

УДК 606:620.3

DOI: 10.31040/2222-8349-2023-0-3-18-26

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА СВОЙСТВА ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA TROPICALIS* ПРИ УТИЛИЗАЦИИ СПИРТОВОЙ БАРДЫ

© Н.С. Евдокимов, А.А. Каленчук, В.В. Даньшина, Е.А. Рогачев

Для предотвращения загрязнения окружающей среды отходами спиртзаводов, предприятия обязаны осуществлять полную переработку барды и/или утилизировать ее на очистных сооружениях, но полностью утилизировать спиртовую барду не удается из-за отсутствия необходимых штаммов микроорганизмов. Поэтому в переработке спиртовой барды особую актуальность приобретает выбор штамма микроорганизмов с достаточной биологической активностью. Впервые для переработки спиртовой барды применили биотехнологическую утилизацию штаммом дрожжей *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883. Активность дрожжей повышали двумя внешними факторами: физическим (УФ-излучение) и химическим (19-микозаминилнистатинолид) воздействием. Установлена рациональная концентрация 19-микозаминилнистатинолида (500 Е) при которой колонии *Candida tropicalis* достигали максимального размера. Эффективность утилизации барды оценивали по накоплению аминного азота в водном растворе после гидролиза барды, количество которого определялось методом формольного титрования.

Инокулят дрожжей, полученный после воздействия на них внешних факторов, вносили в питательную среду на основе барды, проводили аэробную обработку в течение 72 ч.

Морфологические свойства клеток и их количество контролировали методами оптической и атомно-силовой микроскопии, результаты которых согласуются между собой и с биологической активностью дрожжей. Наибольшие изменения морфологии поверхности клеток отмечаются после химического воздействия: по сравнению с исходным образцом средняя высота клеток увеличилась на 0.24 мкм, а площадь поверхности возросла в 1.25 раз.

Показано увеличение степени утилизации спиртовой барды дрожжами в ряду «штамм *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883 без обработки → штамм, обработанный УФ → штамм, обработанный антибиотиком»: показатели биологической активности увеличились на 4.3% (доли клеток, насыщенных гликогеном) и на 6.67% (содержание аминного азота); выход биомассы увеличился на 1.7%. Приращения показателей рассчитаны при переходе от исходного образца к обработанному антибиотиком.

Оценка экологической опасности образцов барды проведена с помощью биотестирования. Показано, что эффективность утилизации барды возрастает после ее обработки дрожжами, на которые предварительно воздействовали УФ-излучением и антибиотиком. Эти образцы характеризовались наибольшей всхожестью семян относительно барды, не обработанной дрожжами.

Ключевые слова: *Candida tropicalis*, утилизация спиртовой барды, активность дрожжей: физическое и химическое воздействие, выход биомассы, гликоген, аминный азот, атомно-силовая микроскопия, морфология клеток, биотестирование.

Введение. Спиртовая барда является жидким крупнотоннажным технологическим отходом в производстве этилового спирта из растительного сырья: зерна, кукурузы, картофеля, свекловичной или тростниковой мелассы.

Значительное количество образующейся барды, порядка 13 т на 1 т вырабатываемого спирта, заставляет производителей спирта тщательно выбирать технологию ее переработки, т.к. законодательно исключена возможность слива

ЕВДОКИМОВ Никита Сергеевич – к.т.н., Омский государственный технический университет, e-mail: ens17@mail.ru

КАЛЕНЧУК Анастасия Александровна, Омский государственный технический университет, e-mail: sia.k98@mail.ru

ДАНЫШИНА Валентина Владимировна – к.х.н., Омский государственный технический университет, e-mail: danshina_v@mail.ru

РОГАЧЕВ Евгений Анатольевич – к.т.н., Омский государственный технический университет, e-mail: Evg-rogachev@yandex.ru

барды на поля фильтрации [1]. В состав спиртовой барды входят следующие основные компоненты: сухие вещества – 6.7–8.3%, в т.ч. сырого протеина – 1.8–2.4, клетчатки 0.8–1.7, золы 0.6–0.8, безазотистых экстрактивных веществ 3.4–4.0%, которые увеличивают нагрузку на очистные сооружения.

Главным и единственным источником загрязнения компонентами спиртовой барды в Омской области является спиртовой завод ООО «Ликероводочный завод «Оша», построенный в 1995 г. Предприятие выпускает высококачественный спирт с улучшенными органолептическими свойствами. В качестве сырья используется пшеница. Построенный в 2011 г. цех по переработке послеспиртовой барды позволил перерабатывать основные отходы производства этилового спирта и использовать сухую барду в качестве ценной кормовой добавки в рацион птиц и животных, выращиваемых в продовольственной корпорации «Оша». При этом переработка барды на предприятии ограничивалась энергоемкими процессами сгущения и сушки.

Одним из приемлемых вариантов переработки спиртовой барды является ее биотехнологическая утилизация дрожжами. Получаемая в результате такого процесса вторичная барда менее опасна с экологической точки зрения, так как значение ее биологического потребления кислорода (БПК) значительно снижается по сравнению с исходной бардой [2], а биомасса микроорганизмов-утилизаторов может использоваться в качестве белкового компонента кормов для животных. В мировой практике отсутствуют стандартизованные штаммы микроорганизмов по переработке барды, поэтому исследования проводятся с разными микроорганизмами. Степень ассимиляции твердых веществ барды при ее биотехнологической переработке зависит от вида и активности биологических агентов, применяемых для утилизации [3, 4]. Биологические агенты, в том числе дрожжи, способные к утилизации компонентов барды могут проявлять недостаточную биологическую активность [5, 6].

Активность производственных штаммов дрожжей может быть повышена различными способами: редактированием генома на основе CRISPR/Cas9 [7], регулированием активности ферментативных систем, химической обработкой [8-10], физической обработкой, например, акустическим воздействием [11], осмотическим стрессом [12–14].

Зарегистрировать морфологические изменения поверхностных структур клетки после воздействия различных факторов окружающей среды позволяет атомно-силовая микроскопия, наравне с оптической [15].

Таким образом, цель настоящего исследования – оценить влияние внешних факторов: физического (УФ-излучение) и химического (19-микозаминилнистатинолид) воздействия на эффективность аэробной утилизации спиртовой барды дрожжами *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883.

Материал и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали исходный штамм кормовых дрожжей *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883 из коллекции микроорганизмов МГУ, выделенный из плодов анноны во Вьетнаме, Национальный парк Кат Тиен и образцы спиртовой барды ООО «Ликероводочный завод «Оша» следующего состава: сухие вещества – 6.8%, в т.ч. сырого протеина – 1.8, клетчатки – 0.9, золы – 0.7%; аммонийного азота 1050 мг/л.

Выбранный штамм пригоден к использованию в биотехнологическом производстве в качестве продуцента белковой биомассы.

Культивирование штамма *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883 осуществляли на среде № 2 ГРМ Сабуро по ТУ 9398-002-78095326-2006 при 30°C (термостат суховоздушный ТС-1/80, Россия) в течение 72 ч. Проводили количественный учет колоний и их размер.

Накопительную культуру штамма *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883 получали смывом с питательной среды Сабуро стерильным физиологическим раствором. На подготовленную накопительную культуру дрожжей воздействовали двумя факторами: физическим (УФ-излучение) и химическим. В качестве химического агента был выбран 19-микозаминилнистатинолид, относящийся к антибиотикам полиеновой группы, продуцируемым актиномицетом *Streptomyces noursei*, оказывающий фунгистатическое действие на дрожжи [16]. Антибиотик вводили в расплавленную охлажденную до 45°C питательную среду непосредственно перед проведением посева в дозировке 100, 250, 500 и 1000 единиц активности. Посев проводили методом истощающего штриха.

Подсчет количества выросших клеток дрожжей и определение морфологических ха-

рактистических проводили спустя 72 ч от начала термостатирования при 30°C.

Активированные дрожжи второго поколения получали аналогично получению клеток первого поколения: обработкой активированных клеток первого поколения 19-микозаминилнистатинолидом, дозировкой в 500 единиц активности. При повышении дозировки антибиотического препарата, отмечено увеличение размеров клеток с одновременным уменьшением их количества.

Обработку поверхности посевов дрожжей ультрафиолетовым (УФ) облучением (облучатель ультрафиолетовый ОУФд-01, Россия) проводили при длине волны 280 нм в течение 7, 10 и 13 мин для установления 6%-й выживаемости [17]. Учет результатов проводили через 72 ч после термостатирования при 30°C. Для повторного активирования УФ-излучением были выбраны колонии максимального размера.

Активированные дрожжи второго поколения получали выдерживанием при ультрафиолетовом облучении в течение 10 мин. Время экспозиции было установлено во время первой обработки.

Концентрацию клеток дрожжей определяли в счетной камере Горяева с предварительным приготовлением серийных разведений суспензии в физиологическом растворе при увеличении $\times 400$.

Количество гликогена, мертвых и почкующихся дрожжевых клеток определяли на световом оптическом микроскопе (МИКМЕД-5, Россия) при увеличении $\times 400$.

Определение гликогена проводили по методике [18], основанной на окрашивании клеток раствором Люголя. Определение количества мертвых клеток осуществляли по методике, основанной на окрашивании дрожжей метиленовой синью [18, 19].

Морфологические свойства клеток дрожжей контрольных и опытных образцов исследовали полуконтактным методом атомно-силовой микроскопии (микроскоп NTEGRA Prima, HT-МДТ, Россия) с кремниевым кантилевером NSG10 серии GOLDEN. Возможности метода СЗМ АСМ в отношении исследования биологических образцов подробно показаны в [20–23]. Пробоподготовка осуществлялась нанесением суспензии препарата микробиологической петлей на предметное стекло и высушиванием с использованием спиртовки. Анализ проводился при влажности воздуха 67%, температуре 24°C.

После получения изображений поверхности клеток данные были обработаны с помощью пакета прикладных программ «Gwyddion» (Чешская Республика). Данная обработка дала возможность определить размеры клеток дрожжей и их форму.

В контрольных и в опытных экспериментах по влиянию внешних факторов на способность дрожжей к утилизации барды использовали суспензии исходных и активированных дрожжей с концентрацией клеток $2.3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

Для утилизации барды была приготовлена питательная среда на основе фугата (массовая доля 89.5%) спиртовой барды и пивной дробины (массовая доля 6%).

Питательную среду в колбах Эрленмейера стерилизовали в автоклаве (WACS-2080, Южная Корея) в течение 15 мин при температуре 120°C. К утилизируемому объему среды 100 мл добавляли по 5 мл дрожжевой суспензии. Биотехнологическую утилизацию проводили в термостатируемом шейкере (STUART SI 505, UK) с частотой вращения 180 об/мин в течение 72 ч при температуре 30°C.

В барде после культивирования дрожжей определяли комплекс биохимических и физико-химических показателей (содержание аминного азота, сухих веществ, массы осадка) а также микробиологических показателей и показателей биологической активности клеток (определение количества мертвых, почкующихся и насыщенных гликогеном клеток).

Определение аминного азота проводили методом формольного титрования по ОФС.1.2.3.0022.15 [24].

Определение содержания сухих веществ осадка осуществляли гравиметрическим методом на универсальном анализаторе влажности (МВ-35, Швейцария).

Центрифугирование суспензии утилизированной барды с получением фугата (вторичной барды) и осадка проводили на лабораторной центрифуге (ELMI CM-6MT, Латвия) в течение 2,5 минут при частоте вращения ротора 3500 об/мин.

Выход биомассы дрожжей определяли по массе накопленного в утилизируемой барде осадка. Определение массы проводили гравиметрическим способом на аналитических весах («Ohaus Adventurer AX 124 E», Южная Корея).

Оценка экологической безопасности барды проведена с помощью биотестирования [25] посредством оценки показателей прорастивания

семян *Raphanus sativus*. В почву, на которой проращивали семена *Raphanus sativus*, вносили образцы барды: контрольный, обработанный исходными дрожжами и активированными (физически, химически).

Статистическую обработку результатов исследования морфологических показателей проводили с помощью пакета прикладных программ «Gwyddion». Полученные данные представлены в виде средних арифметических с 95% надежностью.

Результаты исследования. В данном исследовании активность дрожжей изменялась под воздействием физических (УФ-излучение) и химических (19-микозаминилнистатинолид) факторов. Антибиотик применялся в концентрации 500 Е, т.к. именно при этой концентрации колонии достигали максимального размера (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Сравнительная характеристика колоний *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883, обработанных 19-микозаминилнистатинолидом в различных концентрациях

Концентрация антибиотика, Е	Размер колоний, мм	Количество колоний, шт.
100	(0.5–3)±0.27	250±6
250	(1–4)±0.26	220±4
500	(1–5)±0.25	195±3
1000	(0.5–1.5)±0.31	180±5

Особенность воздействия внешних факторов на морфологию поверхности клеток контролировалась и визуализировалась с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). На рис. 1 представлена топография поверхности клеток.

Поверхность исходного образца представляет собой слипшиеся клетки овальной формы, имеет явные перепады высот, что выражено градацией цветовой насыщенности изображения поверхности образца. Визуально проведен анализ целостности клеток. К целым клеткам (ЦК) отнесены такие, на которых повреждений не видно, поверхность клеток округлая, гладкая, ровная. Клетки, на поверхности которых видны любые отклонения от гладкой поверхности: впадины, рубцы, выступы, шероховатости отнесены к деформированным клеткам (ДК).

После воздействия визуально клетки имеют эллипсоидную форму, значительно большее количество деформаций, чем в исходном образце. Морфометрические характеристики клеток (табл. 2) измерялись построением продольного и поперечного профиля сечения поверхности в программе «Gwyddion».

Выявлена одинаковая закономерность изменения количества деформированных клеток, определенная по изображениям АСМ, и количества мертвых клеток (рис. 2), рассчитанных по результатам оптической светлопольной микроскопии (табл. 2): наибольшая деформация клеток при физическом воздействии.

На рис. 2 для примера представлена микроскопическая картина суспензии клеток дрожжей, по которой проводился подсчет мертвых (а) и почкующихся (б) клеток.

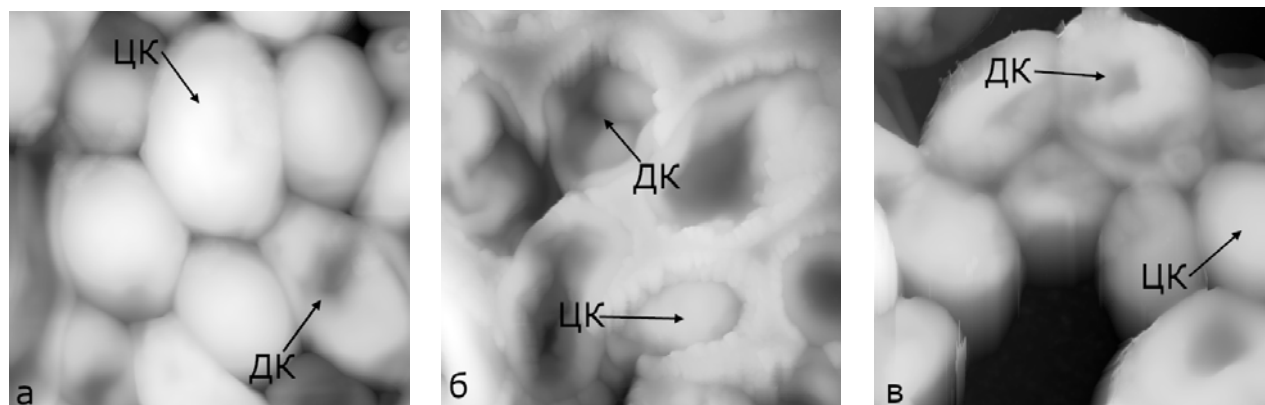


Рис. 1. АСМ – изображение поверхности дрожжей *Candida tropicalis* АП-31- КБП У-4883 (10×10 мкм): а – исходный образец (необработанные дрожжи), б – после физического воздействия, в – после химического воздействия. Условные обозначения: ЦК – целая клетка, ДК – деформированная клетка

Основные параметры клеток *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883 до и после воздействия

Параметры клеток	Исходный образец	После физического воздействия	После химического воздействия
Количество деформированных клеток (АЗМ), %	27.1±2.1	71.4±3.1	63.0±3.8
Количество мертвых клеток (МИКМЕД-5), %	1.3±0.2	2.3±0.2	1.7±0.3
Средний диаметр клеток, мкм	4.07±0.63	3.83±0.82	3.90±0.51
Средняя высота клеток, мкм	1.20±0.12	1.26±0.09	1.44±0.28
Площадь поверхности, мкм ²	121.60±0.15	124.30±0.11	153.00±0.09

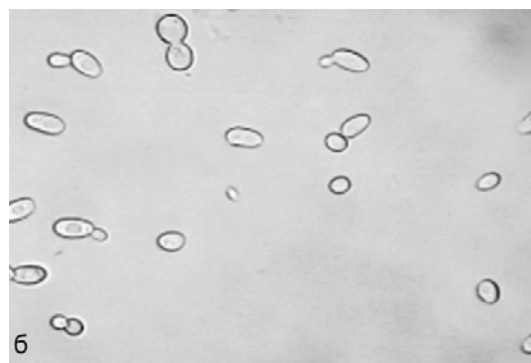
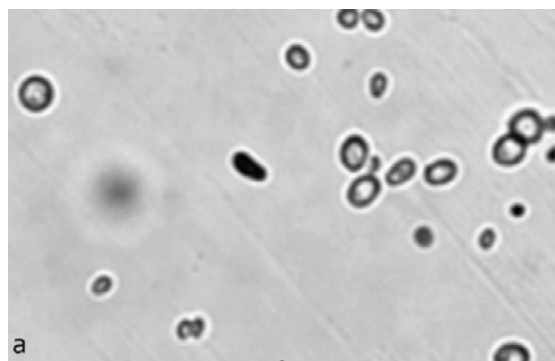


Рис. 2. Микроскопическое изображение дрожжей после воздействия физическим фактором (увеличение ×400): а – при подсчете мертвых клеток, б – при подсчете почкующихся клеток

Показатели биологической активности и выхода биомассы дрожжей *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883 до начала и по окончании утилизации барды

Показатели		Исходный образец	После физического воздействия	После химического воздействия
Показатели биологической активности:	1. Количество клеток, содержащих гликоген, %	91.2±0.5	93.4±0.7	95.5±0.5
	2. Содержание аминного азота в гидролизате барды по окончании утилизации дрожжами, мд	1050±5	910±7	1120±4
Выход биомассы дрожжей, %		2.6±0.1	2.9±0.1	4.3±0.1

Показатели количества клеток дрожжей с гликогеном и выход биомассы дрожжей являются технологическими параметрами процесса утилизации барды.

По результатам утилизации активированными и не активированными дрожжами питательной среды на основе барды установлено (табл. 3), что в ряду *Candida tropicalis* исходные → *Candida tropicalis*, обработанные УФ → *Candida tropicalis*, обработанные антибиотиком наблюдается увеличение выхода биомассы на 1.7%; доли клеток, насыщенных гликогеном –

на 4.3%, при переходе от исходных к обработанным антибиотиком.

При этом наибольшее количество аминного азота, представленного азотом свободных аминокислот и пептидов, также отмечено в биомассе дрожжей, активированных антибиотическим препаратом, хотя оно увеличивается в другой последовательности: *Candida tropicalis* обработанные УФ → *Candida tropicalis* исходные → *Candida tropicalis* обработанные антибиотиком.

Воздействие антибиотиком, таким образом, видимо, способствовало регуляторным и трофическим перестройкам систем метаболизма азотсодержащих компонентов клеток дрожжей и накоплению аминного азота с одновременным увеличением выхода биомассы. Биологическая активность дрожжей после химического воздействия увеличилась по сравнению с контролем. Накопление аминного азота дрожжами после химической обработки увеличилось на 6.67%, а после физической – уменьшилось на 13.3%. Содержание аминного азота, при неизменных прочих условиях коррелирует с содержанием в клетках белка, что согласуется с [26]. Повышение аминного азота, а следовательно, и белка в клетках дрожжей имеет практическое значение, поскольку позволяет улучшить качество белковых компонентов кормов для животных. Степень извлечения азотистых веществ из барды в случае ее обработки химически обработанными дрожжами будет максимальна, что в наибольшей степени удовлетворяет требованиям, предъявляемым к процессу аэробной утилизации барды [27].

Как видно из табл. 2, наибольшее влияние на основные морфологические характеристики клеток (высота и площадь поверхности) дрожжей оказало химическое воздействие и те же дрожжи накопили большее количество гликогена и биомассы в процессе утилизации барды (табл. 3). Таким образом, выявлено, что биологическая активность клеток связана с морфологией их поверхности. Аналогичная зависимость была отмечена в [28].

Метод АСМ позволил проанализировать состояние клеток в достаточно короткие сроки: 1–2 часа, что гораздо быстрее по сравнению с прямыми микробиологическими методами, минимальное время исследования в которых составляет не меньше двух суток [29]. Таким образом, целесообразно рекомендовать метод АСМ в качестве способа для оценки жизнеспособности микроорганизмов, в том числе дрожжей и состояния популяций микробных культур.

Гликоген, наряду с триацилглицерином, является одним из двух важнейших запасных метаболитов для эукариотов. Активность гликогенсинтазы может проявляться у дрожжей уже в экспоненциальной фазе роста и может усиливаться с наступлением стационарной фазы, а количество накопленного популяцией клеток гликогена оказывает сильное положительное влияние на их жизнеспособность в стационарной фазе [30].

Таким образом, увеличение количества накапливаемого в клетке дрожжей гликогена напрямую связано с улучшением физиологического состояния данной микробной клетки. Совокупность состояний клеток характеризует совокупное состояние популяции клеток. Следовательно, наблюдаемое при внешнем воздействии увеличение количества клеток, содержащих гликоген, указывает на положительное влияние антибиотика на жизнеспособность популяции дрожжей, что хорошо согласуется с данными [31]. Внешние воздействия вызывают у дрожжей рода *Candida* сильный стресс, на который они реагируют накоплением гликогена. Больше гликогена накапливалось в клетках дрожжей, подвергнутых химическому воздействию, как и в [32], что показывает их ответ на сильный стресс. Такие дрожжи являются более приспособленными к выживанию в условиях утилизации барды, т.е. более биологически активными и, поэтому количество клеток, содержащих гликоген, рассматривается как показатель биологической активности дрожжей после воздействия внешних факторов.

Доля клеток, насыщенных гликогеном в исходном образце дрожжей без обработки была меньше на 2%, по сравнению с воздействием физического фактора и на 4% по сравнению с воздействием химического фактора (табл. 3). Таким образом, воздействие внешних факторов позволяет улучшить биологическую активность дрожжевых клеток.

Количество биомассы, образующейся в результате роста микроорганизмов при ассимиляции питательных веществ субстрата, напрямую зависит от степени утилизации питательных веществ данного субстрата. При этом, чем более биологически активны дрожжи-утилизаторы, тем выше степень ассимиляции ими питательных веществ и тем большее количество биомассы ими образуется [33]. В данной работе наблюдалось увеличение выхода биомассы всех обработанных образцов дрожжей по сравнению с контрольным образцом за счет усиленной ассимиляции компонентов барды. После химического воздействия выход биомассы увеличивается: в 1.65 раза по сравнению с контрольным образцом, и в 1.1 раза – после физического воздействия. Полученные данные согласуются с результатами исследований Е.А. Мартынова, О.Б. Иванченко, которые установили, что химическое воздействие стимулирует удельную скорость роста и количество клеток дрожжей рода *Candida* [34].

Результаты биотестирования вторичной барды на семенах *Raparus sativus* после утилизации дрожжами

Показатели оценки биотестирования	Вода дистиллированная (контроль)	Образец барды			
		Исходная без утилизации дрожжами	Утилизация не-обработанными дрожжами	Утилизация дрожжами после физического воздействия	Утилизация дрожжами после химического воздействия
Количество проросших семян, %	100.0±0.33	85.02±0.78	87.61±0.37	93.13±0.04	97.61±0.03
Длина корня, мм	6.9±0.3	5.4±0.3	5.6±0.3	6.0±0.3	6.5±0.3

Первичная барда спиртовых производств при ее утилизации без предварительной обработки причиняет значительный ущерб экологии, поскольку она имеет высокое значение биологического потребления кислорода (БПК). Это приводит к исчерпанию O₂ при аэробном разложении компонентов барды в объектах окружающей среды [35].

Во вторичной барде, полученной утилизацией первичной барды с помощью дрожжей, экологические показатели значительно улучшались за счет ассимиляции биологическими агентами питательных веществ (табл. 4).

Остаточная концентрация биологически активных соединений во вторичной барде негативно сказывается на всхожести семян и вегетативном развитии растений.

Как видно из табл. 4, самые высокие показатели тестирования (всхожесть и длина корня) наблюдаются в образце барды, обработанной химически активированными дрожжами, самые низкие – в барде, которая не утилизовывалась дрожжами. Таким образом, эффективность утилизации вторичной барды возрастает после обработки активированными дрожжами, а ее фитотоксичность уменьшается.

Заключение. Дрожжи *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883 способны к быстрому росту на спиртовой барде и накоплению биомассы с выходом от 2.6 до 4.3%.

Биохимическая активность дрожжей взаимосвязана с морфологическими характеристиками клеток: чем больше средний диаметр, высота клеток и площадь их поверхности, тем выше способность биологических агентов к ассимиляции компонентов спиртовой барды и выше интенсивность процесса утилизации барды и накопление биомассы биологических агентов-утилизаторов в целом.

Для интенсификации процесса аэробной переработки спиртовой барды посредством выращивания на ней кормовых дрожжей, рекомендуется предварительное воздействие на биологические агенты. Влияние способов воздействия на дрожжи-утилизаторы барды *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883 приводит к улучшению их физиологического состояния. При этом лучшие результаты (по показателям количества клеток с гликогеном и мертвых клеток) достигнуты в результате химического воздействия на дрожжи: количество клеток с гликогеном увеличилось на 4.3%, содержание аминного азота – на 6.67%.

Дрожжи штамма *Candida tropicalis* АП-31-КБП У-4883, обработанные антибиотиком, рекомендуется использовать для биотехнологической утилизации спиртовой барды, т.к. при их использовании отмечали максимальную всхожесть семян *Raparus sativus* относительно барды, не обработанной дрожжами.

Рекомендуется применять метод АСМ в качестве способа регистрации морфологии и качества клеток дрожжей, который позволяет количественно определять ряд параметров клетки для раннего прогнозирования технологических свойств дрожжей-утилизаторов, подвергнутых внешним воздействиям.

Литература

1. О государственном регулировании производства и оборота этилового спирта, алкогольной и спиртосодержащей продукции и об ограничении потребления (распития) алкогольной продукции: Федеральный закон от 22.11.1995 N 171-ФЗ // Собрание законодательства РФ. 1995. № 48 (27 нояб.). ст. 4553.
2. Захарец В.С., Евдокимов Н.С. К вопросу снижения экологической нагрузки спиртовых производств // Актуальные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса: российский и

зарубежный опыт. Омск: Изд-во ОмГАУ, 2019. С. 252–254.

3. Reis C.E.R., Rajendran A., Hu B. New technologies in value addition to the thin stillage from corn-to-ethanol process // *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2017. V. 16(1). P. 175–206. DOI: 10.1007/s11157-017-9421-6

4. Римарева Л.В., Лозанская Т.И., Худякова Н.М. Дрожжи кормовые на основе зерновой барды // *Комбикорма*. 2013. № 7. С. 41–42.

5. Brauer M.J., Huttenhower C., Airolidi E.M., Rosenstein R., Matese J.C., Gresham D., Boer V.M., Troyanskaya O.G., Botstein D. Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast // *Molecular biology of the cell*. 2007. V. 19. № 1. P. 352–367. DOI: org/10.1091/mbc.e07-08-0779

6. Li D., Wang D., Wei G. Efficient co-production of S-adenosylmethionine and glutathione by *Candida utilis*: effect of dissolved oxygen on enzyme activity and energy supply // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2017. V. 92. Issue 8. P. 2150–2158. DOI: org/10.1002/jctb.5226

7. Cámara E., Lenitz I., Nygård Y. A CRISPR activation and interference toolkit for industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain KE6-12 // *Scientific Reports*. 2020. V. 10. 14605 p. DOI: 10.1038/s41598-020-71648-w

8. Sariki S.K., Kumawat R., Singh V., Tomar R.S. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on activation of Slt2 and Rlm1 regulated by the cell wall integrity pathway // *Molecular Microbiology*. 2019. V. 112. № 4. P. 1350–1369. DOI: org/10.1111/mmi.14375

9. Rienzo A., Poveda-Huertes D., Aydin S., E. Buchler N., Pascual-Ahuir A., Proft M. Different Mechanisms Confer Gradual Control and Memory at Nutrient- and Stress-Regulated Genes in Yeast // *Molecular and Cellular Biology*. 2015. V. 35. № 21. P. 3669–3683. DOI: 10.1128/MCB.00729-15

10. Vanacloig-Pedros E., Lozano-Pérez C., Alarcón B., Pascual-Ahuir A., Proft M. Live-cell assays reveal selectivity and sensitivity of the multidrug response in budding yeast // *The Journal of Biological Chemistry*. 2019. V. 294. P. 12933–12946. DOI: 10.1074/jbc.RA119.009291

11. Карпенко Д.В. Определение рациональных параметров акустической обработки с целью активации пивных дрожжей // *Health, Food&Biotechnology*. 2020. V. 2. № 1. P. 140–152. DOI: 10.36107/hfb.2020.i1.s290

12. Dolz-Edo L., Rienzo A., Poveda-Huertes D., Pascual-Ahuir A., Proft M. Deciphering Dynamic Dose Responses of Natural Promoters and Single cis Elements upon Osmotic and Oxidative Stress in Yeast // *Molecular and cellular biology*. 2013. V. 33. № 11. P. 2228–40. DOI: org/10.1128/MCB.00240-13

13. Brown A.J.P., Cowen L.E., Pietro A.Di., Quinn J. Stress Adaptation // *Microbiology spectrum*. 2017. V. 5. № 4. P. 1–23. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0048-2016

14. Heitman J., Howlett B.J., Crous P.W., Stukenbrock E.H., James T.Y., Gow N.A.R. (Eds.) *The Fungal Kingdom*. American Society for Microbiology. 2017. 1160 p. DOI: org/10.1128/9781555819583

15. Ерохин П.С., Осина Н.А., Уткин Д.В., Заднова С.П., Спицын А.Н., Кузнецов О.С., Абдрашитова А.С. Параметрическая оценка состояния бактериальных клеток, исследованных методом атомно-силовой микроскопии // *Вестник биотехнологии*. 2020. Т. 16. № 2. С. 66–71.

16. Dos Santos A.G., Marquês J.T., Carreira A.C., Castro I.R., Viana A.S., Mingeot-Leclercq M.-P., de Almeida R.F.M., Silva L.C. The molecular mechanism of Nystatin action is dependent on the membrane biophysical properties and lipid composition // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2017. V. 19. P. 30078–30088. DOI: 10.1039/c7cp05353c

17. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А., Казеев И.В., Бочаров Е.В., Королев В.Г. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжево-сахаромицетов генетика микроорганизмов // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 12. С. 1367.

18. Давыденко С.Г., Васильева Л.М., Баташов Б.Э., Дедегкаев А.Т. Применение методов окраски дрожжей для оценки их физиологического состояния // *Пиво и напитки*. 2011. № 5. С. 8–11.

19. Smart K.A., Chambers K.M., Lambert I., Jenkins C., Smart C.A. Use of Methylene Violet Staining Procedures to Determine Yeast Viability and Vitality // *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1999. V. 57. Issue 1. P. 18–23. DOI: org/10.1094/ASBCJ-57-0018

20. Pogorelova N.A., Rogachev E.A., Digel I., Chernigova S.V., Nardin D.S. Bacterial Cellulose Nanocomposites: Morphology and Mechanical Properties // *Materials*. 2020. V. 13(12). 2849. p. DOI: 10.3390/ma13122849

21. Changa K., Chiangb Y., Yangb C., Liou J. Atomic force microscopy in biology and biomedicine // *Tzu Chi Medical Journal*, 2012. V. 24(4). P. 162–169 DOI: org/10.1016/j.tcmj.2012.08.002

22. Fotiadis D., Scheuring S., Müller S.A., Engel A., Müller D.J. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM/D // *Micron*, 2002. V. 33(4). P. 385–397. DOI: org/10.1016/S0968-4328(01)00026-9

23. Reich Z., Kapon R., Nevo R., Pilpel Y., Zmora S., Scolnik Y. Scanning force microscopy in the applied biological sciences // *Biotechnology Advances*. 2001. V. 19(6). P. 451–485. DOI: 10.1016/s0734-9750(01)00077-5

24. Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования: ОФС.1.2.3.0022.15 URL: <https://pharmacopeia.ru/ofc-1-2-3-0022-15-opredelenie-aminnogo-azota-metodami-formolnogo-i-jodometricheskogo-titrovaniya/> (дата обращения: 18.01.2022).

25. ГОСТ 33061-2014. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Наземные растения: тест на всхожесть семян и развитие проростков. Введ. 2015-08-01. М.: Стандартинформ, 2019. 24 с.

26. Сербя Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Курбатова Е.И., Рачков К.В., Игнатова Н.И., Давыдкина В.Е. Получение ферментализатов мицелиальной биомассы для создания пищевых и кормо-

вых биодобавок // Пищевая промышленность. 2016. № 6. С. 20–23.

27. Lutosławski K., Cibis E., Krzywonos M. The effect of temperature on the efficiency of aerobic biodegradation of sugar beet distillery stillage: Removal of pollution load and biogens // Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2017. V. 34. № 4. P. 985–996. DOI: org/10.1590/0104-6632.20170344s20160417

28. Holzknecht J., Kühbacher A., Papp C., Farkas A., Váradi G., Marcos J.F., Manzanares P., Tóth G.K., Galgóczy L., Marx F. The *Penicillium chrysogenum* Q176 Antimicrobial Protein PAFC Effectively Inhibits the Growth of the Opportunistic Human Pathogen *Candida albicans* // Journal of Fungi (Basel). 2020. V. 6. Issue 3. 141 p. DOI: 10.3390/jof6030141

29. Шепелин А.П., Дятлов И.А., Полосенко О.В. Микробиологический контроль качества пищевой продукции // Бактериология. 2017. Т. 2. № 2. С. 39–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47

30. Bhutada G., Kavšček M., Ledesma-Amaro R., Thomas S., Rechberger G.N., Nicaud J-M., Natter K. Sugar versus fat: elimination of glycogen storage improves lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* // FEMS Yeast Research. 2017. V. 17. Issue 3. P. 1–10. DOI: org/10.1093/femsyr/fox020

31. Cao L., Tang Y., Quan Z., Zhang Z., Oliver S.G., Zhang N. Chronological Lifespan in Yeast Is

Dependent on the Accumulation of Storage Carbohydrates Mediated by Yak1, Mck1 and Rim15 Kinases // PLoS Genetics. 2016. V. 12. Issue 12. P. 1–25. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006458

32. Parrou J.L., Teste M.A., Francois J. Effects of Various Types of Stress on the Metabolism of Reserve Carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic Evidence for a Stress Induced Recycling of Glycogen and Trehalose // Microbiology. 1997. V. 143. P. 1891–1900. DOI: 10.1099 / 00221287-143-6-1891

33. Taskin M., Saghafian A., Aydogan M.N., Arslan N.P. Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium // Biofuels Bioproducts and Biorefining. 2015. V. 9. Issue 5. P. 595–605. DOI: org/10.1002/bbb.1560

34. Мартынова Е.А., Иванченко О.Б. Изменение роста и пролиферации дрожжей рода *Candida tropicalis* под действием микотоксина фумонизина // Успехи медицинской микологии. Т. XIV. М.: Нац. акад. микол., 2015. С. 207–214.

35. Bilińska L., Gmurek M., Ledakowicz S. Comparison between industrial and simulated textile wastewater treatment by AOPs – Biodegradability, toxicity and cost assessment // Chemical Engineering Journal. 2016. V. 306. P. 550–559. DOI: org/10.1016/j.cej.2016.07.100

INFLUENCE OF EXTERNAL FACTORS ON CELL MORPHOLOGY AND ACCUMULATION OF YEAST BIOMASS

© N.S. Evdokimov, A.A. Kalenchuk, V.V. Dan'shina, E.A. Rogachev

Omsk state technical university,
11, ulitsa Mira, 644050, Omsk, Russian Federation

To prevent environmental pollution from distillery waste, enterprises are required to carry out complete processing of stillage and / or dispose of it at treatment facilities, but it is not possible to fully utilize distillery stillage due to the lack of necessary strains of microorganisms. Therefore, in the processing of distillery stillage, the choice of a strain of microorganisms with sufficient biological activity is of particular relevance. For the first time, biotechnological utilization by the *Candida tropicalis* yeast strain AP-31-KBP Y-4883 was used for the processing of distillery stillage. Yeast activity was increased by two external factors: physical (UV radiation) and chemical (19-mycosaminyl nystatinolide) exposure. A rational concentration of 19-mycosaminyl-nystatinolide (500 U) was established at which *Candida tropicalis* colonies reached their maximum size. The efficiency of vinasse disposal was assessed by the accumulation of amine nitrogen in an aqueous solution after vinasse hydrolysis, the amount of which was determined by the formal titration method.

Yeast inoculum, obtained after exposure to external factors, was introduced into a nutrient medium based on vinasse, and aerobic treatment was carried out for 72 hours.

The morphological properties of cells and their number were controlled by optical and atomic force microscopy, the results of which are consistent with each other and with the biological activity of yeast. The greatest changes in the morphology of the cell surface are noted after chemical exposure: compared with the initial sample, the average cell height increased by 0.24 μm , and the surface area increased by 1.25 times.

An increase in the degree of utilization of alcohol stillage by yeast was shown in the series “*Candida tropicalis* strain AP-31-KBP Y-4883 without treatment \rightarrow UV-treated strain \rightarrow antibiotic-treated strain”: indicators of biological activity increased by 4.3% (the proportion of cells saturated with glycogen) and by 6.67% (amine nitrogen content); biomass yield increased by 1.7%. Increments of indicators are calculated in the transition from the original sample to the treated antibiotic.

The assessment of the environmental hazard of bard samples was carried out using biotesting. It is shown that the efficiency of vinasse utilization increases after its treatment with yeast, which was previously exposed to UV radiation and an antibiotic. These samples were characterized by the highest germination of seeds relative to bards not treated with yeast.

Keywords: *Candida tropicalis*, distillery stillage utilization, yeast activity: physical and chemical effects, biomass yield, glycogen, amine nitrogen, atomic force microscopy, cell morphology, biotesting.