

Разработка оптимального состава питательной среды для культивирования дрожжей при выращивании беспозвоночных

DOI

Кандидат технических наук доцент **Е.М. Панчишина** – кафедра «Технология продуктов питания»; кандидат технических наук **Н.Л. Корниенко** – Младший научный сотрудник научного управления; кандидат биологических наук, доцент **И.В. Матросова** – заведующий кафедрой «Водные биоресурсы и аквакультура» – Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет (ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз»)

@ matrosova.iv@dgtru.ru;
panchishina.em@dgtru.ru;
kornienkonl@mail.ru

Ключевые слова:
питательная среда, дрожжи, протеин конопли, спирулина, моделирование, оптимизация, биомасса

Keywords:
nutrient medium, yeast, hemp protein, spirulina, modeling, optimization, biomass

DEVELOPMENT OF THE OPTIMAL COMPOSITION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF YEAST IN THE CULTIVATION OF INVERTEBRATES

Candidate of Technical Sciences, Associate Professor **E.M. Panchishina** – Department of "Food Technology"; Candidate of Technical Sciences **N.L. Kornienko** – Junior Researcher of the Scientific Department; Candidate of Biological Sciences, Associate Professor **I.V. Matrosova** – Head of the Department "Aquatic Bioresources and Aquaculture – Far Eastern State Technical Fisheries University (FSBEI HE "Dalrybvtuz")

Optimization of the nutritional formulation for the cultivation of *Rhodotorula spp* yeast was carried out. using the theory of experimental planning. Optimal values of process factors (prescription components) are obtained: mass fraction of spirulina -0.62%; hemp protein - 0.37%, at which the response function (yeast biomass) reaches an optimal value of 31.25 g / l. The development of the domestic feed base according to the obtained methodology will solve the problem of providing feeds that increase the viability of the cultivated object, and ensure a stable supply of feed based on sea yeast *Rhodotorula benthica* to mariculture enterprises.

При культивировании беспозвоночных важное значение имеет качество кормления, оно влияет на темп роста и выживаемость личинок и молоди, поэтому подбор оптимального состава кормов и рациона является первоочередной задачей. В настоящее время представляется целесообразным и востребованным предприятиями марикультуры использовать препараты на основе пробиотиков, которые

представляют собой живые организмы и (или) вещества микробного происхождения, повышающие активность иммунной системы, принимающие активное участие в процессах пищеварения, способствующие восстановлению естественной микрофлоры [1].

В Китае морские дрожжи родов *Rhodotorula* и *Debaryomyces* уже давно успешно применяют в каче-

стве кормовой пробиотической добавки для культивируемых гидробионтов. В отличие от традиционных хлебопекарных и пивных, красные дрожжи *Rhodotorula benthica* в своем составе имеют высокую концентрацию астаксантина и каротина, которые повышают иммунитет и выживаемость трепанга, как на личиночных стадиях, так и после оседания. Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост и развитие микроорганизмов, эффективный синтез целевого продукта. Состав питательной среды для каждого микроорганизма устанавливается экспериментально, основная задача при этом – оптимизация состава среды, выбор такого источника углерода, азота, фосфора и др. веществ, которые наиболее оправданы в экономическом и экологическом отношении [1].

В проведенных нами ранее исследованиях выделена чистая культура *Rhodotorula spp.* и изучены ее культуральные особенности роста на плотных стандартных и экспериментальных средах [2; 3]. Изучив потребности дрожжей *Rhodotorula spp.* в источниках питания, установлено, что азот, входящий в состав рецептур питательных сред оказывает существенное влияние на накопление культивируемой биомассы [4; 5]. Таким образом, поиск дополнительных источников азота и изучение возможности оптимизации питательной среды по-прежнему остается актуальной задачей.

Проведена оптимизация питательной рецептуры для культивирования дрожжей *Rhodotorula spp.* с использованием теории планирования экспериментов. Получены оптимальные значения факторов процесса (рецептурные компоненты): массовая доля спирулины – 0,62%; протеина конопли – 0,37%, при которых функция отклика (биомасса дрожжей) достигает оптимального значения 31,25 г/л. Разработка отечественной кормовой базы по полученной методике позволит решить проблему обеспечения кормами, повышающими жизнестойкость выращиваемого объекта, и обеспечить стабильные поставки корма на основе морских дрожжей *Rhodotorula benthica* предприятиям марикультуры.



Дрожжи *Rhodotorula spp.*

Таблица 1. Рецептуры экспериментальных питательных сред /
Table 1. Formulations of experimental nutrient media

Компоненты, г/л	Среда для активации дрожжей [5]	Среда для брожения с протеином конопли [5]	Среда для брожения с протеином конопли и спирулиной (авторская модификация) [4]
Глюкоза	20,0	20,0	20,0
Говяжий пептон	10,0	10,0	10,0
Дрожжевой экстракт	5,0	15,0	15,0
NaCl	10,0	10,0	10,0
Протеин конопли	-	10,0	-
Протеин конопли со спирулиной (1:1)	-	-	10,0
MgSO ₄	3,0	0,15	0,15
K ₂ HPO ₄	7,0	0,25	0,25
Твин	-	1,0	1,0
FeCl ₃ ·7H ₂ O-1% р-р	-	-	-
CaCO ₃	-	-	-
ZnSO ₄	-	0,11	0,11
Ацетилсалициловая кислота	-	0,11	0,11

Таблица 2. Значения изменяемых факторов, их интервалы и пределы варьирования /
Table 2. Values of variable factors, their intervals and limits of variation

Факторы	Уровни			Интервалы варьирования
	-1	0	+1	
Массовая доля спирулины, X ₁	0,25	0,5	0,75	0,25
Массовая доля протеина конопли, X ₂	0,25	0,5	0,75	0,25



Рисунок 1. Схема экспериментальных исследований по оптимизации рецептурного состава

Figure 1. Scheme of experimental studies on optimization of prescription composition



Культуральный рост дрожжей



Питательная среда

Цель настоящей работы – получение оптимального состава питательной среды для культивирования дрожжей *Rhodotorula spp.*

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами микробиологических исследований стала пробиотическая кормовая добавка «*Rhodotorula fujianensis*», производитель Даляньский центр разработки водных кормов Цзяолун, и полученная на ее основе биомасса.

Рецептурный состав питательных сред (табл. 1), применяемых для культивирования дрожжей, научно обоснован в рамках проведения собственных исследований [4], а также – на основе анализа опыта китайских коллег [5].

Подготовленные питательные среды стерилизовали в автоклаве ВК-75 при температуре 110°C в течение 30 минут.

В ходе экспериментальной части (рис. 1) состав питательных сред оптимизировали с целью увеличения продуктивности дрожжевой культуры *Rhodotorula spp.*

Определение биомассы взвешиванием состояло из трех последовательных операций: доведение массы фильтров до постоянного значения, отделение клеток микроорганизмов от культуральной жидкости, определение их массы. Чтобы определить массу сухих клеток фильтр с осадком помещали в сушильный шкаф, высушивали и взвешивали. Сухую биомассу определяли по формуле (1) [1]:

$$M = ((A - B) \cdot 1000) / V, \quad (1)$$

Таблица 3. Матрица двухфакторного плана оптимизации соотношения исследуемых компонентов культуральной среды / **Table 3.** Matrix of the two-factor plan for optimizing the ratio of the studied components of the cultural environment

Номер образца	Спирулина (X_1), %	Протеин конопли (X_2), %
1	0,25	0,25
2	0,25	0,5
3	0,25	0,75
4	0,5	0,25
5	0,5	0,5
6	0,5	0,75
7	0,75	0,25
8	0,75	0,5
9	0,75	0,75

где M – сухая биомасса в г/л; A – масса фильтра с осадком в гр; B – масса фильтра без осадка в гр; V – объем культуральной жидкости, взятый для фильтрации в мл.

В работе применяли метод полного факторного эксперимента математического планирования [6]. Статистическую и графоаналитическую обработку опытных данных осуществляли с использованием пакета прикладной программы Table Curve 3dv4. Для получения достоверных результатов рассчитывали необходимое количество опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании экспериментальных данных, для оптимизации питательной среды выбраны рецептурные компоненты, влияющие на прирост биомассы: массовая доля спирулины – X_1 , % и массовая доля протеина конопли – X_2 , %. Используя в качестве функции отклика рост биомассы дрожжей *Rhodotorula spp.*, (Y , г/л) определили оптимальные значения указанных параметров. Пределы и интервалы изменения факторов (X_1 , X_2), подлежащих оптимизации, приведенные в таблице 2, установлены с учетом собственных предварительных экспериментов.

С использованием теории планирования разработана матрица плана оптимизации соотношения рецептурных компонентов (спирулина, протеин конопли) культуральной среды (табл. 3).

Реализация плана эксперимента согласно схеме (рис. 1) и обработка полученных данных, позволили получить следующее уравнение регрессии (2), адекватно описывающее влияние соотношения исследуемых компонентов рецептуры на рост биомассы дрожжей *Rhodotorula spp.*:

$$Y = 14,22 + 4,92/X_1 + 52,52 \cdot X_2 - 2,01/X_1^2 - 78,13 \cdot X_2^2 + 9,36 \cdot X_2/X_1 \quad (2)$$

При этом достоверность аппроксимации составила $R^2=0,81$.

Полученное уравнение регрессии позволяет не только предсказать значение функции отклика для заданных условий проведения эксперимента,



Трепанг дальневосточный

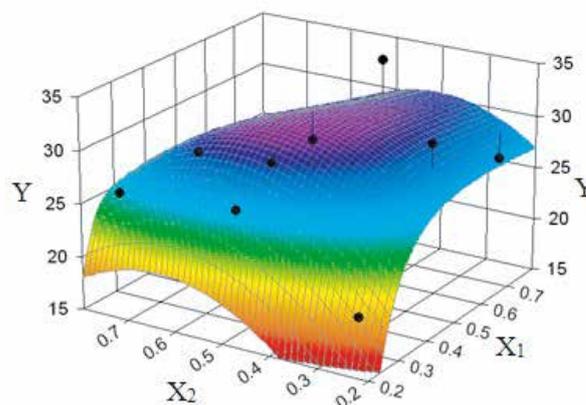


Рисунок 2. Поверхность, описывающая зависимость биомассы дрожжей от соотношения исследуемых компонентов рецептуры

Figure 2. Surface describing the dependence of yeast biomass on the ratio of the studied components of the formulation



Клетки *Arthrospira (Spirulina) platensis*



Морской еж

но и дает информацию о форме поверхности отклика (рис. 2).

Оптимальные параметры X_1 и X_2 определены методом нахождения экстремумов на графической интерпретации процесса и имеют следующие значения X_1 – массовая доля спирулины составила 0,62%; X_2 – массовая доля протеина конопля составил 0,37%, при которых функция отклика Y (биомасса дрожжей) достигает оптимального значения 31,25 г/л. Полученные оптимальные значения факторов процесса (рецептурные компоненты) уточнены на практике.

Таким образом, на основании полученных данных о физиолого-биохимических особенностях дрожжей *Rhodotorula spp.* на различных питательных средах, для последующей оптимизации выбрана среда на основе протеина конопля и спирулины. Экспериментально установлено, что стимулирующее действие на увеличение накопления биомассы дрожжей оказывает авторский

состав питательной среды с протеином конопля и спирулиной. Так, культивируемые дрожжи способны аккумулировать биомассу на 23-67% больше, чем на других исследуемых вариантах сред. С использованием теории планирования разработана матрица двухфакторного плана оптимизации соотношения рецептурных компонентов (спирулина, протеин конопля) культуральной среды.

Полученные сведения послужат основой для формирования новых эффективных подходов к организации кормовых ресурсов и питания иглокожих (дальневосточный трепанг, серый морской еж), двустворчатых моллюсков (приморского гребешка), а также в перспективе других видов морских биоресурсов при товарном выращивании на предприятиях марикультуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИР № 809/2022 «Научное обоснование способа получения кормовых препаратов пробиотической направленности на основе биомассы дрожжей *Rhodotorula benthica*, предназначенных для выращивания объектов аквакультуры».

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

- Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практическое пособие. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 215 с.
- Egorov N.S. Guide to practical classes in microbiology: A practical guide. - M.: Publishing House of Moscow. un-ta, 1983 - 215 p.
- Панчишина Е.М. Изучение культуральных особенностей дрожжей *Rhodotorula benthica*, выделенных из пробиотической кормовой добавки // Е.М. Панчишина, Н.Л. Корниенко, Е.В. Шадрина // Научные труды Дальрыбвтуза. – 2020. – Т.52. – №2. – С. 5-11.
- Panchishina E.M. The study of the cultural characteristics of yeast *Rhodotorula benthica* isolated from probiotic feed additives // E.M. Panchishina, N.L. Kornienko, E.V. Shadrina // Scientific works of Dalrybvtuz. - 2020. - Vol.52. - No. 2. - Pp. 5-11.
- Matrosova I.V., Panchishina E.M., Politaeva A.A., Kornienko N.L. Use the *Rhodotorula benthica* yeast to feeding of echinoderms // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. - Krasnoyarsk: IOP Publishing Ltd, 2021. – P. 42029. – URL: [http://www. DOI.10.1088/1755-1315/677/4/042029](http://www.DOI.10.1088/1755-1315/677/4/042029).
- Матросова И.В., Политаева А.А. Красные дрожжи *Rhodotorula benthica* - замещающая кормовая основа для иглокожих при заводском выращивании // Сборник научных трудов XXII Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии и природопользования». – Москва: Российский университет дружбы народов, 2021. – С. 228-233.
- Matrosova I.V., Politaeva A.A. Red yeast *Rhodotorula benthica* - replacement feed base for echinoderms in factory cultivation // Collection of scientific papers of the XXII International scientific and practical conference "Actual problems of ecology and nature management". - Moscow: Peoples' Friendship University of Russia, 2021. - Pp. 228-233.
- Ji-hui, Wang Liu-qun, Zhao Jin-feng, Liu Han, Wang Shan Xiao. Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas* // Fish & Shell fish Immunology. Vol. 43, 2015. – 330 p.
- Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановская Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. // Ю.П. Адлер, Е.В. Маркова, Ю.В. Грановская – Изд-во «Наука», 1971. – 283 с.
- Adler Yu.P., Markova E.V., Granovskaya Yu.V. Experiment planning in search of optimal conditions. // Yu.P. Adler, E.V. Markova, Yu.V. Granovskaya - Publishing house "Science", 1971. - 283 p.