УДК 664.872 doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1172rus

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО КОНЦЕНТРАТА ИЗ ДРОЖЖЕВОЙ БИОМАССЫ *Kluyveromyces marxianus* Van der Walt (1965)

И.А. ФОМЕНКО, И.А. ДЕГТЯРЕВ, Л.А. ИВАНОВА, Н.Г. МАШЕНЦЕВА ✉

Недостаток белка в рационе влечет за собой нарушение азотистого обмена. По оценкам экспертов, к 2024 году рынок кормовых протеинов превысит 200 млрд долларов США. В России дефицит кормовых протеинов составляет более 1 млн т. Традиционные источники белка не в состоянии удовлетворить суточную потребность в пищевом и кормовом протеинах по экономическим и социальным причинам, поэтому растет интерес к источникам альтернативного белка. Настоящее сообщение представляет результаты получения белкового концентрата на основе биомассы термотолерантных дрожжей *K. marxianus*, выращиваемой на малоиспользуемом в биоконверсии отходе масличного производства — лузге подсолнечника. Дрожжи этого вида повышают усвояемость кормов, используются в пищевой промышленности при ферментации соевого молока, мягкого сыра и в качестве усилителя вкуса. Целью исследования была разработка технологии получения белкового концентрата из дрожжевой биомассы *K. marxianus* и обоснование целесообразности его применения в качестве кормовой и пищевой добавки. Штамм *K. marxianus* Y-4570 отобран в результате скрининга на ферментолизате подсолнечной лузги как наиболее продуктивный по накоплению биомассы (до 30 г/л) и сырого протеина (59,29±2,96 %). Для получения белковой биомассы дрожжи культивировали многоцикличным полунепрерывным способом в лабораторном ферментере на солевой среде с ферментолизатом лузги подсолнечника. Были определены технологические параметры, позволяющие получить белковый концентрат, содержащий не менее 60 % истинного белка, не более 2 % липидов и не более 2 % нуклеиновых кислот. Биомассу обезжиривали 60 % этиловым спиртом с гидромодулем 1:2,5 при температуре 60 °С в течение 1 ч. Остаточное содержание липидов — 1,94±0,09 %. Денуклеинизацию проводили методом активации собственных эндонуклеаз клетки при температуре 40-60 °С. Нуклеиновые кислоты удаляли при температуре 50 °С, гидромодуле 1:7 в течение 1 ч. Остаточное содержание нуклеиновых кислот — 1,97±0,10 %. Готовый продукт содержит 65,94±3,14 % истинного белка, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к белковым концентратам. Анализ аминокислотного состава белкового концентрата показал, что содержание практически всех незаменимых аминокислот превосходит таковое в исходной дрожжевой биомассе, за исключением глицина, лейцина и гистидина. За счет уменьшения содержания липидов и нуклеиновых кислот, а также за счет концентрирования веществ, содержащихся в исходной биомассе при уменьшении массовой доли влаги на этапе высушивания, происходит относительное увеличение содержания аминокислот. Белковый концентрат на основе биомассы дрожжей *K. marxianus* Y-4570 предназначен для использования в качестве кормовой и пищевой добавки с целью обогащения продуктов незаменимыми аминокислотами.

Ключевые слова: белковый концентрат, белок, липиды, нуклеиновые кислоты, *Kluyveromyces marxianus*, дрожжи, денуклеинизация, обезжиривание, идеальный белок.

В животноводстве в настоящее время вводятся ограничения на применение кормовых антибиотиков, поэтому все большее внимание привлекают белковые препараты для улучшения здоровья и ускорения роста сельскохозяйственных животных (1). В качестве источника полноценного белка можно рассматривать базидиальные грибы (*Basidiomycetes*). Однако грибы, выращенные в природных условиях, способны накапливать токсичные тяжелые металлы (2, 3), поэтому в промышленных условиях шампиньоны и вешенки выращивают на искусственных грунтах. Главным недостатком грибов является относительно низкое содержание белка — 16,47-36,96 % (4), хотя этот показатель у шампиньонов и вешенок примерно в 2 раза выше, чем у овощных культур (5). Водоросли богаты белком (в среднем до 60-65 % сухого вещества) (6) и содержат биологически активные вещества, благотворно влияющие на здоровье человека и животных (витамины, минеральные соединения, антиоксиданты) (7). Но стоит учитывать, что водоросли в природных условиях, подобно шампиньонам и вешенкам, способны аккумулировать тяжелые металлы из окружающей среды, поэтому водоросли

тоже нельзя рассматривать как полноценную замену традиционных источников белка (8). Среди белково-масличных культур по урожайности лидирует соя, однако дискуссии о вреде сои для организма человека не прекращаются: ее употребление связывают с возникновением онкологических заболеваний и появлением аллергических реакций (9, 10).

Ассортимент дрожжевых кормовых препаратов достаточно широк. Дрожжи вводят в рацион сельскохозяйственных животных прежде всего для обогащения кормов незаменимыми аминокислотами, в частности лизином (1, 11). Можно получить дрожжевую кормовую добавку на отходах переработки картофеля (12) и при ферментации подсырной сыворотки дрожжами *Kluyveromyces fragilis* (13). Некоторые дрожжи обладают лечебно-профилактическим действием на человека и животных (14). Введение препаратов белка дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в корма способствует увеличению количества ворсинок в кишечнике и повышению продуктивности животных (15-18). Применение дрожжей *Kluyveromyces marxianus* в качестве кормовой добавки в рыбоводстве позволило заменить до 40 % белка дорогостоящей рыбной муки без потери в показателях роста лосося (19). Дрожжи — перспективная биологически активная кормовая и пищевая добавка (20). Они накапливают до 60 % белка в сухой массе, содержат витамины группы В (21, 22), некоторые виды, в частности *Saccharomyces cerevisiae*, служат богатым источником эргостерина (23).

При производстве белка с помощью микробного синтеза к неоспоримым преимуществам относится использование в качестве питательной среды дешевых субстратов (24, 25) — подсырной сыворотки (13), лигноцеллюлозосодержащих отходов и продуктов переработки целлюлозосодержащего сырья (26). Показана возможность выращивать дрожжевую биомассу на курином помете, что позволяет утилизировать токсичные для окружающей среды отходы птицеводства (27). Микробиологическая биоконверсия отходов АПК в белковые продукты снижает негативное воздействие на окружающую среду (28).

Наряду с биологически ценным белком и витаминами дрожжи синтезируют органические кислоты, многоатомные спирты и ферменты (29). Однако в дрожжевых препаратах необходимо контролировать содержание липидов и нуклеиновых кислот (30). Липиды становятся причиной возникновения неприятного вкуса, запаха, так как вступают в реакции окисления, а нуклеиновые кислоты содержат азот, который накапливается в виде уратов, вызывая мочекаменную болезнь (30).

Kluyveromyces marxianus — аскомицетовые дрожжи с выраженными термотолерантными свойствами, применяемые в биотехнологической промышленности для производства ферментов, в частности инулиназы, β-галактозидазы и пектиназы (31). *K. marxianus* также используют в сельском хозяйстве и в пищевой промышленности, в том числе для получения этанола, ароматических соединений и в качестве заквасочных культур (32-35). Ряд данных подтверждает безопасность дрожжей рода *Kluyveromyces* для здоровья человека и животных (36, 37).

Основные причины, сдерживающие промышленное производство микробного белка с применением дрожжевых грибов, — дороговизна существующих технологий из-за дорогостоящего оборудования и значительных энергозатрат при ферментации. Для пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и используемых в сельском хозяйстве для микробиологического синтеза дрожжей родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis* оптимальная для роста температура составляет 28-32 °С (1), тогда как у *K. marxianus* — 34-40 °С При

культивировании дрожжей выделяется большое количество тепла, поэтому выгоднее охлаждать среду в биореакторе до более высокой температуры, снижая расход теплоносителя. Кроме того, с точки зрения биоконверсии отходов и снижения затрат важно расширять сырьевую базу такого производства.

Настоящее сообщение представляет результаты получения белкового концентрата на основе биомассы термотолерантных дрожжей *K. marxianus*, выращиваемой на малоиспользуемом в биоконверсии отходе масличного производства — лузге подсолнечника. Штамм, отобранный при скрининге на питательной среде, содержащей ферментолизат лузги подсолнечника, накапливает 59,29±2,96 % сырого протеина, выход биомассы достигает 30 г/л.

Целью исследования была разработка технологии получения белкового концентрата из дрожжевой биомассы *K. marxianus* и обоснование целесообразности его применения в качестве кормовой и пищевой добавки.

Методика. Подсолнечную лузгу измельчали до размера частиц 30-100 мкм (роторная ударная мельница Retsch SR 200, «RETSCH GmbH», Германия), который контролировали с помощью анализатора частиц HELOS (H3908) & RODOS/L, R5 («Sympatec GmbH», Германия). Измельченные частицы делигнифицировали (суспендировали в 4 % растворе NaOH при гидромодуле 1:8,5; инкубировали при 125±1 °C в течение 2 ч и отделяли экстрагент центрифугированием). Полученный влажный осадок делигнифицированной лузги суспендировали в воде и подвергали ферментативному гидролизу при 50±1 °C (pH 5,0±0,1) в течение 24 ч (ферментный препарат RovabioMax AP, «Adisseo France S.A.S.», Франция; целлюлолитическая активность 1900 ед. ЦС/г по ГОСТ Р 55293-2012, ксиланазная активность 23500 ед. КС/г по ГОСТ Р 55302-2012; дозу препарата определяли из расчета 35 ед. целлюлазной активности ЦлС/г сырья). Через 24 ч суспензию центрифугировали, ферментолизат использовали в качестве субстрата.

Биомассу дрожжей штамма *Kluyveromyces marxianus* Y-4570 (получен из коллекции НБЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика, г. Москва) получали глубинным культивированием на среде следующего состава: $NH_4H_2PO_4$ — 0,50 %, $MgSO_4$ — 0,10 %, KH_2PO_4 — 0,06 %, дрожжевой экстракт — 0,20 %, ферментолизат лузги подсолнечника (8 % по СВ) — до 100 %.

Дрожжи культивировали многоцикличным полунепрерывным способом в лабораторном ферментере MD-300 («L.E. MARUBISHI», Япония), аэрация — 1 v/(v · мин) (объем воздуха к объему питательной среды), температура 38±1 °C, pH 5,0 (титрантом служил 25 % водный раствор аммиака; защелачивание среды свидетельствовало о необходимости подпитывать культуру свежим ферментолизатом). В качестве посевного материала использовали дрожжевую суспензию (4 %), полученную в колбах на жидкой среде Сабуро (5×10^6 клеток/мл, подсчет при помощи камеры Горяева). После 10 сут культивирования биомассу дрожжей отделяли при 5000 об/мин в течение 15 мин на лабораторной центрифуге (MLWT23D, «ООО Medtehnika-Servis», Украина).

Количество сухого вещества в образцах определяли весовым методом, высушивая навески до постоянной массы при 105 °C. Содержание сырого протеина в полученной биомассе измеряли по Кьельдалю (38) с использованием автоматической установки LK-500 для отгонки по методу Кьельдаля (ЗАО «Лабораторное Оборудование и Приборы», Россия). Анализируемую пробу минерализовали, аммиак отгоняли в течение 10 мин в

аппарате Парнаса-Вагнера (ПАО «Химлаборприбор», Россия). Избыток кислоты из приемной колбы титровали 0,1 н. раствором гидроксида натрия из микробюретки. Истинный белок определяли по методу Барнштейна: образовавшийся осадок фильтровали, промывали и определяли в нем количество азота по методу Кьельдаля (48). Липиды определяли по Фолчу (39), осуществляя отгонку в приборе для отгонки жидкостей (НПО «Лаборкомплект», Россия), а затем высушивая до постоянной массы в сушильном шкафу ШС-80-01 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия), нуклеиновые кислоты — по Спирину с использованием спектрофотометра ССП-715 (ЗАО «Спектроскопические системы», Россия) (40).

Анализ аминокислотного состава проводили методом капиллярного электрофореза (система Капель-105М, ООО «Люмэкс», Россия; методика М-04-38-2009 изменениями № 1 от 01.02.2010 в соответствии с рекомендациями производителя).

Для обезжиривания дрожжевую биомассу экстрагировали этиловым спиртом (спирт пищевой «Люкс» из зернового сырья; 40, 60 и 70 %) в соотношении биомасса:этанол 1:1,5; 1:2,0 и 1:2,5 в три приема по 20 мин (последовательно приливали соответствующее количество спирта через каждые 20 мин, суммарно 60 мин) при 50, 60 и 70 °С на водяной бане TW-2.02 («Elmi», Латвия). Частично обезжиренную биомассу высушивали в сушильном шкафу до постоянной массы. Количество экстрагированных липидов определяли по разности между исходной сухой биомассой дрожжей и обезжиренной биомассой.

Денуклеинизация дрожжевой биомассы происходила под действием собственных ферментов, которые активируются при температуре 50-70 °С. Длительность инкубации на водяной бане — от 30 мин до 1,5 ч, гидромодуль 1:3, 1:5 и 1:7.

Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 23.0 («StatSoft, Inc.», США). Все измерения выполняли в 3 повторностях. Результаты представлены в виде взвешенного среднего (*WAM*, weighted arithmetic mean) со стандартным отклонением (±SD). Статистическую достоверность рассчитывали с применением непараметрических U-критерия Манна-Уитни и H-критерия Краскела-Уоллиса. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты. В ферментолизате подсолнечной лузги, использованном для выращивания *K. marxianus* Y-4570, количество сухих веществ составило 7,0-8,0 %, редуцирующих веществ (по Бертрану) — 3,0-3,5 %, глюкозы — 69,65±3,48 %, целлобиозы — 16,08±0,80 %, высших сахаров — 14,27±0,71 %.

Полученная в результат биомасса *K. marxianus* Y-4570 содержала 59,29±2,96 % сырого протеина, 13,45±0,67 % липидов и 8,85±0,44 % нуклеиновых кислот. Остаточное количество липидов и нуклеиновых кислот в белковых препаратах, ухудшающее их сохранность и провоцирующее образование камней, не должно превышать 2,00 % (30).

Принципиальное отличие нашей методики от подобных заключается в применении пищевого этилового спирта (95 %) для удаления липидов. Для этой цели чаще всего пользуются методом Фолча, экстрагируя липиды смесью хлороформ:метанол (2:1 v/v) (41). Для получения белка пищевого назначения целесообразно использовать этиловый спирт без хлороформа, при этом количество экстрагированных липидов не сильно отличалось по сравнению с методом Блая-Даера, где для экстракции помимо эти-

лового спирта применяется хлороформ: соответственно 33,04±0,16 % без хлороформа против 33,18±0,24 % с хлороформом по методу Блая-Даера (42).

При повышении концентрации этанола количество экстрагированных липидов увеличивалось, достигая максимума при обработке биомассы дрожжей 70 % этиловым спиртом (табл. 1). Однако предпочтительнее использовать 60 % этиловый спирт: в варианте с 40 % этанолом удаляется недостаточное количество липидов, а использование 70 % спирта увеличивает затраты при том, что количество экстрагированных липидов различается лишь на 1-2 %. Под действием 60 % этилового спирта (1:2,5 v/v) удавалось удалить до 80 % липидов. Кроме того, можно удалить большое количество липидов, если биомассу предварительно обработать ультразвуком (43).

1. Количество липидов (от исходного содержания, %)**, экстрагированных из дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus* в зависимости от условий экстракции** (n = 27, *WAM*±SD, лабораторный опыт)

Температура и концентрация этилового спирта	Гидромодуль		
	1:1,5	1:2,0	1:1,5
50 °C:			
40 %	72,41±3,62^{Aa}	74,18±3,70^{Ab}	75,02±3,75^{Ac}
60 %	74,24±3,71^{Bb}	75,24±3,76^{Bc}	77,70±3,88^{Bd}
70 %	75,12±3,75^{Cc}	76,30±3,81^{Cd}	78,52±3,92^{Cf}
60 °C:			
40 %	75,46±3,77^{Ca}	76,74±3,83^{Cb}	82,90±4,14^{Dd}
60 %	76,18±3,80^{Cb}	78,10±3,90^{Dc}	85,57±4,27^{Ee}
70 %	77,12±3,85^{Dc}	81,32±4,06^{Ed}	86,46±4,32^{Ee}
70 °C:			
40 %	78,54±3,92^{Da}	82,15±4,10^{Ec}	87,17±4,35^{Fe}
60 %	79,60±3,90^{Db}	83,47±4,17^{Fd}	87,89±4,39^{Fe}
70 %	81,04±4,05^{Ec}	84,30±4,21^{Fd}	89,55±4,47^{Gf}

$^{A-G}$ Различия между значениями в столбце статистически значимы и достоверно различаются при $p < 0,05$.
$^{a-f}$ Различия между столбцами статистически значимы и достоверно различаются при $p < 0,05$.

С повышением температуры количество экстрагированных липидов увеличивалось (см. табл. 1). При 70 °C удалялось наибольшее количество липидов (но экономически этот температурный режим невыгоден), при 50 °C — наименьшее. Поэтому выбрали температуру 60 °C.

После выбора концентрации этанола и температуры определили соотношение этанол:биомасса для экстракции наибольшего количества липидов. Для этого использовали этиловый спирт в объемном соотношении с биомассой 1:1,5; 1:2,0 и 1:2,5. Оптимальным для обезжиривания 60 % этиловым спиртом при 60 °C оказалось соотношение 1:2,5 (см. табл. 1), при этом количество экстрагированных липидов составило 85,57±4,27 % (для пропорций 1:1,5 и 1:2,0 удалялось меньше липидов, и их остаточное количество составляло более 2,0 %). В аналогичном исследовании предлагались следующие параметры: соотношение биомасса:этанол 1:40, 135 °C и P = 1,5 МПа (44). В этом случае недостатком является большой расход экстрагента, высокая температура, из-за чего нарушается аминокислотный состав белкового концентрата, а также применение избыточного давления, что в целом сопряжено с дополнительными расходами.

Таким образом, учитывая полученные данные, технологическими параметрами для экстракции липидов мы предлагаем считать соотношение дрожжевая биомасса:60 % этиловый спирт — 1:2,5 при температуре 60 °C. При таких параметрах удается снизить остаточное содержание липидов до 1,94±0,09 %. В одной из работ сообщалось о получении белкового концентра из пекарских дрожжей, в котором количество остаточных липидов после экстракции составило 6,47 % (45).

Наибольшее влияние на количество экстрагированных нуклеиновых

кислот оказывает температура экстракции (факторная нагрузка 0,700).

При выборе температуры и длительности денуклеинизации биомассу дрожжей с водой (гидромодуль 1:7) выдерживали при температуре 40, 50 и 60 °С в водяной бане в течение 0,5; 1 и 1,5 ч. При 40 °С удалялось меньше нуклеиновых кислот, чем при 50 и 60 °С (см. табл. 2). Можно сделать вывод, что с ростом температуры до определенного значения активность собственных ферментов дрожжей будет повышаться (при 40 °С она меньше, чем при 50 °С), но при температуре 60 °С ферменты инактивируются. Сообщалось, что при 70 °С остаточное количество нуклеиновых кислот равняется примерно 3,00 %, но при этом уменьшалось количество лизина: при температуре 50 °С на нуклеиновые кислоты будет приходиться примерно 2,50 %, и в то же время потери лизина будут не столь значительными (46).

2. Количество нуклеиновый кислот (от исходного содержания, %)**, экстрагированных из дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus* в зависимости от условий экстракции** (n = 27, WAM±SD, лабораторный опыт)

Температура и длительность экстракции	Гидромодуль		
	1:3	1:5	1:3
40 °С:			
0,5 ч	$56{,}32\pm2{,}81^{Aa}$	$58{,}75\pm2{,}93^{Ab}$	$59{,}60\pm2{,}98^{Ab}$
1,0 ч	$58{,}60\pm2{,}93^{Bb}$	$60{,}12\pm3{,}00^{Bd}$	$64{,}02\pm3{,}20^{Be}$
1,5 ч	$62{,}75\pm3{,}13^{Cc}$	$65{,}43\pm3{,}27^{Ce}$	$66{,}05\pm3{,}30^{Ce}$
50 °С:			
0,5 ч	$67{,}89\pm3{,}39^{Da}$	$68{,}98\pm3{,}44^{Db}$	$70{,}25\pm3{,}51^{Dc}$
1,0 ч	$69{,}34\pm3{,}46^{Eb}$	$71{,}30\pm3{,}56^{Ed}$	$77{,}74\pm3{,}88^{Ee}$
1,5 ч	$70{,}02\pm3{,}50^{Ec}$	$72{,}46\pm3{,}62^{Ed}$	$79{,}88\pm3{,}99^{Ef}$
60 °С:			
0,5 ч	$66{,}16\pm3{,}30^{Da}$	$67{,}18\pm3{,}35^{Db}$	$68{,}07\pm3{,}40^{Cc}$
1,0 ч	$67{,}25\pm3{,}36^{Db}$	$68{,}93\pm3{,}44^{Dc}$	$69{,}74\pm3{,}48^{Dd}$
1,5 ч	$68{,}73\pm3{,}43^{Ec}$	$69{,}80\pm3{,}49^{Dd}$	$70{,}10\pm3{,}50^{Df}$

$^{A-D}$ Различия между значениями в столбце статистически значимы и достоверно различаются при $p < 0{,}05$.
$^{a-f}$ Различия между столбцами статистически значимы и достоверно отличаются при $p < 0{,}05$.

Завершающим этапом стало определение оптимальной длительности денуклеинизации, в нашем опыте она составила 1,0 ч (см. табл. 2). При 50 °С и гидромодуле 1:7 в течение 1 ч удалялось до 77,74±3,88 %. Таким образом, выбранные параметры денуклеинизации дрожжевой биомассы: 50 °С, гидромодуль 1:7, длительность гидролиза 1,0 ч.

3. Биохимический состав (от сухого вещества, %) **исходной дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus* и полученного на ее основе белкового концентрата после экстракции липидов и нуклеиновых кислот по разработанной технологии** (n = 8, WAM±SD, лабораторный опыт)

Показатель	Биомасса	Белковый концентрат
Сырой протеин	$59{,}29\pm2{,}96^{Aa}$	$71{,}65\pm3{,}43^{Bb}$
Истинный белок	$54{,}60\pm2{,}73^{Aa}$	$65{,}94\pm3{,}14^{Cc}$
Липиды	$13{,}45\pm0{,}67^{Da}$	$1{,}94\pm0{,}09^{Fd}$
Нуклеиновые кислоты	$8{,}85\pm0{,}44^{Ea}$	$1{,}97\pm0{,}10^{Fd}$

$^{A-F}$ Различия между значениями в столбце статистически значимы и достоверно различаются при $p < 0{,}05$.
$^{a-d}$ Различия между столбцами статистически значимы и достоверно различаются при $p < 0{,}05$.

M.T.B. Pacheco с соавт. (47) разработали технологию для производства белкового концентрата из пекарских дрожжей с содержанием истинного белка в среднем около 75,0 %, для чего применяли соли — перхлорат натрия и триметафосфат натрия. В этой связи отметим, что есть сообщения о негативном влиянии перхлората натрия на функцию щитовидной железы (48). В нашей работе для получения концентрата использовался этиловый спирт и собственные эндонуклеазы дрожжей. В аналогичной работе автолизат, полученный из дрожжей *K. marxianus* и *S. cerevisiae*, сравнили по био-

химическому составу (49). Биомасса *K. marxianus* содержит большое количество нуклеиновых кислот — около 10 %, 56 % истинного белка, *S. cerevisiae* — примерно 9 % нуклеиновых кислот и 57 % истинного белка (30). В нашей работе (табл. 3) количество липидов в дрожжевой биомассе *K. marxianus* составило 13,45±0,67 %, нуклеиновых кислот — 8,85±0,44 %, в белковом концентрате — соответственно 1,94±0,09 % липидов, нуклеиновых кислот — 1,97±0,10 %.

Белок дрожжевой биомассы *K. marxianus* характеризовался сниженным содержанием лизина, треонина и серосодержащих аминокислот (табл. 4). Однако полученный белковый концентрат был практически полностью сбалансирован по всем незаменимым аминокислотам, кроме серосодержащих аминокислот, фенилаланина и тирозина. При обработке биомассы с выбранными технологическими параметрами удалось значительно увеличить содержание лизина, треонина, серина, аргинина, пролина, глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, однако по сравнению с исходной биомассой снизилось количество лейцина, гистидина и глицина. Относительное увеличение содержания аминокислот происходило за счет уменьшения содержания липидов и нуклеиновых кислот, а также удаления влаги на этапе высушивания. По сравнению с исходной биомассой содержание лизина увеличилось на 1,75 %, треонина — на 0,50 %, серина — на 0,62 %, аргинина — на 1,02 %, пролина — на 2,66 %, аспарагиновой кислоты — на 1,93 % и глутаминовой кислоты — на 1,76 %. Количество глицина уменьшилось на 2,14 %, лейцина — на 1,22 % и гистидина — на 0,16 %, так как этим аминокислоты разрушаются при нагревании.

4. Аминокислотный состав (г/100 г белка) **исходной дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus* и белкового концентрата, полученного на ее основе по разработанной технологии, в сравнении с идеальным белком ФАО/ВОЗ** (*WAM*±SD, лабораторный опыт)

Аминокислота	Дрожжевая биомасса	Белковый концентрат	Идеальный белок
Фенилаланин + тирозин	5,77±0,28	5,20±0,26	6,0
Лейцин	6,70±0,33	5,48±0,27	5,9
Лизин	3,75±0,18	5,50±0,27	5,5
Валин	4,36±0,21	4,86±0,24	4,9
Изолейцин	4,28±0,22	4,35±0,21	4,0
Треонин	1,87±0,09	2,31±0,11	3,3
Триптофан	1,23±0,06	1,34±0,06	1,0
Глутаминовая кислота	2,55±0,12	4,31±0,21	–
Аргинин	3,46±0,17	4,48±0,22	–
Глицин	4,59±0,23	2,45±0,12	–
Аспарагиновая кислота	3,54±0,17	5,47±0,27	–
Метионин + цистеин	2,03±0,10	2,20±0,11	3,5
Пролин	2,61±0,13	5,27±0,26	–
Гистидин	1,82±0,09	1,66±0,08	1,5
Аланин	4,32±0,21	5,53±0,27	–
Серин	0,41±0,02	1,03±0,05	–

Примечание. Прочерки означают, что для «идеального» белка эти аминокислоты не определяют.

В кормах для свиней главной лимитирующей аминокислотой выступает лизин. В полученном нами белковом концентрате его количество составляет 5,50±0,27 %. Этого достаточно для удовлетворения суточной потребности сельскохозяйственных животных. Для птиц лимитирующими аминокислотами служат цистеин и метионин, количество которых в белковом концентрате (2,2±0,11 %) также может покрыть их суточную потребность. В одной из работ использовался концентрат дрожжевого белка для кормления карповых рыб (50), при этом было показано, что этот концентрат может заменить до 50 % дорогостоящей рыбной муки в рационе карпов без каких-либо негативных последствий для их здоровья и роста. Кроме

того, аминокислотный состав дрожжевой биомассы *K. marxianus* и белкового концентрата сопоставим по составу с идеальным белком ФАО/ВОЗ (51, 52) (см. табл. 4).

Главное преимущество предлагаемой нами технологии — использование термотолерантных дрожжей *K. marxianus*, для культивирования которых подходят более высокие температуры (34-40 °С). К тому же большинство проведенных к настоящему времени исследований касаются изучения физиологии и метаболизма *K. marxianus*, а не их практического применения (32). Пекарские дрожжи чаще всего культивируют при температуре около 32 °С (53). В процессе культивирования дрожжей образуется большое количество тепла, поэтому требуется охлаждать среду в биореакторе. Дрожжам *K. marxianus* требуется меньшее охлаждение, чем пекарским дрожжам, что снижает расход теплоносителя для отвода тепла.

С применением разработанной технологии мы получили опытный образец белкового концентрата. Он представляет собой пастообразную массу (применяли высушивание в сушильном шкафу при температуре 103 °С до остаточной влажности 5,56 %). Характеристики опытного образца:

Параметр	Регламентирующий документ	Показатель
Сырой протеин	ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия»	71,65 %
Истинный белок	ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия»	65,94 %
Внешний вид	ГОСТ Р 54731-2011 «Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия»	Однородный сухой мелкодисперсный порошок
Цвет	ГОСТ Р 54731-2011 «Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия»	Светло-бежевый или светло-коричневый
Запах	ГОСТ Р 54731-2011 «Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия»	Свойственный дрожжам, без постороннего запаха
Вкус	ГОСТ Р 54731-2011 «Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия»	Свойственный дрожжам, без постороннего привкуса
Влажность	ГОСТ Р 54731-2011 «Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия»	5,56 %
Микробиологические показатели	Технический регламент Таможенного союза ТРТС 021/2011. «О безопасности пищевой продукции»	Соответствует
Содержание тяжелых металлов	Технический регламент Таможенного союза ТРТС 021/2011. «О безопасности пищевой продукции»	Соответствует

Итак, производство подсолнечного масла сопряжено с образованием большого количества отходов. Мы показали возможность получения богатого белком продукта из биомассы дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-4570 на таких отходах — ферментолизате лузги подсолнечника. Установлены режимы денуклеинизации и обезжиривания биомассы. Режим удаления липидов: 60 % этиловый спирт при гидромодуле 1:2,5 и температуре 60 °С в течение 1,0 ч (остаточное количество липидов не превышает 2 %). Денуклеинизация осуществляется под действием собственных эндонуклеаз дрожжей при температуре 50 °С и гидромодуле 1:7 в течение 1,0 ч (остаточное количество нуклеиновых кислот также не превышает 2 %). Белковый концентрат содержит не менее 65 % истинного белка. Увеличение содержания аминокислот в белковом концентрате происходит за счет уменьшения содержания липидов и нуклеиновых кислот. Аминокислотный состав дрожжевой биомассы и белкового концентрата сравним с таковым у идеального белка ФАО/ВОЗ. Введение концентрата из дрожжевой биомассы *K. marxianus* Y-4570 в пищевые продукты позволит обогатить их белком с высоким содержанием незаменимых аминокислот, улучшит органолептические качества продуктов. Белковый концентрат также может быть использован в животноводстве.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств,
125080 Россия, г. Москва, Волоколамское ш., 11,
e-mail: iv.fomenko@mail.ru, Ivand152@yandex.ru, biotech@mgupp.ru, natali-mng@yandex.ru ✉

Поступила в редакцию 8 июля 2021 года

A TECHNOLOGY FOR OBTAINING A PROTEIN CONCENTRATE FROM YEAST BIOMASS OF *Kluyveromyces marxianus* Van der Walt (1965)

I.A. Fomenko, I.A. Degtyarev, L.A. Ivanova, N.G. Mashentseva ✉

Moscow State University of Food Production, 11, Volokolamskoe sh., Moscow, 125080 Russia, e-mail iv.fomenko@mail.ru, Ivand152@yandex.ru, biotech@mgupp.ru, natali-mng@yandex.ru (✉ corresponding author)
ORCID:
Fomenko I.A. orcid.org/0000-0003-0081-6336
Degtyarev I.A. orcid.org/0000-0002-3842-1391
Ivanova L.A. orcid.org/0000-0003-1993-8333
Mashentseva N.G. orcid.org/0000-0002-9287-0585
The authors declare no conflict of interests
Received July 8, 2021
doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1172eng

Abstract

Lack of protein in the diet leads to a violation of nitrogen metabolism. Experts estimate that the feed protein market will exceed US $ 200 billion by 2024. In Russia, the deficit of fodder proteins is more than 1 million tons. Traditional protein sources cannot meet the daily need for food and feed proteins because of economic and social reasons, so there is a growing interest in alternative protein sources. This communication presents the results of obtaining a protein concentrate based on the biomass of thermotolerant yeast *K. marxianus* grown on a waste of oilseed production that is little used in bioconversion - sunflower husk. Yeast of this type increases the digestibility of feed, is used in the food industry for the fermentation of soy milk, soft cheese and as a flavor enhancer. The aim of the study was to develop a technology for obtaining a protein concentrate from the yeast biomass of *K. marxianus* and to substantiate the feasibility of its use as a feed and food additive. The *K. marxianus* Y-4570 strain was selected as a result of screening on sunflower husk fermentolysate as the most productive in terms of biomass accumulation (up to 30 g/l) and crude protein (59.29±2.96 %). Using a multicyclic semi-continuous method, yeast was cultured in a laboratory fermenter on a saline medium with sunflower husk fermentolysate to obtain protein biomass. Technological parameters were determined to obtain the protein concentrate containing at least 60 % of the true protein, no more than 2 % of lipids and no more than 2 % of nucleic acids. The biomass was defatted with 60 % ethyl alcohol with a hydromodule of 1:2.5 at 60 °C for 1 hour. The residual lipid content was 1.94±0.09 %. Denucleinization was performed by activating the cell's own endonucleases at 40-60 °C. Nucleic acids were removed at a 50 °C for 1 hour with a hydromodule 1:7. The residual content of nucleic acids was 1.97±0.10 %. The final product contains 65.94±3.14 % of true protein, which meets the requirements for protein concentrates. Analysis of the amino acid profile of the protein concentrate showed that the content of almost all essential amino acids exceeds that in the original yeast biomass, with the exception of glycine, leucine and histidine. A relative increase in the content of amino acids occurs due to the removed lipids, nucleic acids, the loss of moisture and the concentration of substances of the original biomass with drying. Protein concentrate based on the biomass of the yeast *K. marxianus* Y-4570 is intended for use as a feed and food additive in order to enrich products with essential amino acids.

Keywords: protein concentrate, protein, lipids, nucleic acids, *Kluyveromyces marxianus*, yeast, denuclearization, degreasing.

REFERENCES

1. Shurson G.C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 235: 60-76 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010).
2. Cocchi L., Vescovi L., Petrini L.E., Petrini O. Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chemistry*, 2006, 98(2): 277-284 (doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.068).
3. Demirba A. Accumulation of heavy metals in some edible mushrooms from Turkey. *Food Chemistry*, 2000, 68(4): 415—-419 (doi: 10.5772/52771).
4. Bach F., Helm C.V., Bellettini M.B., Maciel G.M., Haminiuk C.W.I. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. *International Journal of Food Science & Technology*, 2017, 52(11): 2382-2392 (doi: 10.1111/ijfs.13522).
5. Hamzah R.U., Jigam A.A., Makun H.A., Egwim E.C. Antioxidant properties of selected African vegetables, fruits and mushrooms: a review. In: *Mycotoxin and food safety in developing countries*. H. Makun. IntechOpen, London, 2013: 203-250 (doi: 10.5772/52771).
6. Becker E.W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(2): 207-210 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002).
7. Wells M.L., Potin P., Craigie J.S., Raven J.A., Merchant S.S., Helliwell K.E., Brawley S.H. Algae

as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(2): 949-982 (doi: 10.1007/s10811-016-0974).
8. Arulkumar A., Nigariga P., Paramasivam S., Rajaram R. Metals accumulation in edible marine algae collected from Thondi coast of Palk Bay, Southeastern India. *Chemosphere*, 2019, 221: 856-862 (doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.007).
9. Fallon S., Enig M. Soy alert-tragedy and hype. *Nexus Magazine*, 2000, 7(3): 17-23.
10. Savage J.H., Kaeding A.J., Matsui E.C., Wood R.A. The natural history of soy allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(3): 683-686 (doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.994).
11. Wang W., Li Z., Lv Z., Zhang B., Lv H., Guo Y. Effects of *Kluyveromyces marxianus* supplementation on immune responses, intestinal structure and microbiota in broiler chickens. *PLoS ONE*, 2017, 12(7): e0180884 (doi: 10.1371/journal.pone.0180884).
12. Gélinas P., Barrette J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technology,* 2007, 98(5): 1138-1143 (doi: 10.1016/j.biortech.2006.04.021).
13. Ghaly A.E., Kamal M.A. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, 2004, 38(3): 631-644 (doi: 10.1016/j.watres.2003.10.019).
14. Palma M.L., Zamith-Miranda D., Martins F.S., Bozza F.A., Nimrichter L., Montero-Lomeli M., Douradinha B. Probiotic Saccharomyces cerevisiae strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(16): 6563-6570 (doi: 10.1007/s00253-015-6776-x).
15. Haldar S., Ghosh T.K., Bedford M.R. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast protein concentrate on production performance of broiler chickens exposed to heat stress and challenged with *Salmonella enteritidis*. *Animal Feed Science and Technology,* 2011, 168(1-2): 61-71 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.03.007).
16. Moallem U., Lehrer H., Livshitz L., Zachut M., Yakoby S. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(1): 343-351 (doi: 10.3168/jds.2007-0839).
17. Liu S., Shah A.M., Yuan M., Kang K., Wang Z., Wang L., Xue B., Zou H., Zhang X., Yu P., Wang H., Tian G., Peng Q. Effects of dry yeast supplementation on growth performance, rumen fermentation characteristics, slaughter performance and microbial communities in beef cattle. *Animal Biotechnology*, 2021: 1-11 (doi: 10.1080/10495398.2021.1878204). Epub ahead of print.
18. Mogensen G., Salminen S., Crittenden R., Bianchi Salvadori B., Zink R. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bulletin-International Dairy Federation*, 2002, 377: 10-19 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030).
19. Øverland M., Karlsson A., Mydland L.T., Romarheim O.H., Skrede A. Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 2013, 402: 1-7 (doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.03.016).
20. Rakowska R., Sadowska A., Dybkowska E., Swiderski F. Spent yeast as natural source of functional food additives. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 2017, 68(2): 115-121.
21. Pérez-Torrado R., Gamero E., Gymez-Pastor R., Garre E., Aranda A., Matallana E. Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, 46(2): 167-175 (doi: 10.1016/j.tifs.2015.10.008).
22. Ferreira I., Pinho O., Vieira E., Tavarela J.G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, 21(2): 77-84 (doi: 10.1016/j.tifs.2009.10.008).
23. Hu Z., He B., Ma L., Sun Y., Niu Y., Zeng B. Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in Saccharomyces cerevisiae. *Indian Journal of Microbiology*, 2017, 57(3): 270-277 (doi: 10.1007/s12088-017-0657-1).
24. Gervasi T., Pellizzeri V., Calabrese G., Di Bella G., Cicero N., Dugo G. Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Natural Product Research*, 2018, 32(6): 648-653 (doi: 10.1080/14786419.2017.1332617).
25. Jin Y.S., Cate J.H. Metabolic engineering of yeast for lignocellulosic biofuel production. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 41: 99-106 (doi: 10.1016/j.cbpa.2017.10.025).
26. Kistaubayeva A., Savitskaya I., Shokataeva D., Zhabakova A., Kuli Z. Utilization of agricultural waste by yeast-bacterial conversion of cellulose-containing substrates to protein feed products. *Eurasian Journal of Ecology*, 2017, 51(2): 34-43 (doi: 10.26577/EJE-2017-2-765).
27. Yan Z., Liu X., Yuan Y., Liao Y., Li X. Deodorization study of the swine manure with two yeast strains. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2013, 18(1): 135-143 (doi: 10.1007/s12257-012-0313-x).
28. Matassa S., Boon N., Pikaar I., Verstraete W. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(5): 568-575 (doi: 10.1111/1751-7915.12369).
29. Halász A., Lásztity R. *Use of yeast biomass in food production*. CRC Press, 1991 (doi: 10.1201/9780203734551).
30. Ivanova I.S. *Razrabotka tekhnologii biologicheski aktivnoi dobavki k pishche v vide belkovo-uglevodnogo kontsentrata iz biomassy khlebopekarnykh drozhzhei. Kandidatskaya dissertatsiya* [De-

velopment of technology for bioactive food additive in the form of protein-carbohydrate concentrate from baker's yeast biomass. PhD Thesis]. Moscow, 2003 (in Russ.).
31. Lane M.M., Burke N., Karreman R., Wolfe K.H., O'Byrne C.P., Morrissey J.P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 100(4): 507-519 (doi: 10.1007/s10482-011-9606-x).
32. Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(3): 339-354 (doi: 10.1007/s00253-008-1458-6).
33. Karim A., Gerliani N., Aпder M. *Kluyveromyces marxianus*: an emerging yeast cell factory or applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 333: 108818 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818).
34. Varela J.A., Gethins L., Stanton C., Ross P., Morrissey J.P. Applications of *Kluyveromyces marxianus* in biotechnology. In: *Yeast diversity in human welfar*e. Springer, Singapore, 2017: 439-453 (doi: 10.1007/978-981-10-2621-8_17).
35. Lee M.H., Lin J.J., Lin Y.J., Chang J.J., Ke H.M., Fan W.L., Li W.H. Genome-wide prediction of CRISPR/Cas9 targets in *Kluyveromyces marxianus* and its application to obtain a stable haploid strain. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1-10 (doi: 10.1038/s41598-018-25366-z).
36. Fadda M.E., Mossa V., Deplano M., Pisano M.B., Cosentino S. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *Food Science and Technology*, 2017, 75: 100-106 (doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.020).
37. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 2013, 11(11): 3449 (doi: 10.2903/j.efsa.2013.3449).
38. Weigand E., Kirchgessner M. Protein and energy value of vinasse for pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 1980, 5(3): 221
39. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226: 497-509 (doi: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
40. Karklinya V.A., Birska I.A., Limarenko Y.A. Quantitative determination of nucleic acids in *Salmonidae* milt by various methods. *Chem. Nat. Compd.*, 25, 1989: 109-112 (doi: 10.1007/BF00596713).
41. Schneiter R., Daum G. Extraction of yeast lipids. *Methods Mol. Biol.*, 2006, 313: 41-45 (doi: 10.1385/1-59259-958-3:041).
42. Yang F., Xiang W., Sun X., Wu H., Li T., Long L. A novel lipid extraction method from wet microalga *Picochlorum* sp. at room temperature. *Marine Drugs*, 2014, 12(3): 1258-1270 (doi: 10.3390/md12031258).
43. Kot A.M., Gientka I., Bzducha-Wrybel A., Błażejak S., Kurcz A. Comparison of simple and rapid cell wall disruption methods for improving lipid extraction from yeast cells. *Journal of Microbiological Methods*, 2020, 176: 105999 (doi: 10.1016/j.mimet.2020.105999).
44. Chen M., Chen X., Liu T., Zhang W. Subcritical ethanol extraction of lipid from wet microalgae paste of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2011, 5(3): 385-389 (doi: 10.1166/jbmb.2011.1157).
45. Caballero–Córdoba G.M., Sgarbieri V.C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80(3): 341-351 (doi: 10.1002/10970010(200002)80:3%3C341::AIDJSFA533%3E3.0.CO;2-M).
46. Hedenskog G., Ebbinghaus L. Reduction of the nucleic acid content of single - cell protein concentrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 1972, 14(3): 447-457 (doi: 10.1002/bit.260140313).
47. Pacheco M.T.B., Caballero-Cordoba G.M., Sgarbieri V.C. Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrates. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1997, 43(6): 601-612 (doi: 10.3177/jnsv.43.601).
48. Leung A.M., Pearce E.N., Braverman L.E. Perchlorate, iodine and the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 24(1), 133-141 (doi: 10.1016/j.beem.2009.08.009).
49. Lukondeh T., Ashbolt N.J., Rogers P.L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30(1): 52-56 (doi: 10.1007/s10295-002-0008-y).
50. Omar S.S., Merrifield D.L., Kühlwein H., Williams P.E., Davies S.J. Biofuel derived yeast protein concentrate (YPC) as a novel feed ingredient in carp diets. *Aquaculture*, 2012, 330: 54-62 (doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.12.004).
51. Andrade J., Pereira C.G., de Almeida J.C. Jr., Viana C.C.R., Neves de Oliveira L.N., Fonseca da Silva P.H., Bell, M.J.V., de Carvalho dos Anjos V. FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. *LWT*, 2019, 99: 166-172 (doi: 10.1016/j.lwt.2018.09.079).
52. Consultation F.E. *Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO Food and Nutrition Paper, 92.* Rome, 2013.
53. Salvady Z., Arroyo-López F.N., Guillamyn J.M., Salazar G., Querol A., Barrio E. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(7): 2292-2302 (doi: 10.1128/aem.01861-10).