

## САПРОФИТНЫЕ ДРОЖЖИ *Rhodotorula mucilaginosa*: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, МОРФОБИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРОДУКЦИЯ КАРОТИНОИДОВ\*

Д.А. НИКАНОВА<sup>1</sup>✉, О.А. АРТЕМЬЕВА<sup>1</sup>, Е.Н. КОЛОДИНА<sup>1</sup>,  
М.В. ДОВЫДЕНКОВА<sup>1</sup>, К.А. БЕРЕЗОВА<sup>1</sup>, И.М. МИХЕЛЬ<sup>2, 3</sup>,  
А.С. БАРАШКОВА<sup>3, 4</sup>, Е.А. РОГОЖИН<sup>3, 4</sup>

*Rhodotorula* — род сапрофитных дрожжей семейства *Sporidiobolaceae*, которые распространены в воздухе, почве, озерах, морской воде, молоке, пищевых продуктах, колонизирует проростки, растения, людей и других млекопитающих. Три вида *Rhodotorula* (*R. mucilaginosa*, *R. glutinis* и *R. minuta*) рассматриваются как условно-патогенные и становятся наиболее частыми возбудителями инфекции у людей с ослабленным иммунитетом. Однако в последнее время дрожжи *R. mucilaginosa* все чаще используются в биотехнологии для производства каротиноидов и в кормлении сельскохозяйственных животных. Каротиноидные пигменты служат антиоксидантами, обладают антиканцерогенными свойствами, в том числе иммуномодулирующими и онкопротекторными, что способствует нормализации репродуктивной функции, роста и развития сельскохозяйственных животных и птиц. В настоящей работе мы впервые провели комплексное изучение дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*, выделенных из желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. Была установлена их видовая принадлежность по 5.8S-ITS-фрагменту рДНК. Показано, что морфобиохимические свойства имеют высокую внутривидовую вариабельность. Определена оптимальная температура роста. Выявлены лидерные штаммы по продукции каротиноидов на среде без обогащения. Целью работы было выделение из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы пигментированных дрожжей с последующей идентификацией до вида, культивированием, получением биомассы, оценкой суммарного содержания синтезируемых каротиноидов и их содержания в биомассе, а также выявление наиболее перспективных изолятов для дальнейшего использования в составе кормовой добавки. Опыты проводили в период с 2023 по 2025 год. Изоляты дрожжей были выделены из содержимого желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота черно-пестрой породы, помесных борзых F<sub>2</sub> (крупная белая × ландрас) × дюрок и бройлеров кросса Смена-9 в ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. Выделение проводили на декстрозном агаре Сабуро («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия). Для микроскопического исследования проводили стандартное окрашивание метиленовым синим для определения формы клеток. Морфологические свойства и чистоту изолятов проверяли под световым микроскопом Nikon ECLIPSE Ci-L («Nikon», Япония). Биохимический профиль определяли с использованием тест-системы KB009R HiCarbo («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия) и специфических сахаров. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в амплификаторе Mini Amp Plus («Thermo Fisher Scientific», Сингапур). Для амплификации 5.8S-ITS-фрагмента рДНК и определения его первичной нуклеотидной последовательности использовали олигонуклеотидные праймеры ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') и ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Экстракцию пигментов проводили из образцов, каждый из которых содержал замороженную сырую биомассу дрожжей одного из изолятов (от 5 до 20 г). Содержание каротиноидов в экстракте определяли спектрофотометрически на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu Corp.», Япония). Осуществляли измерение спектров поглощения в диапазонах  $\lambda = 300-600$  нм. Все выделенные изоляты использовали глюкозу, декстрозу, маннозу, раффинозу, сахарозу, фруктозу в качестве источников углерода для ферментации. Колонии всех изолятов, выращенных на среде ДАП, имели оттенок оранжево-красного цвета, были круглыми, выпуклыми, поверхность колоний была гладкой, края ровными, структура однородной. Оптимальная температура роста составляла 19-30 °С. Максимальную площадь клетки имели штаммы Chli 32 (4,364 мкм<sup>2</sup>) и Sr 16 (4,714 мкм<sup>2</sup>), а наибольший коэффициент удлиненности (K<sub>y</sub>) — штаммы Pf 22 (1,821 при длине клетки 3,069±0,100 мкм и ширине 1,685±0,033 мкм) и Chc 8 (1,685 при длине 2,727±0,098 мкм и ширине 1,619±0,034 мкм). Штаммы Chc 65 и Pf 13 имели площадь клетки 4,121 и 4,298 мкм<sup>2</sup>, при этом K<sub>y</sub> у них составлял 1,414 и 1,520, это значит, что форма клеток была более вытянутой. Минимальная площадь клеток отмечена у штамма Chc 6 (1,786 мкм<sup>2</sup>). Из биомассы всех изолятов были экстрагированы каротиноиды, осуществлен их спектрофотометрический анализ, по результатам которого были отобраны 6 изолятов (Chli 32, Chli 49, Chc 65, Cm 17, Cr 32, Sr 40) с максимальным содержанием каротиноидов (22,86; 21,71; 18,05; 15,08; 11,74; 11,24 мкг/г сырой биомассы). Эти изоляты представляются наиболее перспективными для дальнейшей оптимизации процесса культивирования и повышения их продуктивности.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-16-00167.

**Ключевые слова:** *Rhodotorula mucilaginosa*, экстракция, органические растворители, каротиноиды, спектрофотометрический анализ.

*Rhodotorula* — род сапрофитных дрожжей семейства *Sporidiobolaceae* (порядок *Sporidiales*, класс *Pucciniomycetes*, тип *Basidiomycota*), размножение которых осуществляется базидиоспорами. Представители рода *Rhodotorula* распространены в воздухе, почве, озерах, морской воде, молоке, пищевых продуктах, колонизируют простейших, растения, людей и других млекопитающих (1, 2). Первые упоминания о *Rhodotorula mucilaginosa* относятся к 1934 году, что отражено в исследованиях Фрэнсиса Чарльза Харрисона (Francis Charles Harrison). Колонии *R. mucilaginosa* окрашены в оранжево-красный цвет, влажные, имеют гладкую поверхность, способны продуцировать каротиноиды (3, 4). Дрожжи *R. mucilaginosa* применяются при промышленном производстве каротиноидов благодаря относительно высокой скорости роста (5, 6), а также служат продуцентами липидов и эссенциальных жирных кислот (7). Отмечена относительная неприхотливость *R. mucilaginosa* к питательным компонентам при культивировании на разных субстратах. Так, в работе S. Rajan с соавт. (8) для производства каротиноидов *R. mucilaginosa* использовались отходы агропромышленного производства, в том числе луковая шелуха, картофельная кожура, шелуха бобов мунг и стручки гороха.

Каротиноиды — это природные жирорастворимые пигменты, большинство из которых представляет собой терпеноиды с 40 атомами углерода. Они содержат две концевые кольцевые системы, соединенные цепочкой сопряженных двойных связей, или полиеновой системой, которые действуют как мембранозащитные антиоксиданты, поглощающие кислород и пероксильные радикалы. Антиоксидантная способность каротиноидов, возможно, обусловлена их структурой (9, 10).

Каротиноидные пигменты играют важную роль в защите организма, они служат антиоксидантами, обладают антиканцерогенными свойствами, в том числе иммуномодулирующими и онкопротекторными, что способствует нормализации репродуктивной функции, роста и развития сельскохозяйственных животных и птицы (7). Каротиноиды улучшают клеточную коммуникацию и усиливают иммунный ответ у жвачных и моногастричных животных, снижают заболеваемость маститом у молочных коров, преобразовываясь в молочной железе в витамин А, тем самым улучшая качество молока (11). В составе пищевых добавок каротиноиды обладают также антимикробной активностью (12). Обычно корма для животных бедны каротиноидами, поэтому их вносят дополнительно к основному рациону. Лекарственные препараты, а также пищевые и кормовые добавки, содержащие каротиноиды, нашли распространены во всем мире (13).

Извлечение из растительного сырья, химический и микробиологический синтез — распространенные методы промышленного получения каротиноидов. На сегодняшний день все больше возрастает спрос на каротиноиды, полученные из природного сырья, поскольку молекулы, синтезированные химическим путем, могут негативно влиять на организм животного (7). Микробиологическое производство в биореакторах не зависит от географических и сезонных колебаний, определяющих доступность растительного каротиноид-содержащего сырья. Кроме того, использование отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности в качестве сырья для микробиологического синтеза может значительно снизить затраты на производство (14). Так, микроводоросли *Dunaliella salina* служат крупнейшим коммерческим источником натурального β-каротина. Они способны накапливать

в клетках от 10 до 14 % каротина, 57-69 % лютеина и 11-24 % ксантофиллов (15). *Spirulina platensis* содержит β-каротин в концентрации 700-1700 мг/кг (16). Водоросли *D. salina* совместно с *Spirulina* используют в рационах сельскохозяйственных животных и птицы для повышения продуктивности, укрепления иммунитета, улучшения функции почек и печени, липидного профиля и увеличения активности пищеварительных ферментов (17).

Еще одна известная группа продуцентов каротиноидов — каротин-синтезирующие дрожжи родов *Phaffia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium*, *Kockovaella* (18).

По результатам исследований N. Elfeky с соавт. (19), штамм *Rhodotorula glutinis* JMT 21978 способен аккумулировать 1,6 мг/г клеточных каротиноидов с 30 % торулена при культивировании в среде, содержащей глюкозу и дрожжевой экстракт. Продукция торулародина (63 %, 50,5±3,0 мкг/г) из *Rhodotorula mucilaginosa* была оценена на среде, содержащей ксилозу и глицерин. В этом случае самое высокое содержание каротиноидов составило 121,3 мкг/г (20). Анализ данных литературы показывает значительную вариативность содержания каротиноидов как среди различных видов рода *Rhodotorula*, так и среди штаммов вида *R. mucilaginosa* (21). Однако следует отметить, что авторы использовали различные методы экстракции каротиноидов, а также культивирования (твердофазное либо глубинное в жидкой среде), что не позволяет достоверно сопоставить реальное содержание каротиноидов в штаммах.

Метод и условия культивирования оказывают значительное влияние на продукцию каротиноидов дрожжами, при изменении параметров культивирования выход этих метаболитов может заметно различаться (22, 23). J. Da Silva с соавт. (24) при культивировании *R. mucilaginosa* получили максимальный выход биомассы (12,87 г/л) при температуре 34 °С и pH 5,0, но максимальный синтез каротиноидов (1,13 г/л) наблюдался при 22 °С. S. Allahkarami с соавт. (25) показали, что повышение температуры до 28 °С сопровождается ростом образования каротиноидов (2,43 мг/л) у *R. mucilaginosa*, в то время как при 35 °С оно снижается (0,60 мг/л).

S. Landolfo с соавт. (26) провели поиск генов, принимающих участие в биосинтезе каротиноидов у *R. mucilaginosa*. Было показано, что ключевая роль в этом процессе отводится генам *HMG1* (кодирует HMG-CoA-редуктазу для дальнейшего превращения HMG-CoA в мевалонат), *ERG12* (участвует в биосинтезе изопентилпирофосфата — IPP из мевалоната), *CAR2* (бифункциональный ген для синтеза фитоена из IPP и ликопина из фитоена), *CAR1* (кодирует десатурацию фитоена, что приводит к образованию β-каротина), *CAR0* (принимает участие в обмене и поддержании гомеостаза каротиноидов). Однако авторы отмечают, что количество каротиноидов, продуцируемых *R. mucilaginosa*, в большей степени зависит от активности ферментов, а не от транскрипции генов (26).

Перспективным направлением представляется использование дрожжей *R. mucilaginosa* в рационах сельскохозяйственных животных, что подтверждается рядом исследований. Штамм TZR2014, вводимый перорально пороссятам-отъемышам, показал эффективность в улучшении роста, усилении антиоксидантной защиты, оптимизации пищеварения и поддержании кишечного микробиологического баланса (27). Добавление *R. mucilaginosa* совместно с *Trichoderma longibrachiatum* в кукурузный силос позволило улучшить качество корма и снизить его потребление без ущерба для продуктивности ягнят (28). Эксперименты *in vitro* также демонстрируют способность этого вида дрожжей в составе микробного консорциума значимо повышать усвояемость грубых кормов (29).

Результаты исследований подтверждают высокий пробиотический потенциал штамма *R. mucilaginosa* UFMGCB 18377. В опытах J.O.P.A. Coutinho с соавт. (30) продемонстрировано, что указанный штамм обеспечивает эффективную защиту мышей от сальмонеллеза, значимо повышая выживаемость и уменьшая потерю массы тела по сравнению с контрольной группой, получавшей *S. cerevisiae*. Терапия *R. mucilaginosa* также подавляла системное распространение инфекции (транслокация в печень) и снижала интенсивность воспалительного ответа, о чем свидетельствовало уменьшение активности миелопероксидазы и эозинофильной пероксидазы в тканях, а также содержания секреторного иммуноглобулина А (sIgA) в кишечнике (30). В дальнейшем J.O.P.A. Coutinho с соавт. (31) показали, что тот же штамм смягчает течение индуцированного 5-фторурацилом мукозита, предотвращая потерю массы тела, уменьшая повреждение и воспалительную инфильтрацию кишечной стенки, а также подавляя рост условно-патогенных энтеробактерий.

Два независимых исследования подтверждают иммуностимулирующие свойства штамма *R. mucilaginosa* ZTHY2. Первое исследование выявило его способность усиливать гуморальный и клеточный иммунитет, а также положительно модулировать состав микробиоты кишечника у здоровых мышей (32). Во второй работе было показано, что *R. mucilaginosa* ZTHY2 обладает терапевтическим потенциалом в условиях индуцированной иммуносупрессии. Его эффективность в ослаблении атрофии иммунных органов и усилении антиоксидантного статуса была сравнима с эффектом контрольного пробиотика *Lactobacillus acidophilus* (33). Эти результаты указывают на перспективность применения *R. mucilaginosa* в качестве пробиотика в пищевой промышленности и биотехнологии.

В настоящей работе мы впервые провели комплексное изучение дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*, выделенных из желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. Была установлена их видовая принадлежность по 5.8S-ITS-фрагменту рДНК. Показано, что морфобиохимические свойства имеют высокую внутривидовую вариабельность. Определена оптимальная температура роста. Выявлены лидерные штаммы по продукции каротиноидов на среде без обогащения.

Целью работы было выделение из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы пигментированных дрожжей с последующей идентификацией до вида, культивированием, получением биомассы, оценкой суммарного содержания синтезируемых каротиноидов и их содержания в биомассе, а также выявление наиболее перспективных изолятов для дальнейшего использования в составе кормовой добавки.

**Методика.** Работу проводили в 2023–2025 годах. Изоляты дрожжей были выделены из содержимого желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота черно-пестрой породы, помесных боровков F<sub>2</sub> (крупная белая × ландрас) × дюрок и бройлеров кросса Смена 9 (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста). Выделение проводили на декстрозном агаре Сабуро («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия). Изоляты хранились в бульоне YPD с 5 % глицерином («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия) при –20 °С. Для оценки жизнеспособности во время хранения дрожжевые клетки дважды субкультивировали на агаре Сабуро («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия) и среде YPD в течение 24 ч при 30 °С. Концентрацию клеток определяли по OD<sub>540</sub> с помощью микробиологического анализатора Multiskan FC («ThermoFisher Scientific, Inc.», Финляндия), дрожжи культивировали в среде YPD до плотности суспензии приблизительно 1×10<sup>5</sup> клеток/мл.

Для выделения ДНК одну колонию, предварительно выращенную на плотной среде ДАП (10 % пептона, 10 % глюкоза, 10 % дрожжевой экстракт, 15 % агар), переносили в 2 мл жидкой среды ДАП и культивировали 24 ч на качалке (Series 25 Incubator Shaker, «New Brunswick Scientific Co., Inc.», США) (120 об/мин) при 30 °С. Дрожжевую биомассу для выделения ДНК получали центрифугированием на Beckman J2-21 («Beckman Coulter», США) при 4000 об/мин в течение 15 мин. ДНК выделяли с использованием набора D-Plants по протоколу фирмы-изготовителя (ООО «Биолабмикс», Россия).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в амплификаторе Mini Amp Plus («Thermo Fisher Scientific», Сингапур). Для амплификации 5.8S-ITS-фрагмента рДНК и определения его первичной нуклеотидной последовательности использовали олигонуклеотидные праймеры ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') и ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Синтез праймеров осуществляли в компании ООО «Биолабмикс» (Россия). Условия ПЦР-амплификации были следующими: 1 мин при 94 °С; 10 с при 94 °С (денатурация), 10 с при 56 °С (отжиг праймеров), 17 с при 72 °С (синтез ДНК) (35 циклов); 5 мин при 72 °С (финальная элонгация). Реакцию проводили при конечной концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов 200 мкМ и 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Электрофорез ДНК осуществляли в 1,0 % агарозном геле при 60 В в 0,5×TBE буфере (45 мМ Tris-HCl, 10 мМ EDTA, 45 мМ борной кислоты) в течение 1,5 ч. ДНК визуализировали окрашиванием геля в растворе бромистого этидия с просмотром в УФ-свете (система визуализации MaXidoc G2, «DAIHAN Scientific Co., Ltd.», Корея) для подтверждения присутствия полос фрагментов размером ~ 500-700 п.н. В качестве маркера молекулярных масс использовали Step50 plus и Step100 long (ООО «Биолабмикс», Россия).

Секвенирование образцов по методу Сэнгера проводилось в ЗАО «Евроген» (Россия) в соответствии с принятым в компании регламентом.

Сборку нуклеотидных последовательностей фрагмента рДНК, полученных с прямым и обратным праймерами, осуществляли с помощью программы Contig Express пакета Vector NTI 10.0 («Thermo Fisher Scientific», США). Идентификацию выделенных изолятов дрожжей проводили с использованием филогенетического подхода и нуклеотидного подобия. Анализ идентичности нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Clustal W программного пакета Unipro UGENE 49.0 (34). Анализ сходства нуклеотидов и построение филогенетического дерева выполняли в программе MEGA v.11.

Для микроскопического исследования проводили стандартное окрашивание метиленовым синим, чтобы определить форму клеток. Морфологические свойства и чистоту изолятов проверяли под световым микроскопом Nikon ECLIPSE Ci-L («Nikon», Япония) при увеличении 100×16. Полученные с помощью камеры микрофотографии, сделанные по завершении культивирования, анализировали с использованием программного обеспечения Basler PowerPack («Basler Vision Technologies», Германия). По микрофотографиям определяли линейные размеры клеток (длину и ширину). Для каждого изолята проанализировали по 17 клеток в 5 повторностях (всего 85 клеток).

Морфологическую характеристику и физиологические тесты, в частности рост штаммов на средах с высоким осмотическим давлением (50 %

глюкозы, 60 % глюкозы, 10 % NaCl + 5 % глюкозы), рост при разных температурах (19, 25, 30, 35, 37, 40 и 45 °C) проводили по С.Р. Kurtzman с соавт. (35).

Биохимический профиль определяли с использованием тест-системы KB009R HiCarbo («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия) и специфических сахаров (глюкоза, мальтоза, лактоза, манит, сахароза, ксилоза, рамноза, раффиноза, фруктоза, целлобиоза, манноза, трегалоза, L-арабиноза, мелибиоза, галактоза, мелицитоза, декстроза, инулин, натрия глюконат, глицерол, салицин, дульцит, инозит, адонит, арабитол, эритрит,  $\alpha$ -метил-D-глюкозид, ксилитол, ONPG — орто-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид, эскулин, D-арабиноза, цитрат, малонат, сорбоза, сорбит, L-рамноза салицин). Интерпретацию результатов проводили согласно «HiBio-ID Инструкция по применению — Наборы для идентификации микроорганизмов» (36).

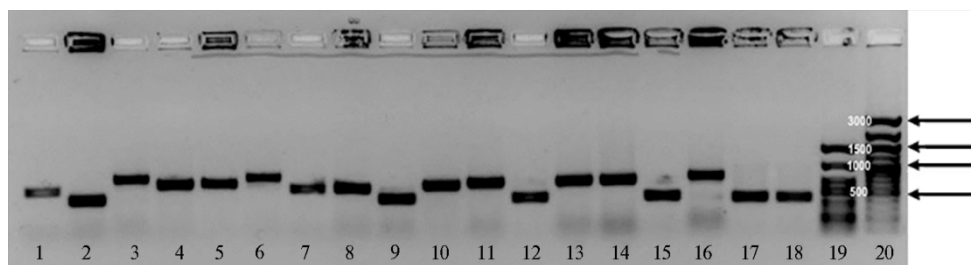
Пигменты экстрагировали из образцов, каждый из которых содержал замороженную сырую биомассу дрожжей одного из изолятов (от 5 до 20 г). Навеску сырой биомассы размораживали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем ее заливали 2-кратным избытком (масса/объем) 1 М соляной кислоты, переносили в пробирку объемом 50 мл. Далее клеточную биомассу разрушали на водяной бане («IKA-Werke GmbH & Co. KG», Германия) при 90 °C в течение 15 мин, периодически перемешивая. Затем все содержимое пробирки переливали в стеклянный лабораторный стакан подходящего объема и добавляли охлажденный ацетон (ЧДА, ООО ТД «Химмед», Россия) в соотношении 1:10 (объем/объем). Экстракцию вторичных метаболитов проводили в течение 40 мин при комнатной температуре и интенсивном перемешивании, после чего экстракт выдерживали при температуре 4–6 °C в течение ночи для достижения эффективного осаждения белков. После этого переносили экстракт в пробирки объемом 50 мл и центрифугировали (Beckman J2-21, «Beckman Coulter», США) 10 мин при 5000 об/мин. Аккуратно отбирали супернатант и концентрировали его в роторном испарителе («IKA-Werke GmbH & Co. KG», Германия) до объема приблизительно 30–45 мл, далее переносили в пробирки объемом 15 мл и выдерживали при 4–6 °C в течение ночи для разделения полярной (слабо окрашенной нижней) и неполярной (интенсивно окрашенной верхней) фаз. Аккуратно отбирали полярную фазу и перерастворяли неполярный остаток в смеси гексан:этилацетат (ХЧ, ООО ТД «Химмед», Россия) в соотношении растворителей 2:1 (объем/объем), доводя суммарный объем до 10 мл, затем перемешивали переворачиванием. Содержание каротиноидов в экстракте определяли спектрофотометрически на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu Corp.», Япония). Спектры поглощения измеряли в диапазоне  $\lambda = 300$ –600 нм. Длина оптического пути составляла 1 см.

Количественное содержание пигментов определяли по методике, описанной О.П. Червяковой с соавт. (37), с использованием следующих формул:  $C_1 = 3,9D_{450} + 1,8D_{537} - 3,6D_{509}$  (мкг/мл) (для пигментов  $\beta$ -каротиноидной природы);  $C_2 = 5,3D_{509} - 6,7D_{537}$  (мкг/мл) (для торулина и его аналогов/гомологов);  $C_3 = 6,7D_{537} - 1,1D_{509}$  (мкг/мл) (для пигментов группы ретинола).

Для статистической обработки морфологических и биохимических данных применяли программу STATISTICA v.13 («StatSoft, Inc.», США, 2011; <http://www.statsoft.com>). Данные представлены как средние арифметические и стандартные ошибки средних ( $M \pm SEM$ ).

**Результаты.** Идентификация изолятов на основе анализа последовательности 5.8S-ITS рДНК показала, что выделенные красные дрожжи относятся к виду *R. mucilaginosa*.

С использованием праймеров ITS1/ITS4 для области гена 5.8-S рДНК была выполнена амплификация соответствующих фрагментов ДНК изолятов. Эти праймеры позволяют получить ПЦР-продукт размером 500-700 п.н. (рис. 1).



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации области гена 5.8S-ITS рДНК изолятов, выделенных из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птиц: 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14 — изоляты, идентифицированные как дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa*, 19 — ДНК маркер Step100 long (ООО «Биолабмикс», Россия), 20 — ДНК маркер Step50 plus (ООО «Биолабмикс», Россия). Остальные образцы (дорожки) при идентификации не были отнесены к *R. mucilaginosa* (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2024 год).

Секвенирование ампликона для региона ITS1-5.8S-ITS4 позволило получить нуклеотидные последовательности длиной 608-640 п.н. Анализ полученных и доступных в базе данных NCBI нуклеотидных последовательностей с помощью программы BLASTN показал 99 % гомологию участка рДНК изолятов Cm 17, Pf 11, Chc 2, Sr 9, Sr 18, Sr 16, Chc 6, Pf 26 Pf 39, Sr 24, Chc 8, Cr 32, Sr 89, Sr 14 Pf 10 и Pf 77 с соответствующими фрагментами штаммов и изолятов *R. mucilaginosa* PMM08-3684L, 120051ZA, CBS 316, ASPSP121 и *R. affinis mucilaginosa* 3142.2A37 (GenBank-номера соответственно KP132584.1:39-659, PV330530.1, NR\_073296.1, PQ248788.1, MW620056.1). Анализ нуклеотидных последовательностей изолятов Chc 60, Chli 32, Chli 49, Chc 65, Cm 70 Chc 7 и Sr 40 показал 99 % гомологию участка рДНК с соответствующими фрагментами у штаммов и изолятов *R. mucilaginosa* T159, PMM08-1716L, AM25 (GenBank-номера PV244485.1, KP132583.1:8-682, KM246181.1). Нуклеотидная последовательность изолята Chc 12 показала 99 % гомологию участка рДНК с соответствующими фрагментами у изолятов *R. mucilaginosa* B10S1030CL2F и B10S10030CL1F (GenBank-номера PV240725.1, PV240734.1), а нуклеотидная последовательность изолятов Pf 13 и Pf 22 — 99 % гомологию с фрагментами нуклеотидных последовательностей штамма *R. mucilaginosa* strain JCM 8169 (GenBank-номер AV038074.1).

На основании этих результатов 26 дрожжевых изолятов были идентифицированы как *R. mucilaginosa*. Филогенетическое дерево было построено для всех выделенных штаммов и показано на рисунке 2.

Колонии всех изолятов, выращенных на среде ДАП, имели оттенок оранжево-красного цвета, были круглыми, выпуклыми, поверхность колоний была гладкой, края ровными, структура однородной (рис. 3). В бульоне Сабуро культивирование сопровождалось присутствием пленки, взвеси и помутнением среды. По отношению к кислороду изоляты были факультативными анаэробами. Наблюдались одноклеточные бластоконидии шаровидной или удлинённой формы. Гифы и псевдогифы отсутствовали. Оптимальная температура роста составляла 19-30 °С, слабый рост наблюдался при 35 °С, отсутствие роста — при 37-45 °С. Присутствие 50 и 60 % глюкозы, 10 % NaCl + 5 % глюкозы в среде оказало ингибирующее действие на рост штаммов.

Дрожжи были охарактеризованы в отношении ассимиляции сахаров — источников углерода. Все 26 изолятов *R. mucilaginosa* утилизировали глюкозу,

декстрозу, маннозу, раффинозу, сахарозу и фруктозу, 21 изолят — галактозу и цитрат, 18 — эскулин, 16 — инулин и сорбозу, 14 — глицерол, 13 — ксилозу, 12 — мелецитозу и салицин, 11 — трегалозу, 10 — L-арабинозу и мальтозу, 9 — D-арабинозу и целлобиозу, 5 —  $\alpha$ -метил-D-глюкозид, маннит и рамнозу (табл. 1).

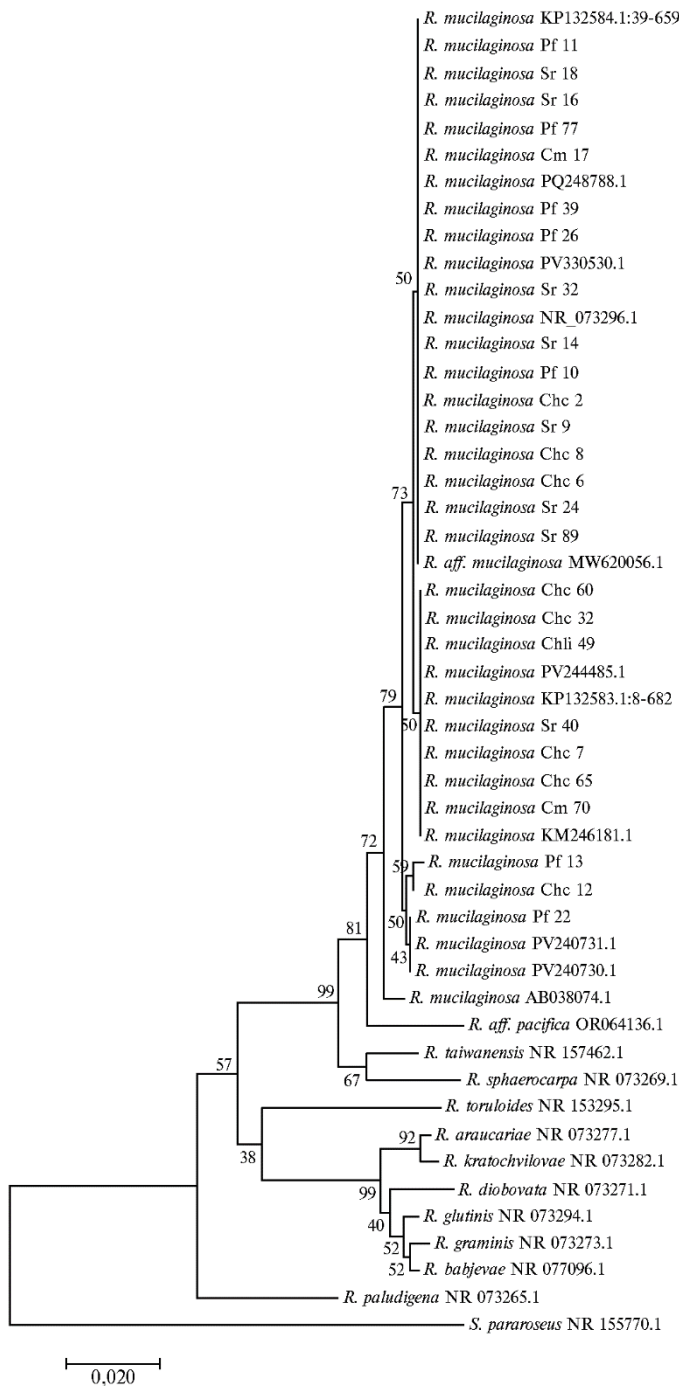
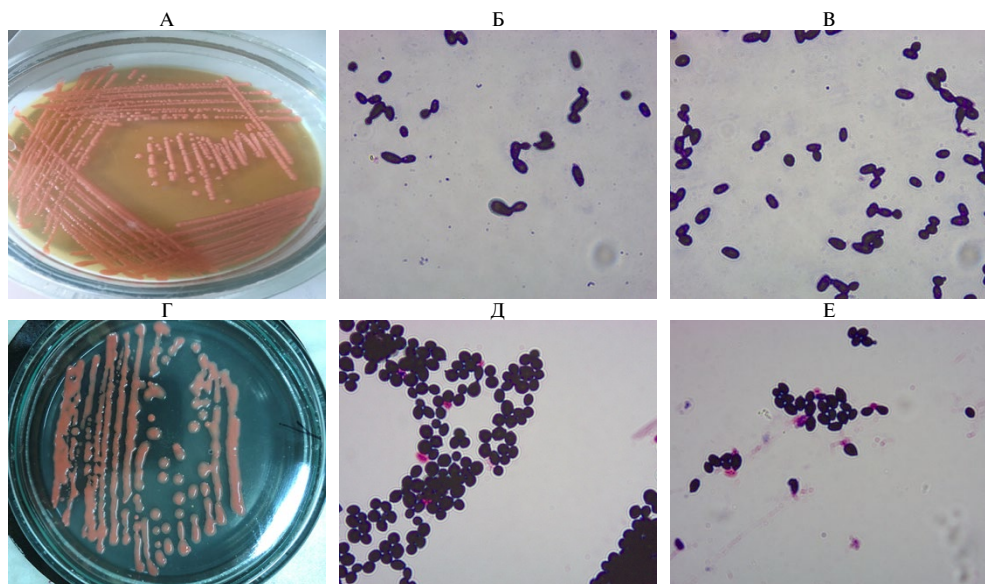


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей региона ITS1-5.8S-ITS4, демонстрирует положение изолятов, изученных в настоящей работе, среди референсных штаммов рода *Rhodotorula* из базы данных GenBank NCBI (программа MEGA v.11) (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2024 год).



**Рис. 3.** Морфология колоний (А, Г) и клеток (Б, В, Д, Е, Nikon ECLIPSE Ci-L, «Nicon», Япония, увеличение 100×16) изолятов *Rhodotorula mucilaginosa* Chli 49 (верхний ряд) и *R. mucilaginosa* Стс 65 (нижний ряд), выделенных из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы и культивируемых на среде ДАП (температура 30±1 °С) (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год).

**1. Способность дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*, выделенных из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы, утилизировать источники углерода ( $n = 26$ ; ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2024 год)**

Источник углерода	Число изолятов		Источник углерода	Число изолятов	
	«-»	«+»		«-»	«+»
Адонит	26	0	L-арабиноза	16	10
Арабитол	26	0	Мальтоза	16	10
Дульцит	26	0	Трегалоза	15	11
Инозит	26	0	Мелцитоза	14	12
Ксилитол	26	0	Салицин	14	12
Лактоза	26	0	Ксилоза	13	13
Мелибиоза	26	0	Глицерол	12	14
Натрия глюконат	26	0	Инулин	10	16
ONPG	26	0	Сорбоза	10	16
Сорбит	26	0	Гидролиз эскулина	8	18
Малонат	26	0	Галактоза	5	21
Эритрит	26	0	Цитрат	5	21
L-рамноза	26	0	Глюкоза	0	26
α-Метил-D-глюкозид	21	5	Декстроза	0	26
Маннит	21	5	Манноза	0	26
Рамноза	21	5	Раффиноза	0	26
D-Арабиноза	17	9	Сахароза	0	26
Целлобиоза	17	9	Фруктоза	0	26

Примечание. ONPG — орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид.

Наши данные свидетельствуют, что штаммы *R. mucilaginosa* могут использовать простые сахара, при этом D. Torres-Alvarez с соавт. (38) сообщали, что *R. mucilaginosa* может использовать и сложные сахара в качестве предшественников своего центрального метаболизма. *Rhodotorula* отличается от *Cryptococcus* неспособностью усваивать инозитол (38). Мы проанализировали способность выделенных изолятов утилизировать широкий спектр субстратов. В наших опытах штаммы *R. mucilaginosa* дали положительный результат в тесте на ассимиляцию таких сахаров, как глюкоза, сахароза, фруктоза, лактоза, что согласуется с данными, полученными К. Vegum с соавт. (39).

Размер клеток чаще всего характеризуют длинной и короткой осью, однако более объективно определять площадь эллипса. Также для характеристики формы определяли коэффициент удлиненности  $K_y$  — отношение длинной оси к короткой (40). Были определены размеры клеток, площадь и коэффициент удлиненности, которые зависят от штамма, возраста клеток, физиологического состояния и условий их культивирования. Клетки дрожжей были субшаровидными или яйцевидными, без спор. Размножение происходило многосторонним или полярным почкованием. Максимальную площадь клетки имели штаммы Chli 32 (4,364 мкм<sup>2</sup>) и Sr 16 (4,714 мкм<sup>2</sup>), наибольший коэффициент удлиненности — штаммы Pf 22 (1,821 при длине клетки 3,069±0,100 мкм и ширине 1,685±0,033 мкм) и Chc 8 (1,685 при длине 2,727±0,098 мкм и ширине 1,619±0,034 мкм). Штаммы Chc 65 и Pf 13 имели площадь клетки 4,121 и 4,298 мкм<sup>2</sup>, при этом  $K_y$  у них составлял 1,414; 1,520, соответственно форма клеток у этих штаммов была более вытянутой. Минимальную площадь клеток отмечали у штамма Chc 6 (1,786 мкм<sup>2</sup>). Штамм Chli 49 имел площадь клетки 2,37 мкм<sup>2</sup>, коэффициент удлиненности 1,13, длину и ширину соответственно 1,846±0,056 и 1,634±0,057 мкм (табл. 2).

**2. Морфологическая характеристика изолятов дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*, выделенных из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы ( $n = 85$ ,  $M \pm SEM$ ; ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2024 год)**

Изолят	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	$K_y$	Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>
Chli 32	2,748±0,216	2,022±0,218	1,359	4,364
Chli 49	1,846±0,056	1,634±0,057	1,130	2,370
Chc 65	2,724±0,075	1,926±0,051	1,414	4,121
Cm 17	1,944±0,035	1,843±0,038	1,055	2,814
Cr 32	1,982±0,054	1,321±0,027	1,501	2,056
Sr 40	2,630±0,166	1,660±0,078	1,584	3,429
Cm 70	2,642±0,135	1,676±0,085	1,576	3,478
Chc 60	2,767±0,085	1,696±0,063	1,632	3,685
Pf 10	1,788±0,046	1,678±0,041	1,065	2,356
Sr 18	2,069±0,051	1,588±0,038	1,303	2,580
Sr 89	1,944±0,035	1,554±0,066	1,251	2,373
Pf 26	1,798±0,094	1,506±0,062	1,194	2,127
Chc 6	1,847±0,063	1,231±0,049	1,500	1,786
Pf 11	2,223±0,048	1,476±0,035	1,506	2,577
Pf 77	2,251±0,054	1,806±0,052	1,246	3,193
Pf 39	2,226±0,087	1,644±0,077	1,354	2,875
Pf 13	2,884±0,076	1,897±0,044	1,520	4,298
Pf 22	3,069±0,100	1,685±0,033	1,821	4,062
Sr 16	2,794±0,116	2,148±0,053	1,301	4,714
Sr 24	2,383±0,124	1,862±0,137	1,279	3,485
Sr 9	2,117±0,086	2,025±0,086	1,045	3,367
Chc 12	2,034±0,103	2,077±0,116	0,980	3,319
Chc 2	2,621±0,084	1,678±0,054	1,562	3,453
Sr 14	1,893±0,046	1,394±0,040	1,357	2,073
Chc 8	2,727±0,098	1,619±0,034	1,685	3,466
Chc 7	1,501±0,034	1,736±0,051	0,864	2,046

Примечание.  $K_y$  — коэффициент удлиненности.

Образцы биомассы изолятов были проанализированы на содержание каротиноидов для оценки целесообразности их использования в биотехнологическом процессе и кормлении сельскохозяйственных животных и птицы. После разрушения дрожжевых клеток окрашенная фракция была связана с клеточным осадком. При дальнейшей экстракции ацетоном происходил выход окрашенных соединений (в том числе каротиноидов различной природы) в супернатант. На рисунке 4 приведены спектры УФ-видимого поглощения растворов с контрастным содержанием вторичных метаболитов каротиноидной природы.

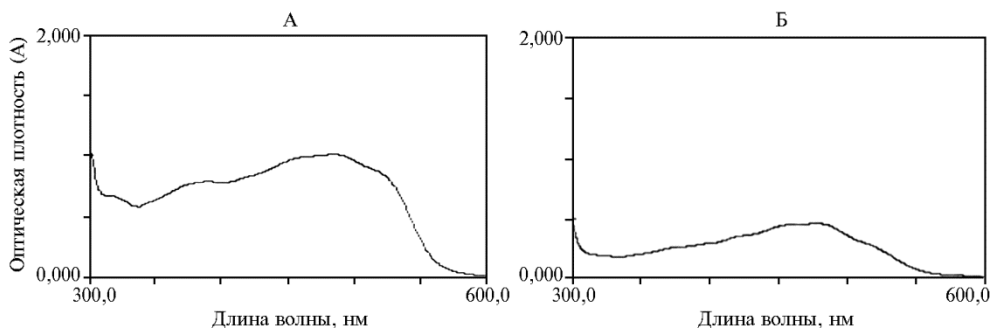


Рис. 4. Спектры поглощения раствора вторичных метаболитов в смеси гексан-этилацетат (50:50, о/о) для образцов изолята *Rhodotorula mucilaginosa* Chc 65 (А) и изолята Sr 16 (Б), выделенных из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2025 год).

В дальнейшем при анализе концентрации экстрагированных пигментов учитывали следующие характеристики: сырая биомасса (г); общий объем кислотно-ацетонового экстракта (мл); поглощение при  $\lambda = 450$  нм (опт. ед.) (наличие соединений  $\beta$ -каротиноидной природы); поглощение при  $\lambda = 509$  нм (опт. ед.) (наличие соединений группы торулина); поглощение при  $\lambda = 537$  нм (опт. ед.) (наличие соединений ретинола). Пример расчета суммарного содержания каротиноидов с учетом экспериментальных значений поглощения на реперных длинах волн приведен в таблице 3.

### 3. Расчет суммарного содержания каротиноидов в клеточной биомассе дрожжей изолята *Rhodotorula mucilaginosa* Pf 39, выделенного из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2025 год)

Показатель	Значение
Масса, г	15,28
Объем экстракта, мл	30,00
Поглощение при длинах волн, опт.ед.:	
$\lambda = 450$ нм	0,461
$\lambda = 537$ нм	0,187
$\lambda = 509$ нм	0,251
C1, мкг/мл	$3,9 \cdot 0,461 + 1,8 \cdot 0,187 - 3,6 \cdot 0,251 = 1,23$
C2, мкг/мл	$5,3 \cdot 0,254 - 6,7 \cdot 0,187 = 0,07$
C3, мкг/мл	$6,7 \cdot 0,187 - 1,1 \cdot 0,251 = 0,98$
Общая концентрация каротиноидов (C1 + C2 + C3), мкг/мл	2,28

### 4. Содержание каротиноидов в сырой биомассе изолятов дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*, выделенных из содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы ( $n = 5$ , $M \pm SEM$ ; ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2025 год)

Изолят	Содержание каротиноидов, мкг/г	Изолят	Содержание каротиноидов, мкг/г
Chli 32*	22,86±0,11	Pf 11	4,81±0,05
Chli 49*	21,71±0,09	Pf 77	4,24±0,05
Chc 65*	18,05±0,08	Pf 39	3,50±0,05
Cm 17*	15,08±0,08	Pf 13	3,35±0,04
Cr 32*	11,74±0,09	Pf 22	3,32±0,04
Sr 40*	11,24±0,10	Sr 16	3,00±0,04
Cm 70	9,61±0,09	Sr 24	2,66±0,03
Chc 60	7,25±0,07	Sr 9	1,95±0,03
Pf 10	6,33±0,08	Chc 12	1,90±0,02
Sr 18	6,28±0,07	Chc 2	1,77±0,01
Sr 89	6,19±0,08	Sr 14	1,74±0,02
Pf 26	5,89±0,07	Chc 8	0,81±0,02
Chc 6	5,03±0,05	Chc 7	0,24±0,01

Примечание. Звездочкой (\*) выделены образцы с наибольшим содержанием каротиноидов в сырой биомассе (более 10 мкг/г).

На основании представленных расчетов было определено общее

содержание каротиноидов, выделенных из разрушенной биомассы дрожжей *Rhodotorula* sp. (см. табл. 3). У всех проанализированных образцов преобладала β-каротиноидная природа соединений в целевой фракции экстракта (табл. 4). Ряд образцов содержал крайне мало каротиноидов (Chc 2, Chc 7, Chc 8). Были определены изоляты с максимальным содержанием каротиноидов — Chli 32, Chli 49, Chc 65, Cm 17, Cr 32, Sr 40.

Для вида *R. mucilagenosa* был ранее описан ряд штаммов с различной продуктивностью по каротиноидам. Например, в исследованиях R. Sharma (41) — 819,23 мкг/г; D. Torres-Alvarez с соавт. (38) — 317 мкг/г; Y.-T. Cheng и C.-F. Yang (42) — 376,3 мкг/г; T.V.D. Rodrigues с соавт. (43) — 121,3 мкг/г; K. Chreptowicz с соавт. (44) — 0,25-10,33 мг/л. Особенность вида состоит в существенной зависимости продукции как дрожжевой биомассы, так и каротиноидов, от метода культивирования (45). Данные по продуктивности каротиноидов штаммами *R. mucilagenosa* дают основания рассматривать полученные в настоящей работе изоляты как перспективный источник каротиноидов при оптимизации условий культивирования.

Таким образом, на основе молекулярно-генетического анализа (секвенирование региона 5.8S-ITS рДНК) 26 изолятов дрожжей, выделенных из желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных и птицы, были идентифицированы как *Rhodotorula mucilagenosa*, что подтверждено высокой (99 %) гомологией с референсными последовательностями из базы данных NCBI. Морфобиохимическая характеристика изолятов выявила значительную внутривидовую вариабельность. Все штаммы проявили способность к утилизации широкого спектра углеводов (глюкоза, сахароза, фруктоза и др.), демонстрируя метаболическую пластичность. Оптимальный температурный диапазон для роста составил 19–30 °С, что соответствует мезофильным условиям. Морфометрический анализ показал разнообразие размеров и формы клеток: площадь клеток варьировала от 1,786 мкм<sup>2</sup> (штамм Chc 6) до 4,714 мкм<sup>2</sup> (штамм Sr 16), а коэффициент удлинности — от 0,864 (штамм Chc 7) до 1,821 (штамм Pf 22). Спектрофотометрический анализ экстрактов из биомассы дрожжей, культивируемых в контролируемых условиях, позволил количественно определить содержание каротиноидов. Среди всех изолятов были выявлены шесть наиболее продуктивных штаммов: Chli 32 (22,86 мкг/г сырой биомассы), Chli 49 (21,71 мкг/г), Chc 65 (18,05 мкг/г), Cm 17 (15,08 мкг/г), Cr 32 (11,74 мкг/г) и Sr 40 (11,24 мкг/г). В экстрактах преобладали соединения β-каротиноидной природы. Эти 6 изолятов (Chli 32, Chli 49, Chc 65, Cm 17, Cr 32, Sr 40) отобраны для дальнейшего подбора условий культивирования и использования в составе кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птицы.

<sup>1</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр  
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,  
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,  
e-mail: dap2189@gmail.com ✉, vimikrob@mail.ru, kolodin77@mail.ru,  
majra\_2005@list.ru, voshaisreal@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
биотехнологии,  
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,  
e-mail: joseph.mikhel@yandex.ru;

<sup>3</sup>ФГБУН ГНЦ Российской Федерации  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН,

117997 Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,  
e-mail: barashkova.an@gmail.com, rea21@list.ru;

Поступила в редакцию  
31 июля 2025 года  
Принята к публикации  
29 сентября 2025 года

## SAPROPHYTIC YEAST *Rhodotorula mucilaginosa*: MOLECULAR IDENTIFICATION, MORPHOBIOCHEMICAL PROPERTIES AND CAROTENOID PRODUCTION

D.A. Nikanova<sup>1</sup>✉, O.A. Artemyeva<sup>1</sup>, E.N. Kolodina<sup>1</sup>, M.V. Dovydenkova<sup>1</sup>, K.A. Berezova<sup>1</sup>,  
I.M. Mikhel<sup>2, 3</sup>, A.S. Barashkova<sup>3, 4</sup>, E.A. Rogozhin<sup>3, 4</sup>

<sup>1</sup>Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail dap2189@gmail.com (✉ corresponding author), vimikrob@mail.ru, kolodin77@mail.ru, majra\_2005@list.ru, voshaisreal@yandex.ru;

<sup>2</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail joseph.mikhel@yandex.ru;

<sup>3</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, 16/10, ul. Miklukho-Maklaya, Moscow, 117997 Russia, e-mail barashkova.an@gmail.com, rea21@list.ru;

<sup>4</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail barashkova.an@gmail.com, rea21@list.ru

ORCID:

Nikanova D.A. orcid.org/0000-0001-5164-244X

Berezova K.A. orcid.org/0009-0005-9556-1947

Artemyeva O.A. orcid.org/0000-0001-7706-4182

Mikhel I.M. orcid.org/0000-0002-7930-8862

Kolodina E.N. orcid.org/0000-0002-4017-3390

Barashkova A.S. orcid.org/0000-0002-3455-2335

Dovydenkova M.V. orcid.org/0000-0002-3093-4117

Rogozhin E.A. orcid.org/0000-0003-0659-9547

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 23-16-00167

Final revision received July 31, 2025

doi: 10.15389/agrobiol.2025.6.1126eng

Accepted September 29, 2025

### Abstract

*Rhodotorula* is a genus of saprophytic yeasts of the family *Sporidiobolaceae*, widespread in air, soil, lakes, seawater, milk, food products, and capable of colonizing protozoa, plants, humans, and other mammals. Three species of *Rhodotorula* (*R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, and *R. minuta*) are considered opportunistic pathogens and are the most common coausative agents of infections in immunocompromised individuals. However, in recent years, *Rhodotorula mucilaginosa* yeasts have increasingly been used in biotechnology for carotenoid production and in feeding agricultural animals. Carotenoid pigments act as antioxidants and possess anticancer properties, including immunomodulatory and onco-protective effects, which contribute to the normalization of reproductive function, growth, and development in farm animals and poultry. This study provides the first comprehensive investigation of *R. mucilaginosa* yeasts isolated from the gastrointestinal tract of farm animals, including species identification based on the 5.8S-ITS rDNA fragment, assessment of intraspecific morphobiochemical variability, determination of optimal growth temperature, and identification of the most productive carotenoid-producing strains on a non-enriched medium. The aim of the study was to isolate pigmented yeasts from the gastrointestinal contents of farm animals and poultry, followed by species identification, cultivation, biomass production, assessment of the total carotenoid content and their concentration in biomass, as well as the identification of the most promising isolates for further use as components of a feed additive. Experiments were conducted from 2023 to 2025. Yeast isolates were obtained from the gastrointestinal tract contents of Black-and-White cattle, crossbred F<sub>2</sub> pigs (Large White × Landrace) × Duroc, and broiler chickens of the Smena 9 cross (Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry). Isolation was performed on Sabouraud dextrose agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India). For microscopic analysis, standard methylene blue staining was used to determine cell morphology. Morphological characteristics and culture purity were assessed using a Nikon ECLIPSE Ci-L light microscope (Nikon, Japan). The biochemical profile was determined using the KB009R HiCarbo test system (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) and specific sugars. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using a Mini Amp Plus thermal cycler (Thermo Fisher Scientific, Singapore). For amplification of the 5.8S-ITS rDNA fragment and determination of its primary nucleotide sequence, the ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primers were used. Pigments were extracted from samples containing frozen raw yeast biomass (5–20 g) from each isolate. Carotenoid content in the extracts was quantified spectrophotometrically using a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Corp., Japan). Absorption spectra were recorded in the 300–600 nm range. All isolates utilized glucose, dextrose, mannose, raffinose, sucrose, and fructose as carbon sources for fermentation. Colonies of all isolates grown on DAP medium exhibited an orange-red pigmentation, were round, convex, with smooth surfaces, even edges, and homogeneous structure. Optimal growth temperature ranged from 19 to 30 °C. The

largest cell areas were observed in strains Chli 32 (4.364  $\mu\text{m}^2$ ) and Sr 16 (4.714  $\mu\text{m}^2$ ), while the highest elongation coefficient (Ec) was found in strains Pf 22 (1.821 at 3.069 $\pm$ 0.100  $\mu\text{m}$  cell length and 1.685 $\pm$ 0.033  $\mu\text{m}$  width) and Chc 8 (1.685 at 2.727 $\pm$ 0.098  $\mu\text{m}$  length and 1.619 $\pm$ 0.034  $\mu\text{m}$  width). Strains Chc 65 and Pf 13 had cell areas of 4.121 and 4.298  $\mu\text{m}^2$ , respectively, with Ec values of 1.414 and 1.520, indicating a more elongated cell shape. The smallest cell area was recorded in strain Chc 6 (1.786  $\mu\text{m}^2$ ). Carotenoids were successfully extracted from the biomass of all isolates and analyzed spectrophotometrically. Based on the results, six isolates (Chli 32, Chli 49, Chc 65, Cm 17, Cr 32, Sr 40) were identified as having the highest carotenoid content (22.86; 21.71; 18.05; 15.08; 11.74; 11.24  $\mu\text{g/g}$  of raw biomass). These isolates seem to be the most promising for further optimization of cultivation parameters and enhancement of productivity.

Keywords: *Rhodotorula mucilaginosa*, extraction, organic solvents, carotenoids, spectrophotometric analysis.

## REFERENCES

1. Daudu R., Parker C., Singh N., Wood J., Debieu M., O'Hara N., Mason C., Venkateswaran K. Draft genome sequences of *Rhodotorula mucilaginosa* strains isolated from the International Space Station. *Microbiology Resource Announcements*, 2020, 9(31): e00570-20 (doi: 10.1128/MRA.00570-20).
2. Falces-Romero I., Cendejas-Bueno E., Romero-Gómez M.P., García-Rodríguez J. Isolation of *Rhodotorula mucilaginosa* from blood cultures in a tertiary care hospital. *Mycoses*, 2018, 61(1): 35-39 (doi: 10.1111/myc.12703).
3. Li Z., Li C., Cheng P., Yu G. *Rhodotorula mucilaginosa* — alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 2022, 8(11): e11505 (doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11505).
4. Gualberto N.C., Nogueira J.P., de Souza da Silva A., Barbosa P.F., Santana Matos C.M., Rajan M., Leite Neta M.T.S., Narain N. Optimization of the biotechnological process using *Rhodotorula mucilaginosa* and acerola (*Malpighia emarginata* L.) seeds for the production of bioactive compounds. *LWT*, 2022, 160(9): 113190 (doi: 10.1016/j.lwt.2022.113190).
5. Korumilli T., Susmita M. Carotenoid production by *Rhodotorula* sp. On fruit waste extract as a sole carbon source and optimization of key parameters. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering*, 2014, 33(3): 89-99 (doi: 10.30492/ijcce.2014.11344).
6. Tang W., Wang Y., Zhang J., Cai Y., He Z. Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(4): 507-517 (doi: 10.4014/jmb.1801.01022).
7. Kolpakova V.V., Ulanova R.V., Kulikov D.S., Gulakova V.A., Vasil'eva L.V., Berestovskaya Yu.Yu., Cheremnikh E.G., Ashikhmin A.A. *Yug Rossii: ekologiya, razvitiye*, 2022, 17(4): 61-78 (doi: 10.18470/1992-1098-2022-4-61-78) (in Russ.).
8. Rajan S., Garci G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (VNCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor. *Biotechnology Reports*, 2020, 25: e00407 (doi: 10.1016/j.btre.2019.e00407).
9. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *J. Nat. Med.*, 2019, 74(1): 1-16 (doi: 10.1007/s11418-019-01364-x).
10. Britton G., Hornero-Méndez D. Carotenoids and colour in fruits and vegetables. In: *Photochemistry of fruits and vegetables*. Tomás-Barberán F.A., Robins R.J. (eds.) Clarendon Press, Oxford, England, 1997: 11-27.
11. Nozière P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P., Doreau M. Carotenoids for ruminants: from forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 131(3-4): 418-450 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.06.018).
12. Kaulmann A., Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*, 2014, 34(11): 907-929 (doi: 10.1016/j.nutres.2014.07.010).
13. Savchik A.V., Novik G.I. *Pishchevaya promishlennost': nauka i tekhnologii*, 2020, 13(3): 70-83 (in Russ.).
14. Igreja W.S., Maia F.D.A., Lopes A.S., Chisté R.C. Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8819 (doi: 10.3390/ijms22168819).
15. Sathasivam R., Juntawong N. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *International Journal of Current Science*, 2013, 5: 67-73.
16. Danish Sharma M., Ritika K.K.V. Review article on nutritional and toxicological aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*). *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 2024, 14(3): 315-318 (doi: 10.52711/2231-5691.2024.00049).
17. Mashail A.A., Mahmoud I.E., Ismail E.I., Fayiz M.R., Mahmoud A., Khaled A.E., Asmaa S.A. Dietary supplementation with a mixture of *Dunaliella salina* and *Spirulina* enhances broiler performance by improving growth, immunity, digestive enzymes and gut microbiota. *Poultry Science*,

- 2024, 103(2): 103337 (doi: 10.1016/j.psj.2023.103337).
18. Kurek M.A., Aktaş H., Pokorski P., Pogorzelska-Nowicka E., Custodio-Mendoza J.A. A comprehensive review of analytical approaches for carotenoids assessment in plant-based foods: advances, applications, and future directions. *Applied Sciences*, 2025, 15(7): 3506 (doi: 10.3390/app15073506).
  19. Elfeky N., Elmahmoudy M., Zhang Y., Guo J., Bao Y. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* with a combined cultivation mode of nitrogen, sulfur, and aluminium stress. *Applied Sciences*, 2019, 9(12): 2444 (doi: 10.3390/app9122444).
  20. Zeng Y., Wang R., Liang J., Zhang H., Yi J., Liu Z. Strategies for recovery, purification and quantification of torularhodin produced by *Rhodotorula mucilaginosa* using different carbon sources. *Fermentation*, 2023, 9(9): 846 (doi: 10.3390/fermentation9090846).
  21. Dovidenkova M.V., Kolodina E.N., Nikanova D.A., Logvinova T.I., Artem'eva O.A. *Zhivotnovodstvo i kormoproizvodstvo*, 2024, 107(2): 149-169 (doi: 10.33284/2658-3135-107-2-149) (in Russ.).
  22. Gedela R., Venkata D.V., Pakshirajan K. Maximizing yield of lipids, carotenoids, and  $\beta$ -carotene in *Rhodotorula mucilaginosa* via optimized fermentation strategies. *Social Science Research Network*, 2024, 49(2): 118 (doi: 10.2139/ssrn.4920118).
  23. Mannazzu I., Landolfo S., Da Silva T.L., Buzzini P. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(11): 1665-1673 (doi: 10.1007/s11274-015-1927-x).
  24. Da Silva J., da Silva F.L.H., Ribeiro J.E.S., de Melo D.J.N., Santos F.A., de Medeiros L.L. Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 30(1): 101847 (doi: 10.1016/j.bcab.2020.101847).
  25. Allahkarami S., Sepahi A.A., Hosseini H., Razavi M.R. Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from pinaceae forest ecosystems and optimization of in vitro carotenoid production. *Biotechnology Reports*, 2021, 32: e00687 (doi: 10.1016/j.btre.2021.e00687).
  26. Landolfo S., Ianiri G., Camiolo S., Porceddu A., Mulas G., Chessa R., Zara G., Mannazzu I. CAR gene cluster and transcript levels of carotenogenic genes in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Microbiology*, 2018, 164(1): 78-87 (doi: 10.1099/mic.0.000588).
  27. Hu P., Mao J., Zeng Y., Sun Z., Deng H., Chen C., Sun W., Tang Z. Isolation, identification, and function of *Rhodotorula mucilaginosa* TZR2014 and its effects on the growth and health of weaned piglets. *Front. Microbiol.*, 2022, 13: 922136 (doi: 10.3389/fmicb.2022.922136).
  28. Soares D.F.V., Duarte E.R., de Sá H.C.M., de Moraes N.S.L., Júnior V.S.M., Sedlmayer T.G.S.C., Pereira W.A.B., de Lima L.S. Effects of rehydrated corn silage inoculated with *Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum* on finisher lambs fed a tropical hay-based diet. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2025, 57(4): 186 (doi: 10.1007/s11250-025-04434-3).
  29. Duarte E.R., Lima S.M., Freitas C.E.S., Maia H.A.R., Matins-Júnior V.S., Abro F.O., Alves J.M.S., Santos V.L., Geraseev L.C., Cota J. Yeasts isolates from bovine rumen can improve the in vitro digestibility of *Urochloa decumbens*. *Braz. J. Biol.*, 2025, 84: e288025 (doi: 10.1590/1519-6984.288025).
  30. Coutinho J.O.P.A., Peixoto T.S., de Menezes G.C.A., Carvalho C.R., Ogaki M.B., Gomes E.C.Q., Rosa C.A., Rosa L.H., Arantes R.M.E., Nicoli J.R., Tiago F.C.P., Martins F.S. In vitro and in vivo evaluation of the probiotic potential of antarctic yeasts. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2021, 13(5): 1338-1354 (doi: 10.1007/s12602-021-09758-8).
  31. Coutinho J.O.P.A., Quintanilha M.F., Campos M.R.A., Ferreira E., de Menezes G.C.A., Rosa L.H., Rosa C.A., Vital K.D., Fernandes S.O.A., Cardoso V.N., Nicoli J.R., Tiago F.C.P., Martins F.S. Antarctic strain of *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 18,377 attenuates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2022, 14(3): 486-500 (doi: 10.1007/s12602-021-09817-0).
  32. Ge Y., Huang K., Xie W., Xu C., Yao Q., Liu Y. Effects of *Rhodotorula mucilaginosa* on the immune function and gut microbiota of mice. *Front. Fungal Biol.*, 2021, 2: 705696 (doi: 10.3389/ffunb.2021.705696).
  33. Kang K., Deng X., Xie W., Chen J., Lin H., Chen Z. *Rhodotorula mucilaginosa* ZTHY2 attenuates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Animals*, 2023, 13(21): 3376 (doi: 10.3390/ani13213376).
  34. Rose R., Golosova O., Sukhomlinov D., Tiunov A., Prosperi M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*, 2019, 35(11): 1963-1965 (doi: 10.1093/bioinformatics/bty901).
  35. *The yeasts, a taxonomic study*. 5th ed. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout (eds.). Elsevier B.V., Amsterdam, 2011.
  36. HiMedia Laboratories. *HiBio-ID Instruksiya po primeneniyu — Nabori dlya identifikatsii mikroorganizmov* [HiBio-ID Instructions for use — Microorganism identification kits]. Available: <https://himedialabs.ru/literat?ysclid=mdroopguqr950304055>. Accessed: 02/13/2024.
  37. Chervyakova O.P., Shakir I.V., Panfilov V.I., Kuznetsov A.E., Suyasov N.A. *Sposob polucheniya biomassi karotinsinteziruyushchikh mikroorganizmov. 2553213 C2 (RU) RKhTU im. D.I. Mendeleeva (RF) 2012122156/10 Zayavl. 30.05.2012. Opubl. 10.06.2015. Byul. № 16* [Method for obtaining biomass

- of carotene-synthesizing microorganisms. 2553213 C2 (RU) RKhTU im. DI. Mendeleev (RF) 2012122156/10 Appl. 05/30/2012 Publ. 06/10/2015. Bull. No. 16] (in Russ.).
38. Torres-Alvarez D., León-Buitimea A., Albalade-Ramírez A., Rivas-García P., Hernández-Núñez E., Morones-Ramírez J.R. Conversion of banana peel into diverse valuable metabolites using an autochthonous *Rhodotorula mucilaginosa* strain. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 96 (doi: 10.1186/s12934-022-01834-0).
  39. Begum K., Shahid M.S., Ferdoush S., Nur F. Phenotypic identification and antifungal susceptibility of two *Rhodotorula* species isolated from dandruff samples. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 19(2), 185-190 (doi: <https://doi.org/10.3329/dujps.v19i2.50635>).
  40. Kuznetsova T.A., Ivanchenko O.B. *Nauchnyy zhurnal NIU ITMO. Seriya: Protsessy i apparaty pishchevikh proizvodstv*, 2020, 1(43): 39-46 (doi: 10.17586/2310-1164-2020-10-1-39-46) (in Russ.).
  41. Sharma R., Ghoshal G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: a statistical approach. *Biotechnology Reports*, 2020, 25: e00407 (doi: 10.1016/j.btre.2019.e00407).
  42. Cheng Y.-T., Yang C.-F. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016, 61: 270-275 (doi: 10.1016/j.jtice.2015.12.027).
  43. Rodrigues T.V.D., Teixeira E.C., Macedo L.P., Dos Santos G.M., Burkert C.A.V., de Medeiros Burkert J.F. *Agroindustrial byproduct*-based media in the production of microbial oil rich in oleic acid and carotenoids. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2022, 45(4): 721-732 (doi: 10.1007/s00449-022-02692-1).
  44. Chreptowicz K., Mierzejewska J., Tkáčová J., Mlynek M., Čertik M. Carotenoid-producing yeasts: identification and characteristics of environmental isolates with a valuable extracellular enzymatic activity. *Microorganisms*, 20197(12): 653 (doi: 10.3390/microorganisms7120653).
  45. Li Z., Li C., Cheng P., Yu G. *Rhodotorula mucilaginosa*-alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 2022, 8(11): e11505 (doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11505).