "Carotenoid composition of Brazilian tomato products," *LWT—Food Science and Technology*, vol. 27, no. 3, pp. 219–224, 1994.
25. M. M. Poojary and P. Passamonti, "Optimization of extraction of high purity all-trans-lycopene from tomato pulp waste," *Food Chemistry*, vol. 188, pp. 84–91, 2015.
26. I. F. Strati, E. Gogou, and V. Oreopoulou, "Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 94, pp. 668–674, 2015.
27. K. K. H. Y. Ho, M. G. Ferruzzi, A. M. Liceaga, and M. F. San Martín-Gonzalez, "Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields," *LWT—Food Science and Technology*, vol. 62, no. 1, pp. 160–168, 2015.

28. P. Y. Niizu and D. B. Rodriguez-Amaya, "A melancia como fonte de licopeno," in Proceedings of the 4th Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, Campinas, Brazil, October 2002
29. V. V. de Rosso and A. Z. Mercadante, "Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests," Food Research International, vol. 38, no. 8-9, pp. 1073–1077, 2005.
30. M. Kimura and D. B. Rodriguez-Amaya, "Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables," Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 51, no. 9, pp. 2603–2607, 2003.
31. E. Luengo, J. M. Martinez, A. Bordetas, I. Alvarez, and J. Raso, "Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*," Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 29, pp. 15–22, 2015.
32. C. Chen, Jesusca, C. Hsieh, D. Lee, C. Chang, and J. Chang, "Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1," Bioresource Technology, vol. 200, pp. 500–505, 2016.
33. M.-C. Chan, S.-H. Ho, D.-J. Lee, C.-Y. Chen, C.-C. Huang, and J.-S. Chang, "Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N," Biochemical Engineering Journal, vol. 78, pp. 24–31, 2013.
34. D. Singh, C. J. Barrow, A. S. Mathur, D. K. Tuli, and M. Puri, "Optimization of zeaxanthin and β -carotene extraction from *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters," Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, vol. 4, pp. 166–173, 2015.
35. M. Sugiura, M. Nakamura, Y. Ikoma et al., "Serum carotenoid concentrations are inversely associated with serum aminotransferases in hyperglycemic subjects," Diabetes Research and Clinical Practice, vol. 71, no. 1, pp. 82–91, 2006.
36. N. Mezzomo, B. Maestri, R. L. dos Santos, M. Maraschin, and S. R. S. Ferreira, "Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: influence of

extraction method on carotenoid concentration,” *Talanta*, vol. 85, no. 3, pp. 1383–1391, 2011.

37. B. R. Parjikolaei, R. B. El-Houri, X. C. Frette, and K. V. Christensen, “Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (*Pandalus borealis*) processing waste,” *Journal of Food Engineering*, vol. 155, pp. 22–28, 2015.

38. C. Yin, S. Yang, X. Liu, and H. Yan, “Efficient extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* with polar and non-polar solvents after acid washing,” *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 21, no. 7, pp. 776–780, 2013.

39. D. Y. Kim, D. Vijayan, R. Praveenkumar et al., “Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*,” *Bioresource Technology*, vol. 199, pp. 300–310, 2016.

40. Дейнека В.И. Каротиноиды. Ч. 1 : Номенклатура. Классификация. Синтез: монография/В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, И.П. Анисимович. – ИП Остащенко А.А., 2011 – 91 с.

41. W. A. Schroeder and E. A. Johnson, “Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 31, pp. 18374–18379, 1995.

42. G. I. Feovila, “Fungal carotenoids: their biological functions and practical use,” *Applied Biochemical Bioengineering*, vol. 30, pp. 143–153, 1994.

43. L. J. Borowitzka and M. A. Borowitzka, “ β -carotene production with algae,” in *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*, J. E. Vandamme, Ed., pp. 15–26, Elsevier Applied Science, New York, NY, USA, 1989.

44. L. Dufosse, “Microbial production of food grade pigments,” *Food Technology and Biotechnology*, vol. 44, no. 3, pp. 313–321, 2006.

45. P. Bhosale, “Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 63, no. 4, pp. 351–361, 2004.

46. M. C. Silva, Alteracoes na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes quimicos [Doctoring Thesis (Food Science)], Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, 2004.
47. J. D. Fontana, B. Czezuga, T. M. B. Bonfim et al., “Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*,” *Bioresource Technology*, vol. 58, no. 2, pp. 121–125, 1996.
48. Z. Aksu and A. T. Eren, “Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source,” *Process Biochemistry*, vol. 40, no. 9, pp. 2985–2991, 2005.
49. P. Davoli, V. Mierau, and R. W. S. Weber, “Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*,” *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 40, no. 4, pp. 392–397, 2004.
50. Y.-S. Liu, J.-Y. Wu, and K.-P. Ho, “Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 27, no. 3, pp. 331–335, 2006.
51. C. P. Aguilar, M. Gonzalez, A. S. Cifuentes, and M. Silva, “Growth and accumulation of total carotenoids in two strains of *Dunaliella salina* Teod. (*Chlorophyceae*) from the northern and central coast of Peru,” *Journal of the Chilean Chemical Society*, vol. 49, no. 1, pp. 69–74, 2004.
52. E. Valduga, A. Valerio, H. Treichel, A. F. Junior, and M. L. Di, “Optimization of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique,” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 2, no. 4, pp. 415–421, 2009.
53. Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., Abdallah, Y., Hamdy, A., & Elbogdady, A. H. (2019). Red yeast (*Phaffia rhodozyma*) as a source of Astaxanthin and its impacts on productive performance and physiological responses of poultry. *World’s Poultry Science Journal*, 75(02), 273–284. doi:10.1017/s0043933919000187

54. Борзова Юлия Владимировна, Богомолова Т.С., Артемьева М.Н., Попова В.В., Тимирбаева О.Ю., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Менингиты, обусловленные *Rhodotorula mucilaginosa*: клиническое наблюдение и обзор // Проблемы медицинской микологии. 2017. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/meningity-obuslovlennyye-rhodotorula-mucilaginosa-klinicheskoe-nablyudenie-i-obzor> (дата обращения: 07.07.2020)
55. Yaegashi, Junko; Kirby, James; Ito, Masakazu; Sun, Jian; Dutta, Tanmoy; Mirsiaghi, Mona; Sundstrom, Eric R.; Rodriguez, Alberto; Baidoo, Edward; Tanjore, Deepti; Pray, Todd (December 2017). "Rhodosporidium toruloides: a new platform organism for conversion of lignocellulose into terpene biofuels and bioproducts". *Biotechnology for Biofuels*. 10 (1): 241. doi:10.1186/s13068-017-0927-5
56. Kurtzman, edited by Cletus P.; Fell, Jack W.; Boekhout, Teun (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study* (5th ed.). Amsterdam: Elsevier. ISBN 978-0-444-52149-1.
57. Simpson, Kenneth L. (University of California, Davis), T. O. M. Nakayama, and C. O. Chichester. Biosynthesis of yeast carotenoids. *J. Bacteriol.* 88:1688-1694. 1964
58. Latha BV, Jeevaratnam K, Murali HS, Manja KS (2005) Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. *Indian J Biotechnol* 4:353–357
59. Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Gientka, I., & Kieliszek, M. (2016). *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6103–6117. doi:10.1007/s00253-016-7611-8
60. Goodwin TW (1980) Biosynthesis of carotenoids. In: Goodwin TW (ed) *The biochemistry of the carotenoids*, vol 1. Chapman and Hall, London, pp 33–76. doi:10.1007/978-94-009-5860-9_2
61. Червякова О. П. Получение микробной биомассы, обогащенной каротиноидами // *Успехи в химии и химической технологии*. 2010. №11 (116).

URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/poluchenie-mikrobnou-biomassy-obogaschennoy-karotinoidami> (дата обращения: 07.07.2020).

62. Герасимович К. М., Бесараб Н. В., Кантерова А. В., Новик Г. И. Исследование факторов, обладающих стимулирующим влиянием на рост и каротиногенез у дрожжей *Rhodotorula glutinis* БИМ У-253 / Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века = Sakharov readings 2017 : environmental problems of the XXI century : материалы 17-й международной научной конференции, 18–19 мая 2017 г., г. Минск, Республика Беларусь : в 2 ч. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол. : С. Е. Головатый [и др.] ; под ред. д-ра ф.-м. н., проф. С. А. Маскевича, д-ра с.-х. н., проф. С. С. Позняка. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – Ч. 1. – С. 128-129.

63. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

64. Нетрусов А. И. и др. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для высших учеб. заведений/под ред. АИ Нетрусова //М.: Академия. – 2005. – 608 с.

65. Iftikhar Ahmed, Akira Yokota, Atsushi Yamazoe, Toru Fujiwara. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. – V. 57. – №. 5. – P. 1117-1125. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>

66. Derrick, B; Toher, D; White, P (2017). "How to compare the means of two samples that include paired observations and independent observations: A companion to Derrick, Russ, Toher and White (2017)" *The Quantitative Methods for Psychology*. **13** (2): 120–126. [doi:10.20982/tqmp.13.2.p120](https://doi.org/10.20982/tqmp.13.2.p120)

67. Oxidative fermentative (OF) test: Principle, procedure and results [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://microbeonline.com/oxidative-fermentative-test-principle-procedure-results/>

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1. Индивидуальные свойства культур пигментообразующих дрожжей (микроскопия и культуральные свойства)

Таблица 3

Свойства	Культуры			
	FZPM(C) 6.2.1	FZPM(F) 7.2.1	FZPM(C) 1.2.1	FZPM(H) 4.2.1
Форма колонии:				
Круглая	+	+	+	+
Круглая с фестончатым краем	-	-	-	-
Круглая с валиком по краю	-	-	-	-
Ризоидные	-	-	-	-
С ризоидным краем	-	-	-	-
Амебовидная	-	-	-	-
Нитевидная	-	-	-	-
Складчатая	-	-	-	-
Неправильная	-	-	-	-
Концентрическая	-	-	-	-
Сложная	-	-	-	-
Профиль колонии:				
Изогнутый	-	-	-	-
Кратерообразный	-	-	-	-
Бугристый	-	-	-	-
Врастающий в субстрат	-	-	-	-
Плоский	-	-	-	-
Выпуклый	+	+	+	+
Каплевидный	-	-	-	-
Конусовидный	-	-	-	-

Край колонии:				
Гладкий	+	+	+	+
Волнистый	-	-	-	-
зубчатый	-	-	-	-
Лопастной	-	-	-	-
Неправильный	-	-	-	-
Реснитчатый	-	-	-	-
Нитчатый	-	-	-	-
Ворсинчатый	-	-	-	-
Ветвистый	-	-	-	-
Диаметр (среднеквадратический) колонии				
Поверхность:				
Гладкая	+	+	+	+
Шероховатая	-	-	-	-
Бороздчатая	-	-	-	-
Складчатая	-	-	-	-
Морщинистая с концентрическими кругами	-	-	-	-
Морщинистая с радиально исчерченная	-	-	-	-
Блеск и прозрачность:				
Блестящая	+	+	+	+
Матовая	-	-	-	-
Тусклая	-	-	-	-
Мучнистая	-	-	-	-
Прозрачная	-	-	-	-
Цвет:				
Бесцветная	-	-	-	-
Пигментированная	+	+	+	+
Структура:				
Однородная	+	+	+	+

Мелкозернистая	-	-	-	-
Крупнозернистая	-	-	-	-
Струйчатая	-	-	-	-
Волокнистая	-	-	-	-
Форма клеток:				
Овальные	+	+	+	+
Включения:				
Гликоген	+	+	+	+
Волютин	+	+	+	+
Капсулы	+	+	+	+
Жир	+	+	+	+
Окраска по Граму:				
Грам+	+	+	+	+
Грам-	-	-	-	-

Примечание:

«+» - наличие признака;

«-» - отсутствие признака.

Приложение № 2. Результаты определения индивидуальных физиологических свойств дрожжей

Таблица 4

Свойства	Культуры			
	FZPM(C) 6.2.1	FZPM(F) 7.2.1	FZPM(C) 1.2.1	FZPM(H) 4.2.1
Каталаза	+	+	+	+
Цитохромоксидаза	-	-	-	-
Липаза	+	+	+	+
Уреаза	+	+	+	+
Гидролиз крахмала	-	-	-	-
Лецитиназа	+	+	+	+
Отношение к O ₂	+	+	+	+
Сбраживание углеводов:				
Маннит	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-
Глюкоза	-	-	-	-
Галактоза	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	-
Раффиноза	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-

Приложение № 3. Способность ассимилировать углеводы штаммами

Таблица 5. Штамм FZPM (C) 6.2.1:

Углевод	Кол-во повторностей N	Количество проявлений стимуляции роста n	Доля наличия признака p	Доля отсутствия признака q
Маннит (1.1)	6	4	0,66	0,34
Лактоза (1.2)	6	3	0,5	0,5
Глюкоза (1.3)	6	6	1	0
Галактоза (1.4)	6	4	0,66	0,34
Мальтоза (1.5)	6	5	0,83	0,17
Раффиноза (1.6)	6	3	0,5	0,5
Сахароза (1.7)	6	6	1	0

Таблица 6. Штамм FZPM (H) 4.2.1:

Углевод	Кол-во повторностей N	Количество проявлений стимуляции роста n	Доля наличия признака p	Доля отсутствия признака q
Маннит (2.1)	6	5	0,83	0,17
Лактоза (2.2)	6	3	0,5	0,5
Глюкоза (2.3)	6	1	0,16	0,84
Галактоза (2.4)	6	3	0,5	0,5
Мальтоза (2.5)	6	5	0,83	0,17
Раффиноза (2.6)	6	4	0,66	0,34
Сахароза (2.7)	6	5	0,83	0,17

Таблица 7. Штамм FZPM (F) 7.2.1:

Углевод	Кол-во повторностей N	Количество проявлений стимуляции роста n	Доля наличия признака p	Доля отсутствия признака q
Маннит (3.1)	6	1	1	0
Лактоза (3.2)	6	3	0,83	0,17
Глюкоза (3.3)	6	1	0,83	0,17
Галактоза (3.4)	6	3	0,33	0,67
Мальтоза (3.5)	6	5	0,67	0,33
Раффиноза (3.6)	6	4	0,33	0,67
Сахароза (3.7)	6	5	1	0

Таблица 8. Штамм FZPM (C) 1.2.1:

Углевод	Кол-во повторностей N	Количество проявлений стимуляции роста n	Доля наличия признака p	Доля отсутствия признака q
Маннит (4.1)	6	1	0,33	0,67
Лактоза (4.2)	6	3	0,5	0,5
Глюкоза (4.3)	6	1	0,83	0,17
Галактоза (4.4)	6	3	0,33	0,67
Мальтоза (4.5)	6	5	0,5	0,5

Раффиноза (4.6)	6	4	0,16	0,84
Сахароза (4.7)	6	5	0,66	034

Приложение №4. Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (С) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без, культивируемых в течение 4 суток, разностным методом.

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом

Таблица 9

№	2 сутки	1 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,327	0,208	1,119	0,0105	0,00011025	0,05488308	20,197481
2	1,297	0,197	1,1	-0,0085	0,00007225		
3	1,307	0,197	1,11	0,0015	0,00000225		
4	1,251	0,194	1,057	-0,0515	0,00265225		
5	1,275	0,131	1,144	0,0355	0,00126025		
6	1,262	0,141	1,121	0,0125	0,00015625		
Ср.	1,2865	0,178	$\bar{d}=1,1085$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00433750$		

Таблица 10

№	3 сутки	2 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,423	1,327	0,096	-0,0183	0,00033611	0,05802099	1,9705513
2	1,4	1,297	0,103	0,02567	0,00065878		
3	1,377	1,307	0,07	-0,0443	0,00196544		
4	1,384	1,251	0,133	0,01867	0,00034844		
5	1,419	1,275	0,144	0,02967	0,00088011		

6	1,402	1,262	0,14	0,02567	0,00065878		
Ср.	1,400833	1,2865	$\bar{d}=0,11433$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00484767$		

Таблица 11

№	4 сутки	3 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,513	1,423	0,09	-0,0117	0,00013611	0,04480152	2,2692684
2	1,515	1,4	0,115	-0,0017	0,00000278		
3	1,517	1,377	0,14	0,03833	0,00146944		
4	1,483	1,384	0,099	-0,0027	0,00000711		
5	1,485	1,419	0,066	-0,0357	0,00127211		
6	1,502	1,402	0,1	-0,0017	0,00000278		
Ср.	1,5025	1,400833	$\bar{d}=0,10167$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00289033$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом

Таблица 12

№	2 сутки	1 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,186	0,06	1,126	0,0545	0,00297025	0,09613901	11,14532
2	1,178	0,066	1,112	-0,0525	0,00275625		
3	1,167	0,058	1,109	0,0375	0,00140625		
4	1,11	0,068	1,042	-0,0295	0,00087025		

5	1,098	0,077	1,021	-0,0505	0,00255025		
6	1,097	0,078	1,019	-0,0525	0,00275625		
Ср.	1,139333	0,067833	$\bar{d}=1,0715$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,01330950$		

Таблица 13

№	3 сутки	2 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,4	1,186	0,214	-0,0353	0,00124844	0,04479893	5,5656087
2	1,41	1,178	0,232	0,02067	0,00042711		
3	1,421	1,167	0,254	0,00467	0,00002178		
4	1,359	1,11	0,249	-0,0003	0,00000011		
5	1,375	1,098	0,277	0,02767	0,00076544		
6	1,367	1,097	0,27	0,02067	0,00042711		
Ср.	1,388667	1,139333	$\bar{d}=0,24933$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00289000$		

Таблица 14

№	4 сутки	3 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,501	1,4	0,101	0,012	0,00014400	0,0203954	4,3637297
2	1,487	1,41	0,077	0,013	0,00016900		
3	1,5	1,421	0,079	-0,01	0,00010000		
4	1,444	1,359	0,085	-0,004	0,00001600		
5	1,465	1,375	0,09	0,001	0,00000100		
6	1,469	1,367	0,102	0,013	0,00016900		

Ср.	1,477667	1,388667	$\bar{d}=0,089$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00059900$		
-----	----------	----------	-----------------	------------	---------------------	--	--

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом

Таблица 15

№	2 сутки	1 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,456	1,349	0,107	-0,027	0,00072900	0,04929362	2,7184045
2	1,49	1,355	0,135	0,028	0,00078400		
3	1,466	1,357	0,109	-0,025	0,00062500		
4	1,455	1,322	0,133	-0,001	0,00000100		
5	1,469	1,311	0,158	0,024	0,00057600		
6	1,473	1,311	0,162	0,028	0,00078400		
Ср.	1,468167	1,334167	$\bar{d}=0,134$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00349900$		

Таблица 16

№	3 сутки	2 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,562	1,456	0,106	0,00183	0,00000336	0,02672087	3,8983269
2	1,571	1,49	0,081	-0,0152	0,00023003		
3	1,58	1,466	0,114	0,00983	0,00009669		
4	1,58	1,455	0,125	0,02083	0,00043403		
5	1,579	1,469	0,11	0,00583	0,00003403		

6	1,562	1,473	0,089	-0,0152	0,00023003		
Ср.	1,572333	1,468167	$\bar{d}=0,10417$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00102817$		

Таблица 17

№	4 сутки	3 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,614	1,562	0,052	0,00883	0,00007803	0,03936563	1,0965573
2	1,608	1,571	0,037	0,02783	0,00077469		
3	1,615	1,58	0,035	-0,0082	0,00006669		
4	1,6	1,58	0,02	-0,0232	0,00053669		
5	1,623	1,579	0,044	0,00083	0,00000069		
6	1,633	1,562	0,071	0,02783	0,00077469		
Ср.	1,6155	1,572333	$\bar{d}=0,04317$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00223150$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом

Таблица 18

№	2 сутки	1 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,421	1,246	0,175	0,00417	0,00001736	0,03480934	4,9076873
2	1,423	1,258	0,165	0,02717	0,00073803		
3	1,427	1,26	0,167	-0,0038	0,00001469		
4	1,439	1,278	0,161	-0,0098	0,00009669		

5	1,436	1,277	0,159	-0,0118	0,00014003		
6	1,458	1,26	0,198	0,02717	0,00073803		
Ср.	1,434	1,263167	$\bar{d}=0,17083$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00174483$		

Таблица 19

№	3 сутки	2 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,578	1,421	0,157	0,015	0,00022500	0,01490712	9,5256496
2	1,558	1,423	0,135	-0,005	0,00002500		
3	1,564	1,427	0,137	-0,005	0,00002500		
4	1,579	1,439	0,14	-0,002	0,00000400		
5	1,582	1,436	0,146	0,004	0,00001600		
6	1,595	1,458	0,137	-0,005	0,00002500		
Ср.	1,576	1,434	$\bar{d}=0,142$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00032000$		

Таблица 20

№	4 сутки	3 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,596	1,578	0,018	0,01117	0,00012469	0,02917262	0,2342379
2	1,577	1,558	0,019	-0,0158	0,00025069		
3	1,588	1,564	0,024	0,01717	0,00029469		
4	1,573	1,579	-0,006	-0,0128	0,00016469		
5	1,577	1,582	-0,005	-0,0118	0,00014003		
6	1,586	1,595	-0,009	-0,0158	0,00025069		

Ср.	1,582833	1,576	$\bar{d}=0,00683$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00122550$		
-----	----------	-------	-------------------	------------	---------------------	--	--

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом на 1 сутки

Таблица 21

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (C) 6.2.1	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,349	0,208	1,141	-0,0152	0,00023003	0,03716361	31,110178
2	1,355	0,197	1,158	0,01383	0,00019136		
3	1,357	0,197	1,16	0,00383	0,00001469		
4	1,322	0,194	1,128	-0,0282	0,00079336		
5	1,311	0,131	1,18	0,02383	0,00056803		
6	1,311	0,141	1,17	0,01383	0,00019136		
Ср.	1,334166667	0,178	$\bar{d}=1,15617$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00198883$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом на 2 сутки

Таблица 22

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (C) 6.2.1	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,456	1,327	0,129	-0,0527	0,00277378	0,06269045	2,8978364
2	1,49	1,297	0,193	0,02933	0,00086044		

3	1,466	1,307	0,159	-0,0227	0,00051378		
4	1,455	1,251	0,204	0,02233	0,00049878		
5	1,469	1,275	0,194	0,01233	0,00015211		
6	1,473	1,262	0,211	0,02933	0,00086044		
Ср.	1,468166667	1,2865	$\bar{d}=0,18167$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00565933$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом на 3 сутки

Таблица 23

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (C) 6.2.1	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,562	1,423	0,139	-0,0325	0,00105625	0,04598837	3,7292034
2	1,571	1,4	0,171	-0,0115	0,00013225		
3	1,58	1,377	0,203	0,0315	0,00099225		
4	1,58	1,384	0,196	0,0245	0,00060025		
5	1,579	1,419	0,16	-0,0115	0,00013225		
6	1,562	1,402	0,16	-0,0115	0,00013225		
Ср.	1,572333333	1,400833333	$\bar{d}=0,1715$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00304550$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом на 4 сутки

Таблица 24

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (C) 6.2.1	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,614	1,513	0,101	-0,012	0,00014400	0,03393212	3,3301778
2	1,608	1,515	0,093	0,018	0,00032400		
3	1,615	1,517	0,098	-0,015	0,00022500		
4	1,6	1,483	0,117	0,004	0,00001600		
5	1,623	1,485	0,138	0,025	0,00062500		
6	1,633	1,502	0,131	0,018	0,00032400		
Ср.	1,6155	1,5025	$\bar{d}=0,113$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00165800$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом на 1 сутки

Таблица 25

№	FZPM (F) 7.2.1 + лим. к-та	FZPM (C) 6.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,246	0,06	1,186	-0,0093	0,00008711	0,02242271	53,309056
2	1,258	0,066	1,192	-0,0133	0,00017778		
3	1,26	0,058	1,202	0,00667	0,00004444		
4	1,278	0,068	1,21	0,01467	0,00021511		
5	1,277	0,077	1,2	0,00467	0,00002178		
6	1,26	0,078	1,182	-0,0133	0,00017778		
Ср.	1,263166667	0,067833333	$\bar{d}=1,19533$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00072400$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом на 2 сутки

Таблица 26

№	FZPM (F) 7.2.1 + лим. к-та	FZPM (C) 6.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,421	1,186	0,235	-0,0597	0,00356011	0,10742784	2,7429265
2	1,423	1,178	0,245	0,06633	0,00440011		
3	1,427	1,167	0,26	-0,0347	0,00120178		
4	1,439	1,11	0,329	0,03433	0,00117878		
5	1,436	1,098	0,338	0,04333	0,00187778		
6	1,458	1,097	0,361	0,06633	0,00440011		
Ср.	1,434	1,139333333	$\bar{d}=0,29467$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,01661867$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом на 3 сутки

Таблица 27

№	FZPM (F) 7.2.1 + лим. к-та	FZPM (C) 6.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,578	1,4	0,178	-0,0093	0,00008711	0,06878913	2,7232985
2	1,558	1,41	0,148	0,04067	0,00165378		
3	1,564	1,421	0,143	-0,0443	0,00196544		
4	1,579	1,359	0,22	0,03267	0,00106711		
5	1,582	1,375	0,207	0,01967	0,00038678		
6	1,595	1,367	0,228	0,04067	0,00165378		

Ср.	1,576	1,388666667	$\bar{d}=0,18733$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00681400$		
-----	-------	-------------	-------------------	------------	---------------------	--	--

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом на 4 сутки

Таблица 28

№	FZPM (F) 7.2.1 + лим. к-та	FZPM (C) 6.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,596	1,501	0,095	-0,0102	0,00010336	0,02996333	3,5098462
2	1,577	1,487	0,09	0,01183	0,00014003		
3	1,588	1,5	0,088	-0,0172	0,00029469		
4	1,573	1,444	0,129	0,02383	0,00056803		
5	1,577	1,465	0,112	0,00683	0,00004669		
6	1,586	1,469	0,117	0,01183	0,00014003		
Ср.	1,582833333	1,477666667	$\bar{d}=0,10517$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00129283$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (C) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 1 сутки

Таблица 29

№	FZPM (C) 6.2.1	FZPM (C) 6.2.1 + лим.к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	0,208	0,06	0,148	0,03783	0,00143136	0,08382149	1,314301
2	0,197	0,066	0,131	-0,0472	0,00222469		
3	0,197	0,058	0,139	0,02883	0,00083136		

4	0,194	0,068	0,126	0,01583	0,00025069		
5	0,131	0,077	0,054	-0,0562	0,00315469		
6	0,141	0,078	0,063	-0,0472	0,00222469		
Ср.	0,178	0,067833333	$\bar{d}=0,11017$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,01011750$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (C) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 2 сутки

Таблица 30

№	FZPM (C) 6.2.1	FZPM (C) 6.2.1 + лим.к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,327	1,186	0,141	-0,0062	0,00003803	0,03388604	4,3429877
2	1,297	1,178	0,119	0,01783	0,00031803		
3	1,307	1,167	0,14	-0,0072	0,00005136		
4	1,251	1,11	0,141	-0,0062	0,00003803		
5	1,275	1,098	0,177	0,02983	0,00089003		
6	1,262	1,097	0,165	0,01783	0,00031803		
Ср.	1,2865	1,139333333	$\bar{d}=0,14717$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00165350$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (C) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 3 сутки

Таблица 31

№	FZPM (C) 6.2.1	FZPM (C) 6.2.1 + лим.к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
---	----------------	---------------------------	---	--------------	------------------------------	----	-------

1	1,423	1,4	0,023	0,01083	0,00011736	0,06176138	0,1969947
2	1,4	1,41	-0,01	0,02283	0,00052136		
3	1,377	1,421	-0,044	-0,0562	0,00315469		
4	1,384	1,359	0,025	0,01283	0,00016469		
5	1,419	1,375	0,044	0,03183	0,00101336		
6	1,402	1,367	0,035	0,02283	0,00052136		
Ср.	1,400833333	1,388666667	$\bar{d}=0,01217$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00549283$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (C) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 4 сутки

Таблица 32

№	FZPM (C) 6.2.1	FZPM (C) 6.2.1 + лим.к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,513	1,501	0,012	-0,0128	0,00016469	0,02012979	1,233661
2	1,515	1,487	0,028	0,00817	0,00006669		
3	1,517	1,5	0,017	-0,0078	0,00006136		
4	1,483	1,444	0,039	0,01417	0,00020069		
5	1,485	1,465	0,02	-0,0048	0,00002336		
6	1,502	1,469	0,033	0,00817	0,00006669		
Ср.	1,5025	1,477666667	$\bar{d}=0,02483$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00058350$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 1 сутки

Таблица 33

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (F) 7.2.1 + лим.к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,349	1,246	0,103	0,032	0,00102400	0,05650713	1,2564786
2	1,355	1,258	0,097	-0,02	0,00040000		
3	1,357	1,26	0,097	0,026	0,00067600		
4	1,322	1,278	0,044	-0,027	0,00072900		
5	1,311	1,277	0,034	-0,037	0,00136900		
6	1,311	1,26	0,051	-0,02	0,00040000		
Ср.	1,334166667	1,263166667	$\bar{d}=0,071$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00459800$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 2 сутки

Таблица 34

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (F) 7.2.1 + лим.к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,456	1,421	0,035	0,00083	0,00000069	0,02751473	1,2417593
2	1,49	1,423	0,067	-0,0192	0,00036736		
3	1,466	1,427	0,039	0,00483	0,00002336		
4	1,455	1,439	0,016	-0,0182	0,00033003		
5	1,469	1,436	0,033	-0,0012	0,00000136		
6	1,473	1,458	0,015	-0,0192	0,00036736		
Ср.	1,468166667	1,434	$\bar{d}=0,03417$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00109017$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 3 сутки

Таблица 35

№	FZPM (F) 7.2.1 + лим.к-та	FZPM (F) 7.2.1	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,578	1,562	0,016	0,01233	0,00015211	0,03980857	0,0921075
2	1,558	1,571	-0,013	0,02933	0,00086044		
3	1,564	1,58	-0,016	-0,0197	0,00038678		
4	1,579	1,58	-0,001	-0,0047	0,00002178		
5	1,582	1,579	0,003	-0,0007	0,00000044		
6	1,595	1,562	0,033	0,02933	0,00086044		
Ср.	1,576	1,572333333	$\bar{d}=0,00367$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00228200$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 4 сутки

Таблица 36

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (F) 7.2.1 + лим.к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,614	1,596	0,018	-0,0147	0,00021511	0,02455153	1,3305347
2	1,608	1,577	0,031	0,01433	0,00020544		
3	1,615	1,588	0,027	-0,0057	0,00003211		
4	1,6	1,573	0,027	-0,0057	0,00003211		
5	1,623	1,577	0,046	0,01333	0,00017778		

6	1,633	1,586	0,047	0,01433	0,00020544		
Cp.	1,6155	1,582833333	$\bar{d}=0,03267$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00086800$		

Приложение № 5. Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без, культивируемых в течение 2 суток, разностным методом.

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (C) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом

Таблица 37

№	2 сутки	1 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,207	0,154	1,053	-0,05	0,00250000	0,06693695	16,478193
2	1,223	0,14	1,083	0,034	0,00115600		
3	1,222	0,135	1,087	-0,016	0,00025600		
4	1,25	0,117	1,133	0,03	0,00090000		
5	1,244	0,119	1,125	0,022	0,00048400		
6	1,241	0,104	1,137	0,034	0,00115600		
Ср.	1,231166667	0,128166667	$\bar{d}=1,103$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00645200$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом

Таблица 38

№	2 сутки	1 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,48	1,344	0,136	0,006	0,00003600	0,01697629	7,6577388

2	1,48	1,342	0,138	-0,005	0,00002500		
3	1,465	1,333	0,132	0,002	0,00000400		
4	1,479	1,366	0,113	-0,017	0,00028900		
5	1,477	1,341	0,136	0,006	0,00003600		
6	1,463	1,338	0,125	-0,005	0,00002500		
Ср.	1,474	1,344	$\bar{d}=0,13$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00041500$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом

Таблица 39

№	2 сутки	1 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,201	0,086	1,115	0,00383	0,00001469	0,00853235	130,22991
2	1,179	0,076	1,103	0,00083	0,00000069		
3	1,191	0,079	1,112	0,00083	0,00000069		
4	1,184	0,078	1,106	-0,0052	0,00002669		
5	1,183	0,064	1,119	0,00783	0,00006136		
6	1,191	0,079	1,112	0,00083	0,00000069		
Ср.	1,188166667	0,077	$\bar{d}=1,1117$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00010483$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом

Таблица 40

№	2 сутки	1 сутки	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,43	1,241	0,189	0,01583	0,00025069	0,02927559	5,915053
2	1,407	1,237	0,17	-0,0042	0,00001736		
3	1,425	1,231	0,194	0,02083	0,00043403		
4	1,418	1,253	0,165	-0,0082	0,00006669		
5	1,418	1,266	0,152	-0,0212	0,00044803		
6	1,421	1,252	0,169	-0,0042	0,00001736		
Ср.	1,419833333	1,246666667	$\bar{d}=0,17317$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00123417$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом на 1 сутки

Таблица 41

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (C) 6.2.1	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,344	0,154	1,19	-0,0258	0,00066736	0,04396574	27,65411
2	1,342	0,14	1,202	0,01817	0,00033003		
3	1,333	0,135	1,198	-0,0178	0,00031803		
4	1,366	0,117	1,249	0,03317	0,00110003		
5	1,341	0,119	1,222	0,00617	0,00003803		
6	1,338	0,104	1,234	0,01817	0,00033003		
Ср.	1,344	0,128166667	$\bar{d}=1,21583$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00278350$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера разностным методом на 2 сутки

Таблица 42

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (C) 6.2.1	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,48	1,207	0,273	0,03017	0,00091003	0,03787926	6,4107209
2	1,48	1,223	0,257	-0,0208	0,00043403		
3	1,465	1,222	0,243	0,00017	0,00000003		
4	1,479	1,25	0,229	-0,0138	0,00019136		
5	1,477	1,244	0,233	-0,0098	0,00009669		
6	1,463	1,241	0,222	-0,0208	0,00043403		
Ср.	1,474	1,231166667	$\bar{d}=0,24283$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00206617$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом на 1 сутки

Таблица 43

№	FZPM (F) 7.2.1 + лим. к-та	FZPM (C) 6.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,241	0,086	1,155	-0,0147	0,00021511	0,03357551	34,8369
2	1,237	0,076	1,161	0,00333	0,00001111		
3	1,231	0,079	1,152	-0,0177	0,00031211		
4	1,253	0,078	1,175	0,00533	0,00002844		
5	1,266	0,064	1,202	0,03233	0,00104544		

6	1,252	0,079	1,173	0,00333	0,00001111		
Ср.	1,246666667	0,077	$\bar{d}=1,16967$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00162333$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой разностным методом на 2 сутки

Таблица 44

№	FZPM (F) 7.2.1 + лим. к-та	FZPM (C) 6.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,43	1,201	0,229	-0,0027	0,00000711	0,00490653	47,215952
2	1,407	1,179	0,228	-0,0017	0,00000278		
3	1,425	1,191	0,234	0,00233	0,00000544		
4	1,418	1,184	0,234	0,00233	0,00000544		
5	1,418	1,183	0,235	0,00333	0,00001111		
6	1,421	1,191	0,23	-0,0017	0,00000278		
Ср.	1,419833333	1,188166667	$\bar{d}=0,23167$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00003467$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (C) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 1 сутки

Таблица 45

№	FZPM (C) 6.2.1	FZPM (C) 6.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	0,154	0,086	0,068	0,01683	0,00028336	0,03573468	1,4318489
2	0,14	0,076	0,064	-0,0262	0,00068469		

3	0,135	0,079	0,056	0,00483	0,00002336		
4	0,117	0,078	0,039	-0,0122	0,00014803		
5	0,119	0,064	0,055	0,00383	0,00001469		
6	0,104	0,079	0,025	-0,0262	0,00068469		
Ср.	0,128166667	0,077	$\bar{d}=0,05117$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00183883$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (С) 6.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 2 сутки

Таблица 46

№	FZPM (С) 6.2.1	FZPM (С) 6.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,207	1,201	0,006	-0,037	0,00136900	0,04136558	1,0395116
2	1,223	1,179	0,044	0,007	0,00004900		
3	1,222	1,191	0,031	-0,012	0,00014400		
4	1,25	1,184	0,066	0,023	0,00052900		
5	1,244	1,183	0,061	0,018	0,00032400		
6	1,241	1,191	0,05	0,007	0,00004900		
Ср.	1,231166667	1,188166667	$\bar{d}=0,043$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00246400$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 1 сутки

Таблица 47

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (F) 7.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,344	1,241	0,103	0,00567	0,00003211	0,0270673	3,5959746
2	1,342	1,237	0,105	-0,0113	0,00012844		
3	1,333	1,231	0,102	0,00467	0,00002178		
4	1,366	1,253	0,113	0,01567	0,00024544		
5	1,341	1,266	0,075	-0,0223	0,00049878		
6	1,338	1,252	0,086	-0,0113	0,00012844		
Ср.	1,344	1,246666667	$\bar{d}=0,09733$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00105500$		

Статистическая обработка показателей оптической плотности биомассы штаммов FZPM (F) 7.2.1 в жидкой питательной среде Ридера с лимонной кислотой и без разностным методом на 2 сутки

Таблица 48

№	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (F) 7.2.1 + лим. к-та	d	d- \bar{d}	(d- \bar{d}) ²	Sd	трасч
1	1,48	1,43	0,05	-0,0042	0,00001736	0,02014128	2,6893354
2	1,48	1,407	0,073	-0,0122	0,00014803		
3	1,465	1,425	0,04	-0,0142	0,00020069		
4	1,479	1,418	0,061	0,00683	0,00004669		
5	1,477	1,418	0,059	0,00483	0,00002336		
6	1,463	1,421	0,042	-0,0122	0,00014803		
Ср.	1,474	1,419833333	$\bar{d}=0,05417$	$\Sigma=0$	$\Sigma=0,00058417$		

Приложение №6. Исходные данные измерения оптической плотности биомассы культур без и с лимонной кислотой при длине волны 600 нм с течением времени ($t = 27 \text{ }^\circ\text{C}$)

Таблица 49

Сутки	Колба	Повторность	Контроль – питательная среда Ридера		Контроль – питательная среда Ридера с лимонной кислотой*	
			FZPM (C) 6.2.1	FZPM (F) 7.2.1	FZPM (C) 6.2.1 + $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	FZPM (F) 7.2.1 + $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
1	¹ А	1	0,208	1,349	0,060	1,246
		2	0,197	1,355	0,066	1,258
		3	0,197	1,357	0,058	1,260
	¹ Б	4	0,194	1,322	0,068	1,278
		5	0,131	1,311	0,077	1,277
		6	0,141	1,311	0,078	1,260
	Ср.		0,178	1,3342	0,068	1,2632
	² А	1	0,154	1,344	0,086	1,241
		2	0,140	1,342	0,076	1,237
		3	0,135	1,333	0,079	1,231
	² Б	4	0,117	1,366	0,078	1,253
		5	0,119	1,341	0,064	1,266
		6	0,104	1,338	0,079	1,252
	Ср.		0,128	1,344	0,077	1,2467

2	¹А	1	1,327	1,456	1,186	1,421
		2	1,297	1,490	1,178	1,423
		3	1,307	1,466	1,167	1,427
	¹Б	4	1,251	1,455	1,110	1,439
		5	1,275	1,469	1,098	1,436
		6	1,262	1,473	1,097	1,458
	Cp.		1,2865	1,4682	1,1393	1,434
	²А	1	1,207	1,480	1,201	1,430
		2	1,223	1,480	1,179	1,407
		3	1,222	1,465	1,191	1,425
	²Б	4	1,250	1,479	1,184	1,418
		5	1,244	1,477	1,183	1,418
		6	1,241	1,463	1,191	1,421
	Cp.		1,212	1,474	1,1882	1,4198
3	¹А	1	1,423	1,562	1,400	1,578
		2	1,400	1,571	1,410	1,558
		3	1,377	1,580	1,421	1,564
	¹Б	4	1,384	1,580	1,359	1,579
		5	1,419	1,579	1,375	1,582
		6	1,402	1,562	1,367	1,595
	Cp.		1,4008	1,5723	1,3887	1,576
4	¹А	1	1,513	1,614	1,501	1,596

		2	1,515	1,608	1,487	1,577
		3	1,517	1,615	1,500	1,588
	¹Б	4	1,483	1,600	1,444	1,573
		5	1,485	1,623	1,465	1,577
		6	1,502	1,633	1,469	1,586
	Ср.		1,5025	1,6155	1,4777	1,5828
¹μ		0,1787 ОП/сут	0,1467 ОП/сут	0,2995 ОП/сут	0,1731 ОП/сут	

Примечание:

«*» - различие оптической плотности среды Ридера с лимонной кислотой по сравнению со стандартной составляет -0,040 при длине волны 600 нм

«1» - колбы с биомассой для определения наличия каротиноидов на 4 сутки культивирования

«2» – колбы с биомассой для определения наличия каротиноидов на 2 сутки культивирования

«¹μ» - удельная скорость роста биомассы штаммов в течение 4 суток культивирования

Приложение № 7. Спектры ацетоновых экстрактов различных образцов сухой биомассы штаммов FZPM (С) 6.2.1 и FZPM (F) 7.2.1 на 2 и на 4 сутки



$$\lambda_{\max} = 460 \text{ A}_{\max} = 0,0819$$



$$\lambda_{\max} = 461 \text{ A}_{\max} = 0,0804$$



$$\lambda_{\max} = 461 \text{ A}_{\max} = 0,0792$$

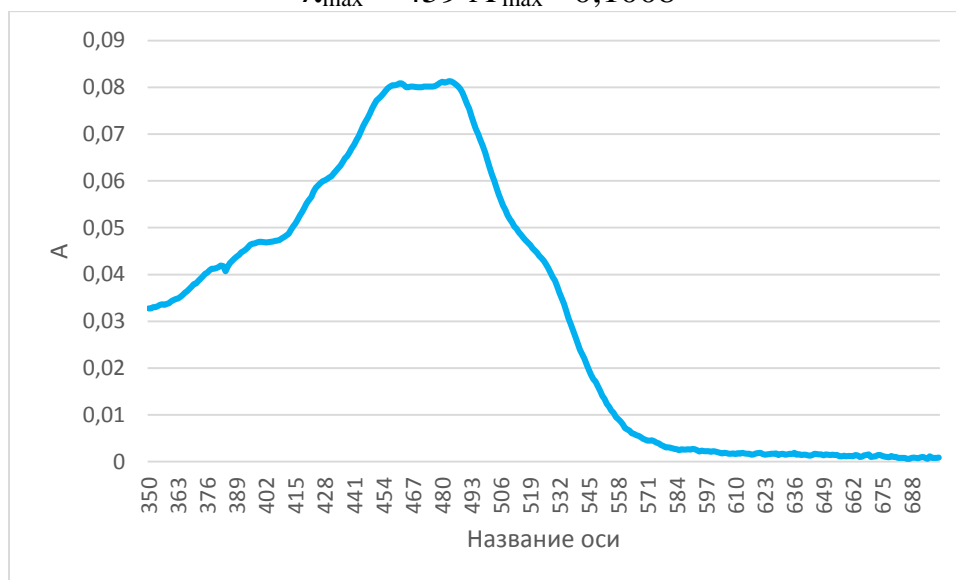
Рис. 52-54. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1, культивируемой в колбе ²А без лимонной кислоты в течение 2 суток в 3 параллелях.



$$\lambda_{\max} = 462 \text{ A}_{\max} = 0,0798$$



$$\lambda_{\max} = 459 \text{ A}_{\max} = 0,1008$$



$$\lambda_{\max} = 462 \text{ A}_{\max} = 0,0808$$

Рис. 55-57. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1, культивируемой в колбе $^2\text{Б}$ без лимонной кислоты в течение 2 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 460 \text{ A}_{\max} = 0,081$$



$$\lambda_{\max} = 457 \text{ A}_{\max} = 0,0734$$



$$\lambda_{\max} = 458 \text{ A}_{\max} = 0,0836$$

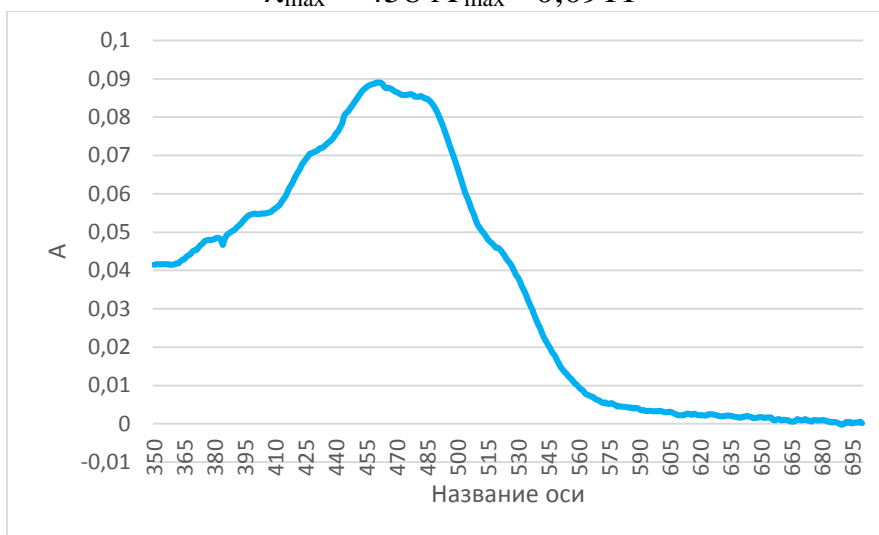
Рис. 58-60. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1, культивируемой в колбе ²А с лимонной кислотой в течение 2 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 460 \text{ A}_{\max} = 0,0872$$

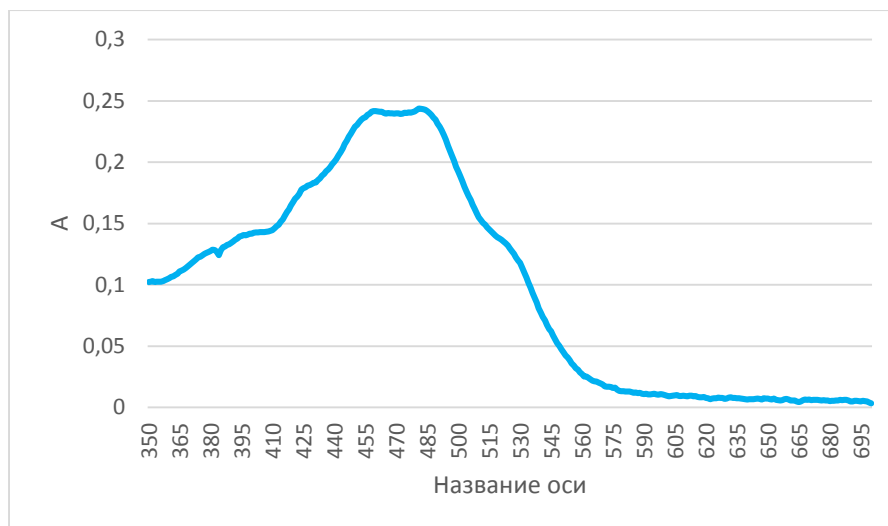


$$\lambda_{\max} = 458 \text{ A}_{\max} = 0,0911$$

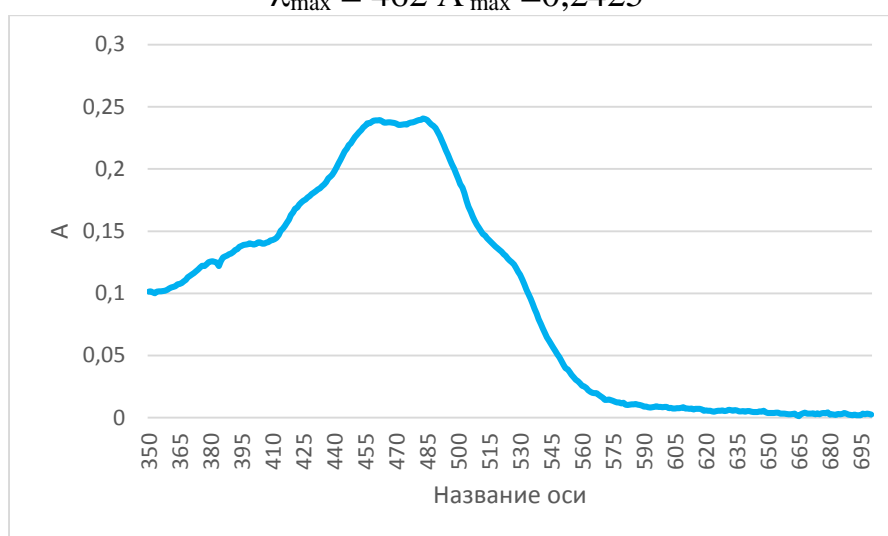


$$\lambda_{\max} = 462 \text{ A}_{\max} = 0,089$$

Рис. 61-63. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1, культивируемой в колбе ²Б с лимонной кислотой в течение 2 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 462 \text{ A}_{\max} = 0,2425$$

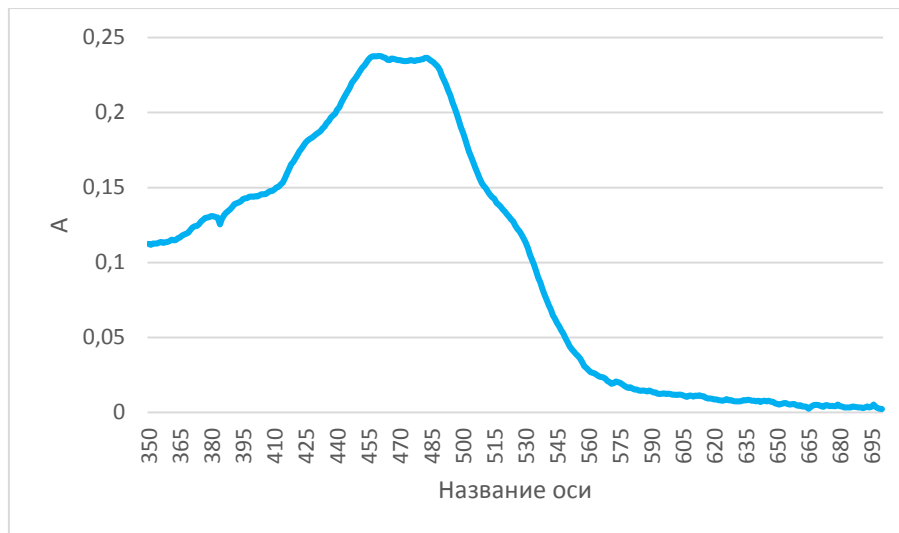


$$\lambda_{\max} = 462 \text{ A}_{\max} = 0,2393$$



$$\lambda_{\max} = 461 \text{ A}_{\max} = 0,2413$$

Рис. 64-66. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1, культивируемой в колбе А без лимонной кислоты в течение 4 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 460 \text{ A}_{\max} = 0,2378$$

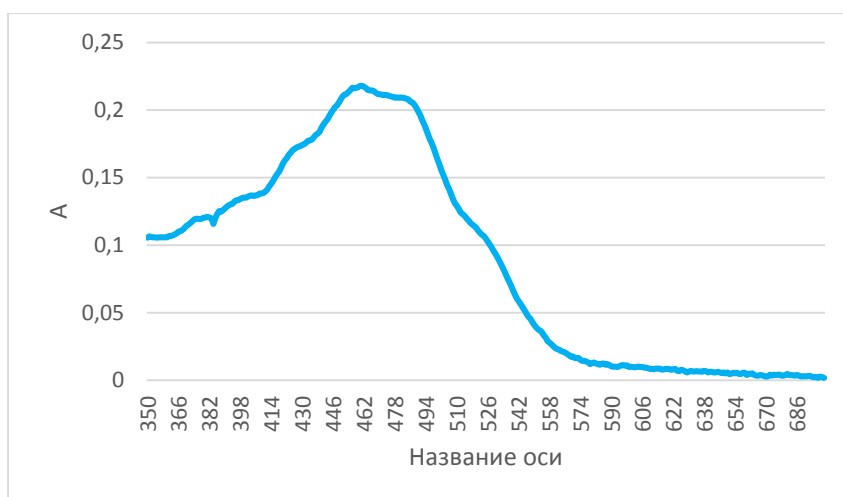


$$\lambda_{\max} = 461 \text{ A}_{\max} = 0,2412$$

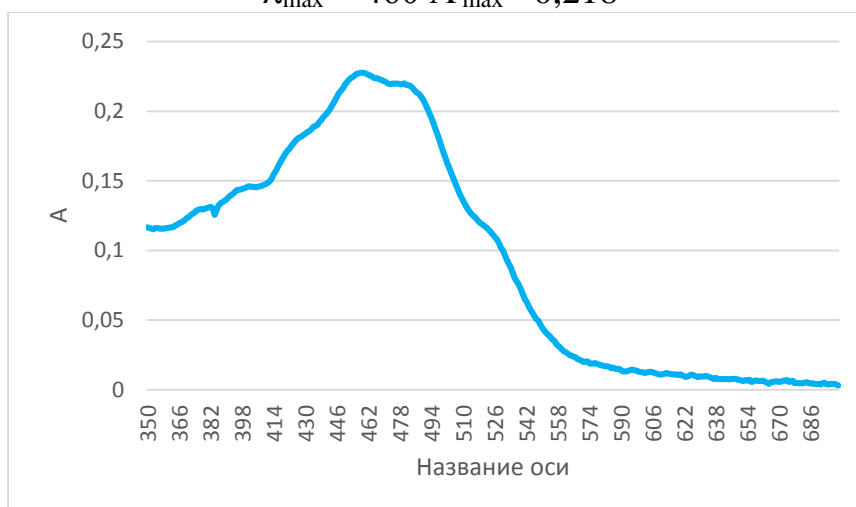


$$\lambda_{\max} = 460 \text{ A}_{\max} = 0,2456$$

Рис. 67-69. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1, культивируемой в колбе Б без лимонной кислоты в течение 4 суток в 3 повторностях



$$\lambda_{\max} = 460 \text{ A}_{\max} = 0,218$$

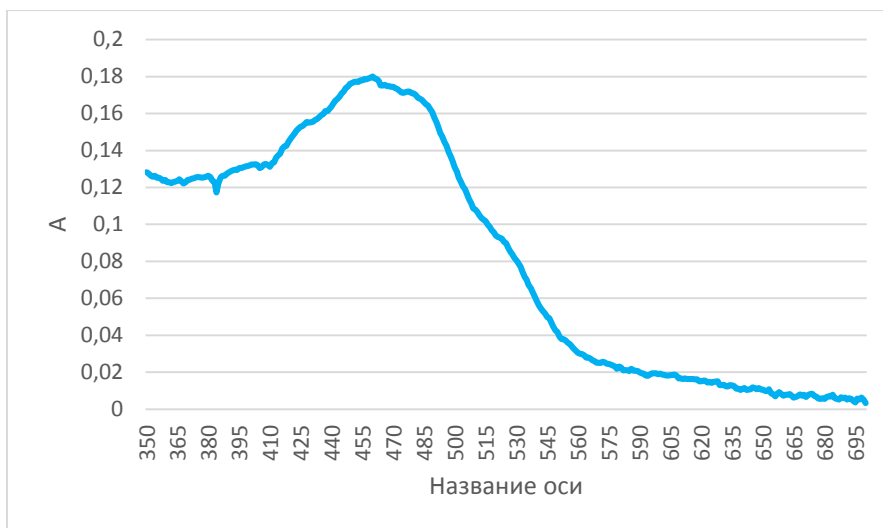


$$\lambda_{\max} = 458 \text{ A}_{\max} = 0,2277$$

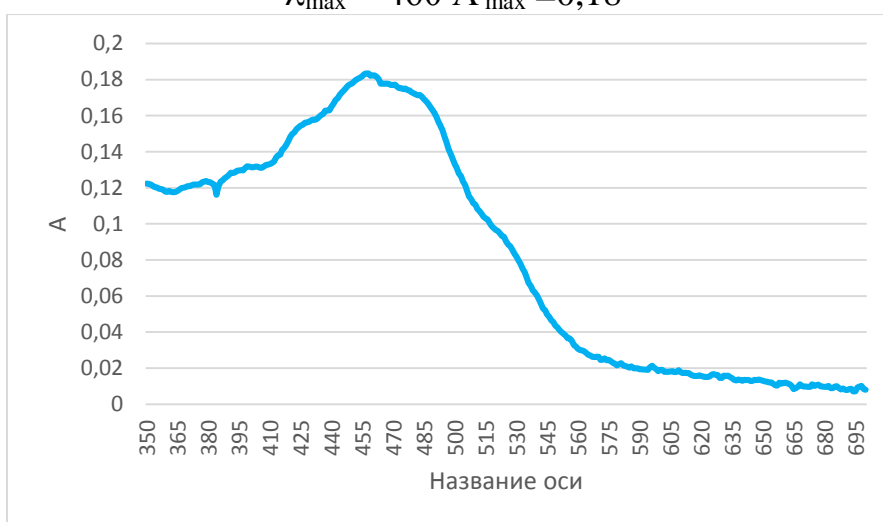


$$\lambda_{\max} = 462 \text{ A}_{\max} = 0,2226$$

Рис. 70-72. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1, культивируемой в колбе А с лимонной кислотой в течение 4 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 460 \text{ A}_{\max} = 0,18$$



$$\lambda_{\max} = 457 \text{ A}_{\max} = 0,1834$$



$$\lambda_{\max} = 458 \text{ A}_{\max} = 0,1858$$

Рис. 73-75. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (С) 6.2.1, культивируемой в колбе Б с лимонной кислотой в течение 4 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 425 \text{ A}_{\max} = 0,0614$$



$$\lambda_{\max} = 425 \text{ A}_{\max} = 0,0765$$



$$\lambda_{\max} = 425 \text{ A}_{\max} = 0,0711$$

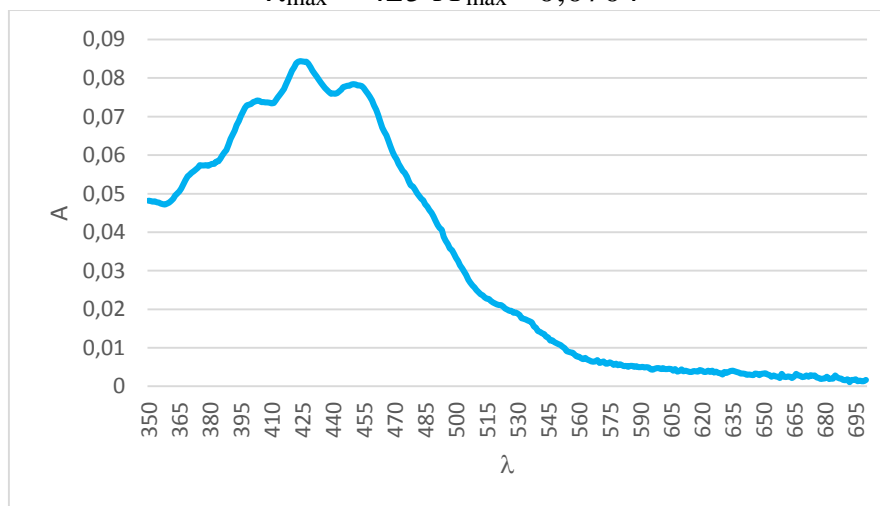
Рис. 76-78. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1, культивируемой в колбе 2A без лимонной кислоты в течение 2 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 424 \text{ A}_{\max} = 0,0882$$

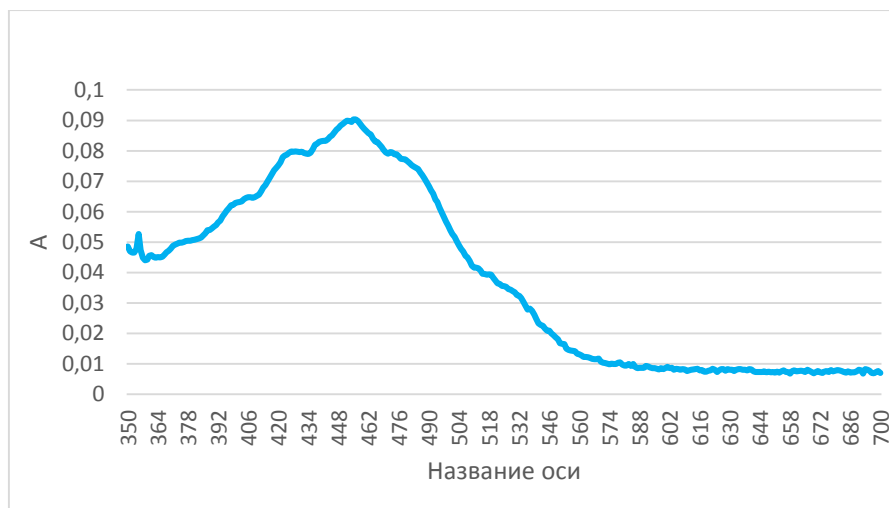


$$\lambda_{\max} = 425 \text{ A}_{\max} = 0,0704$$



$$\lambda_{\max} = 424 \text{ A}_{\max} = 0,0844$$

Рис. 79-81. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1, культивируемой в колбе ²Б без лимонной кислоты в течение 2 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 455 \text{ A}_{\max} = 0,0903$$



$$\lambda_{\max} = 453 \text{ A}_{\max} = 0,0853$$



$$\lambda_{\max} = 455 \text{ A}_{\max} = 0,1002$$

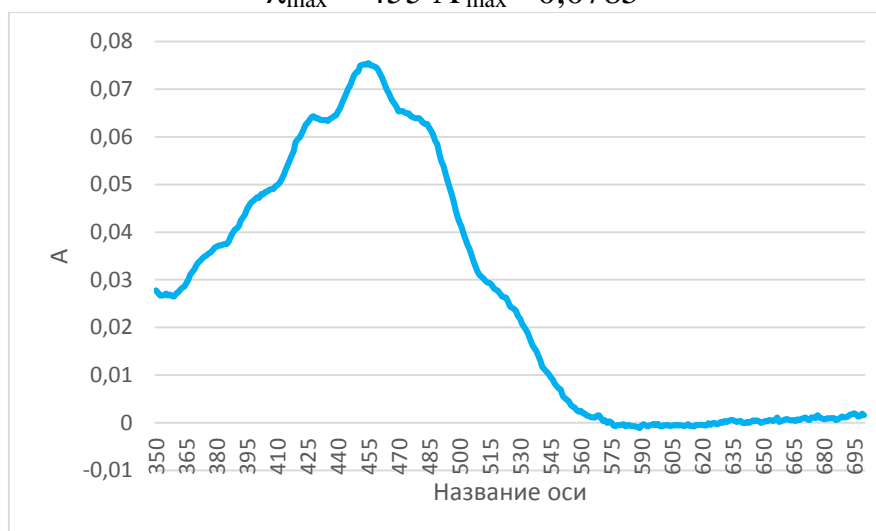
Рис. 82-84. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1, культивируемой в колбе ^2A с лимонной кислотой в течение 2 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 451 \text{ A}_{\max} = 0,0742$$

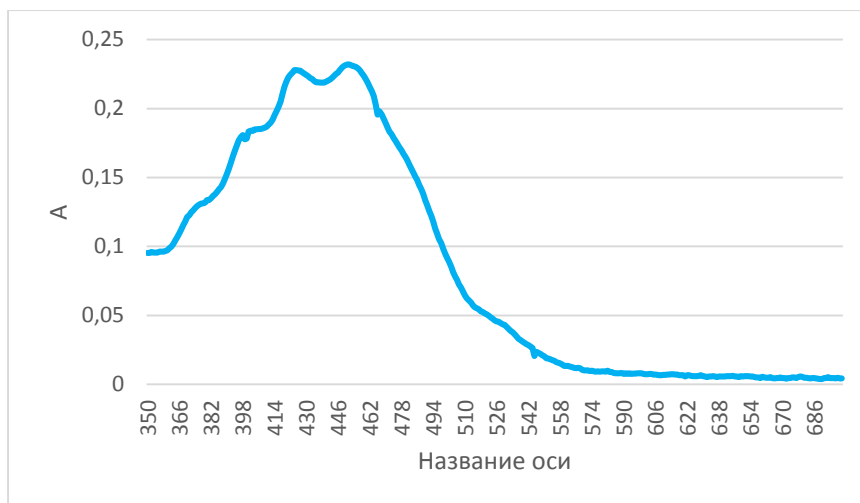


$$\lambda_{\max} = 455 \text{ A}_{\max} = 0,0785$$

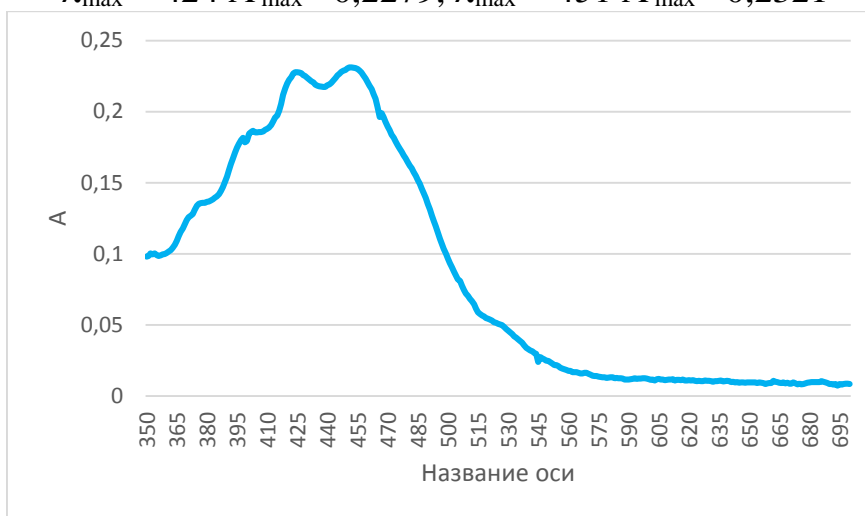


$$\lambda_{\max} = 455 \text{ A}_{\max} = 0,0755$$

Рис. 85-87. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1, культивируемой в колбе $^2\text{Б}$ с лимонной кислотой в течение 2 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 424 \text{ A}_{\max} = 0,2279, \lambda_{\max} = 451 \text{ A}_{\max} = 0,2321$$



$$\lambda_{\max} = 424 \text{ A}_{\max} = 0,2277, \lambda_{\max} = 451 \text{ A}_{\max} = 0,2312$$

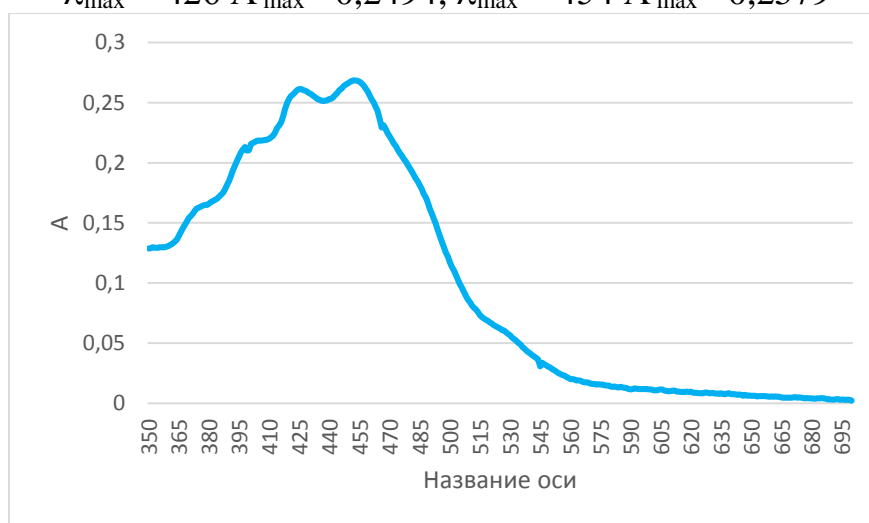


$$\lambda_{\max} = 425 \text{ A}_{\max} = 0,2385, \lambda_{\max} = 452 \text{ A}_{\max} = 0,2415$$

Рис. 88-90. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1, культивируемой в колбе А без лимонной кислоты в течение 4 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 426 \text{ A}_{\max} = 0,2494, \lambda_{\max} = 454 \text{ A}_{\max} = 0,2579$$



$$\lambda_{\max} = 425 \text{ A}_{\max} = 0,2613, \lambda_{\max} = 452 \text{ A}_{\max} = 0,2685$$



$$\lambda_{\max} = 425 \text{ A}_{\max} = 0,2416, \lambda_{\max} = 452 \text{ A}_{\max} = 0,2501$$

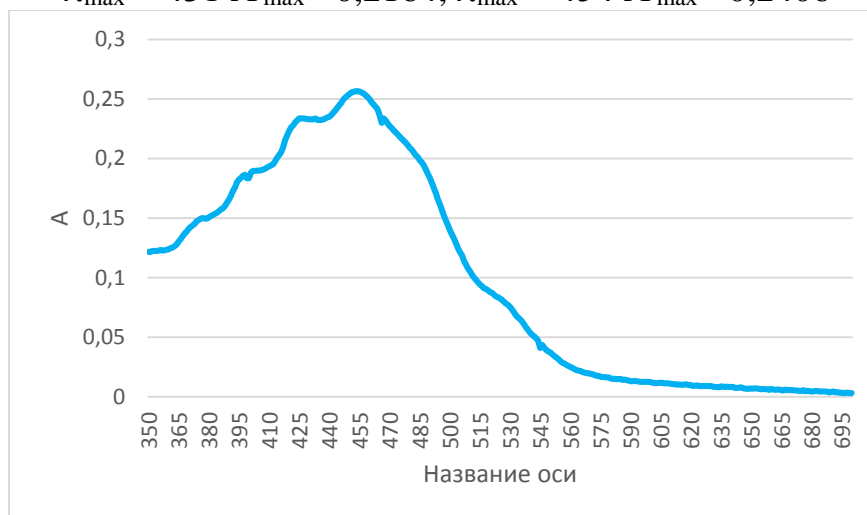
Рис. 91-93. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1, культивируемой в колбе Б без лимонной кислоты в течение 4 суток в 3 параллелях



$$\lambda_{\max} = 429 \text{ A}_{\max} = 0,227, \lambda_{\max} = 454 \text{ A}_{\max} = 0,2501$$

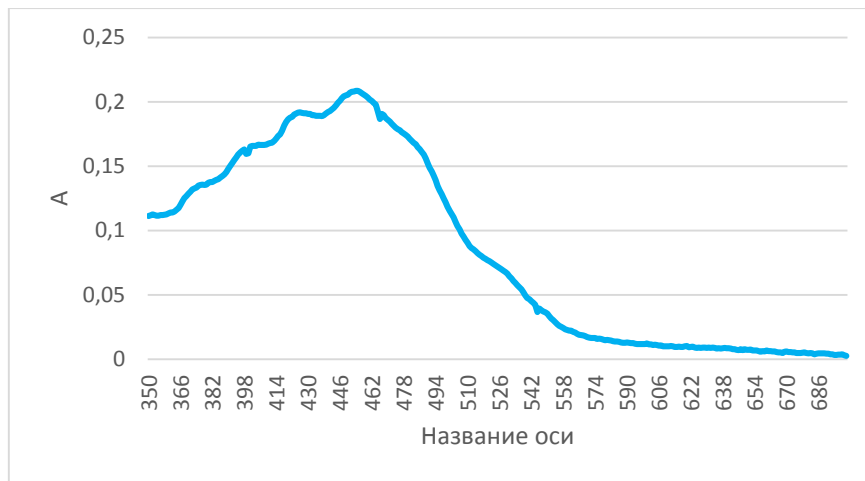


$$\lambda_{\max} = 431 \text{ A}_{\max} = 0,2164, \lambda_{\max} = 454 \text{ A}_{\max} = 0,2406$$



$$\lambda_{\max} = 426 \text{ A}_{\max} = 0,2338, \lambda_{\max} = 454 \text{ A}_{\max} = 0,2467$$

Рис. 94-96. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1, культивируемой в колбе А с лимонной кислоты в течение 4 суток в 3 параллелях



$\lambda_{\max} = 426 \text{ A}_{\max} = 0,1919; \lambda_{\max} = 455 \text{ A}_{\max} = 0,2086; 467 = 0,1908$



$\lambda_{\max} = 426 \text{ A}_{\max} = 0,1919; \lambda_{\max} = 455 \text{ A}_{\max} = 0,2086; \lambda_{\max} = 467 \text{ A}_{\max} = 0,1908$



$\lambda_{\max} = 425 \text{ A}_{\max} = 0,1745; \lambda_{\max} = 454 \text{ A}_{\max} = 0,1932; \lambda_{\max} = 467 \text{ A}_{\max} = 0,1758$
 Рис. 97-99. Спектры ацетоновых экстрактов сухой биомассы штамма FZPM (F) 7.2.1, культивируемой в колбе Б с лимонной кислоты в течение 4 суток в 3 параллелях

Приложение №8. Оптическая плотность и концентрация каротиноидов в пересчете на β -каротин сухих биомасс культивируемых штаммов (экстракт 25 мл, без разведений)

Таблица 50

Сутки	Штамм	Колба/сухая биомасса	Оптическая плотность		Концентрация каротиноидов, мкг/г с.б.	
			Ср.	σ	Ср.	σ
2	FZPM (C) 6.2.1	A/ m=0,4267	0,0805	0,0011	18,1517	0,2491
		Б/ m=0,4389	0,0871	0,0098	19,1012	2,1204
		A + лим. к-та/ m=0,4332	0,0793	0,0043	17,6202	0,9612
		Б + лим. к-та/ m=0,4585	0,0891	0,0016	18,6974	0,3344
	FZPM (F) 7.2.1	A/ m=0,6335	0,0697	0,0062	10,5809	0,9489
		Б/ m=0,4980	0,0810	0,0077	15,6494	1,4788
		A + лим. к-та/ m=0,4657	0,0919	0,0062	18,9937	1,2792
		Б + лим. к-та/ m=0,4886	0,0761	0,0018	14,9790	0,3546
4	FZPM (C) 6.2.1	A/ m=1,0367	0,2410	0,0013	22,3701	0,1225
		Б/ m=1,0422	0,2415	0,0032	22,2982	0,2948
		A + лим. к-та/ m=1,0287	0,2228	0,0040	20,8355	0,3705
		Б + лим. к-та/ m=1,0031	0,1831	0,0024	17,5593	0,1168
	FZPM (F) 7.2.1	A/ m=1,1952	0,2349	0,0047	18,9124	0,3427
		Б/ m=1,1970	0,2588	0,0075	20,8051	0,6041
		A + лим. к-та/ m=1,0545	0,2458	0,0039	22,4274	0,2453
		Б + лим. к-та/ m=1,0253	0,2035	0,0073	19,0935	0,6812