

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ И ЭКОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА

Ирина Владимировна ПАК<sup>1</sup>

Олег Владимирович ТРОФИМОВ<sup>2</sup>

Лариса Ильинична ВАЙСФЕЛЬД<sup>3</sup>

Ризван Дилман-оглы РУСТАМОВ<sup>4</sup>

Ксения Валерьевна СКВОРЦОВА<sup>5</sup>

УДК 577.112

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФОСФЕМИДА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ШТАММА *CANDIDA MALTOSA* ТМ-12

<sup>1</sup> доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой экологии и генетики,  
Тюменский государственный университет  
pakiv57@mail.ru

<sup>2</sup> кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии и генетики,  
Тюменский государственный университет  
oleg\_v\_trofimov@mail.ru

<sup>3</sup> главный специалист лаборатории солнечных фотопреобразователей,  
Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (г. Москва)  
liv11@yandex.ru

<sup>4</sup> аспирант кафедры экологии и генетики, Тюменский государственный университет  
kafedraekogen@mail.ru

<sup>5</sup> аспирант кафедры экологии и генетики, Тюменский государственный университет  
kafedraekogen@mail.ru

---

**Цитирование:** Пак И. В. Эффективность использования фосфемиды для повышения продуктивности штамма *Candida maltosa* Тм-12 / И. В. Пак, О. В. Трофимов, Л. И. Вайсфельд, Р. Д. Рустамов, К. В. Скворцова // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2018. Том 4. № 3. С. 69-80.  
DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-3-69-80

### Аннотация

В работе предложен новый способ повышения продуктивности штамма дрожжей *Candida maltosa* Тм-12 (ВКПМ У-612) с использованием фосфемид, который был разработан во Всесоюзном научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте (ВНИХФИ). Вещество предложено в качестве цитостатика, подавляющего размножение опухолевых клеток. Мутагенный эффект фосфемид был показан нами на культурах фибробластов человека и мыши, а также на некоторых видах растений. Изучено влияние фосфемид в разных концентрациях 0,1; 0,01; 0,001 и 0,0001% на дрожжи *Candida maltosa* Тм-12. Показано, что фосфемид в изученных концентрациях влияет на число и размеры образующихся колоний. Определена эффективная концентрация фосфемид, обеспечивающая прирост биомассы в 1,08 раз больше, чем в контроле. Показано, что фосфемид в изученных концентрациях не влияет на белковый состав *Candida maltosa* Тм-12.

### Ключевые слова

Дрожжи, фосфемид, ферментация, штамм-продуцент.

DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-3-69-80

### Введение

Повышение продуктивности промышленных штаммов-продуцентов микробных белков, заменителей растительных и животных белков в кормах животных, является актуальной прикладной задачей.

В последние годы работы по увеличению продуктивности промышленных штаммов-продуцентов строятся преимущественно на применении молекулярной стратегии: сайт-направленного мутагенеза, использовании протопластов, рекомбинантных штаммов [5, 9, 10, 14], в то время как возможности других методов, например, индуцированного химического мутагенеза, использования стимулирующего действия биологически активных веществ, исчерпаны не до конца. Преимущества этих методов заключаются в высокой эффективности, простоте и относительной дешевизне, что делает их привлекательными для использования в биотехнологии. В ряде работ была показана высокая эффективность применения различных веществ для увеличения продукции антимикробных веществ у *Bacillus subtilis* [13], для повышения продуктивности штаммов-продуцентов дрожжей при получении этанола [6, 8].

Перспективным является использование генетически активных соединений, действие которых на дрожжах не изучалось ранее. Фосфемид был разработан во ВНИХФИ как цитостатик, подавляющий размножение опухолевых клеток [4].

Штамм *Candida maltosa* Тм-12 (ВКПМ У-612), полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП «ГосНИИгенетика» [2], используется для производства кормового белка. Согласно проведенным исследованиям (нашим неопубликованным данным) включение дрожжевого белка *Candida maltosa* Тм-12 в рацион питания цыплят-бройлеров и телят спо-

способствует повышению неспецифической резистентности к инфекционным заболеваниям. Являясь потенциально перспективным объектом для использования в животноводстве и птицеводстве, данный штамм не обладает продуктивностью, позволяющей получать большие объемы биомассы.

Целью наших исследований явилось изучение перспектив использования фосфемиды для повышения продуктивности штамма-продуцента *Candida maltosa* Тм-12, используемого для получения белковой добавки к кормам животных.

### Основная часть

Наши исследования проводились в Центре биотехнологии и генодиагностики Института биологии Тюменского государственного университета в период с 2015 по 2016 г.

Объект исследования: штамм *Candida maltosa* Тм-12 (регистрационный номер ВКПМ У-612), полученный из ФГУП «ГосНИИГенетика». Происхождение штамма: выделен из ферментера Пермского филиала ВНПО «Бумпром». Объект не является генетически модифицированным штаммом и относится к микроорганизмам, непатогенным для человека, область промышленного применения штамма — производство кормового белка для животных [2].

Для настоящей работы фосфемид был синтезирован в 2014 г. в лаборатории физико-химических методов анализа строения вещества на химическом факультете Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова профессором Е. В. Бабаевым.

### Условия культивирования

Штамм культивировали в полной дрожжевой среде со следующим составом (г/л): глюкоза — 20; пептон — 10; дрожжевой экстракт — 5 при оптимальной температуре 28 °С. В среду добавляли агар (Ferak) до 1,5%. Среды стерилизованы путем автоклавирования при 121 °С и 2 атмосферах в течение 30 мин в горизонтальном автоклаве 3150 EL (фирмы Tuttnauer). После автоклавирования добавляли антибиотик хлорамфеникол (левомецетин) (500 мкг/мл).

Фосфемид тщательно растворяли в питательной среде путем перемешивания на роторе. Использовали фосфемид в следующих концентрациях: 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001%. Каждый вариант был поставлен в пяти повторениях. Среда для контроля не содержала фосфемид. Культивировали по 0,01 мкл культуры (10 000 клеток) на твердых питательных средах в чашках Петри диаметром 90 мм в суховоздушном термостате BD 53 (фирмы Binder) при температуре 28 °С в течение трех суток. Колонии подсчитывали на счетчике Interscience (Scan 100).

Для оценки влияния фосфемиды на повышение продуктивности дрожжей проводили глубинное культивирование дрожжей в жидких питательных средах в термостате-качалке Innova 43R (фирмы New Brunswick Scientific) при температуре 28 °С и 160 об/мин и в ферментере. По одной колонии из разных вариантов с фосфемидом и контрольного варианта вносили в колбы с 500 мл питательной среды. В ходе инкубации в термостате-качалке через фиксиро-

ванные промежутки времени были отобраны аликвоты культуры (объемом по 1 мл) с целью определения количества содержащихся в ней клеток. Далее, для расчета концентрации клеток нами проводились измерения оптической плотности культуры при длине волны 595 нм с использованием спектрофотометра SmartSpec Plus (фирмы Bio-Rad).

Для получения инокулята при культивировании дрожжей в ферментере BioFlo 115 (фирмы New Brunswick Scientific) производили посев по одной колонии дрожжей из контроля и варианта с 0,0001% фосфемидом в колбы с 500 мл жидкой питательной среды. После инкубации в термостате-качалке при 28 °С и 130 об/мин в течение суток, полученную культуру использовали как посевной материал (инокулят) для дальнейшего культивирования микроорганизмов в ферментере. К 9,5 л стерильной питательной среды, находящейся в сосуде ферментера, добавляли 0,5 л полученного инокулята. Культивирование дрожжей в ферментере осуществлялось при автоматическом режиме при температуре 28 °С, рН = 7 и 60%-ном насыщении кислородом в течение суток. Клеточная биомасса из полученной культуры выделялась посредством последовательного осаждения в центрифуге 5804 R (фирмы Eppendorf).

#### *Электрофорез в ДНС-ПААГ*

Перед проведением электрофореза клетки разрушали в гомогенизаторе Schuett Homogen Plus. Осаждение белков проводили в центрифуге 5804 R (фирмы Eppendorf) при 500 г. Электрофорез проводили по методике Лэммли [11]. В качестве маркера молекулярной массы белков использовали готовую смесь PageRuller Unstained Protein Ladder (фирмы Fermentas). Окраску белков осуществляли нитратом серебра [12].

Статистическая обработка данных проводилась по общепринятым методикам с использованием программы Microsoft Excel.

#### **Результаты и обсуждение**

Фосфемид впервые был разработан во ВНИХФИ и предложен в качестве цитостатика, подавляющего размножение опухолевых клеток [4]. Мутагенный эффект данного вещества был убедительно показан на цитогенетическом уровне: на культуре фибробластов человека и мыши и на модельном объекте цитогенетики *Crepis capillaris* L. [1, 15]. Показано, что фосфемид вызывает перестройки хромосом и подавляет митотическую активность. Мутагенный эффект фосфемиды был продемонстрирован в работе Н. А. Боме (с соавт.) [7] на растениях трех сортов мягкой озимой пшеницы, взятой из мировой коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР).

В наших исследованиях воздействие фосфемиды на *Candida maltosa* Tm-12 проявилось в уменьшении числа колоний с увеличением его концентрации (таблица 1). С увеличением времени инкубации число колоний уменьшалось при высоких концентрациях фосфемиды 0,1 и 0,01%. При концентрациях 0,001 и 0,0001% число колоний достоверно не менялось и даже наблюдалась тенденция к увеличению их числа.

С уменьшением концентрации фосфемиды число выживших колоний повышалось с увеличением сроков инкубации. Уменьшение числа колоний при воздействии фосфемиды в концентрациях 0,1 и 0,01% связано с появлением в опытных вариантах колоний, которые имели размеры менее 0,1 мм и при более длительном культивировании погибали.

Особенностью действия фосфемиды на *Candida maltosa* Tm-12, вероятно, является увеличение в опытных вариантах числа клеток с хромосомными нарушениями, которые могут ограниченно размножаться, формируя в первичной культуре нежизнеспособные колонии.

Анализ размерных показателей колоний выявил достоверное увеличение их диаметра под влиянием фосфемиды. В высоких концентрациях фосфемид способствовал уменьшению числа колоний, что закономерно повлекло в условиях меньшей конкуренции за питательные вещества увеличение их размеров.

Сохранившие жизнеспособность клетки в условиях меньшей плотности образовывали колонии, значительно превосходившие по размерам колонии в контрольном варианте: в 1,02-1,46 раз через 24 ч; в 1,24-1,88 раз через 48 ч и в 1,5-1,79 раз через 72 ч инкубации (таблица 1).

Таблица 1

**Число и размеры колоний *Candida maltosa* Tm-12 после воздействия фосфемиды**

Table 1

**Number and size of *Candida maltosa* Tm-12 colonies after exposure to phosphomide**

Концентрация фосфемиды, %	Время инкубации, ч	Число колоний (среднее по 5 повторам), шт.	Средний диаметр колонии, мм
1	2	3	4
0,1	24	67 ± 3,84	3,01 ± 0,12*
	48	21 ± 1,22*	3,22 ± 0,08*
	72	5 ± 0,54*	3,39 ± 0,11*
0,01	24	92 ± 2,34	3,03 ± 0,18*
	48	76 ± 1,30*	3,20 ± 0,14*
	72	65 ± 0,77*	3,10 ± 0,05*
0,001	24	130 ± 3,27	2,58 ± 0,13*
	48	132 ± 0,84	2,28 ± 0,09*
	72	143 ± 1,58*	2,19 ± 0,06*
0,0001	24	141 ± 0,80	2,10 ± 0,12
	48	154 ± 1,67*	2,13 ± 0,17
	72	153 ± 0,55*	2,23 ± 0,08

Окончание таблицы 1

Table 1 (end)

1	2	3	4
Контроль	24	161 ± 1,00	2,05 ± 0,03
	48	211 ± 0,54*	1,89 ± 0,09
	72	215 ± 1,81*	1,71 ± 0,07

Примечание: \* — различия между числом колоний через 24 ч инкубации и 48 и 72 ч инкубации статистически достоверны при  $p < 0,01$ ; \*\* — различия между контролем и вариантами с фосфемидом по диаметру колонии статистически достоверны при  $p < 0,05$ .

Note: \* — the differences between the number of colonies after 24 hr of incubation and 48 and 72 hr of incubation are statistically significant at  $p < 0.01$ ; \*\* — the differences between the control and the variants with phosphemide in colony diameter are statistically significant at  $p < 0.05$ .

С целью изучения влияния фосфемиды на белковый состав *Candida maltosa* Тм-12 был проведен электрофорез белковых экстрактов из клеток дрожжей. Сопоставление вариантов с воздействием фосфемиды в разных концентрациях и контроля не выявило различий в белковых спектрах (рис. 1).

Для изучения влияния фосфемиды на продуктивность штамма *Candida maltosa* Тм-12 проводили глубинное культивирование. Было показано, что с увеличением концентрации фосфемиды количество клеток ( $10^9$ /мл) достоверно

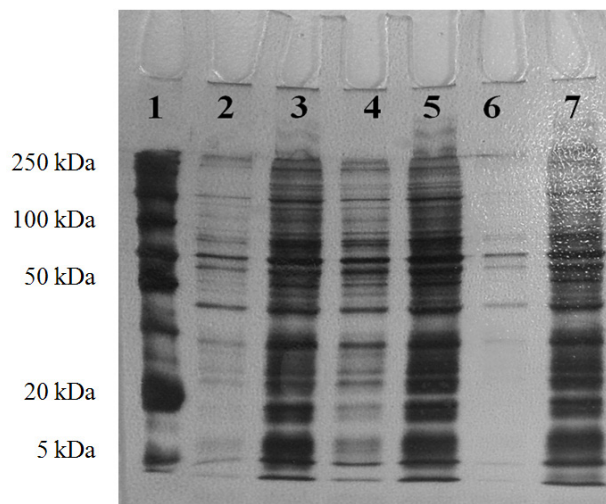


Рис. 1. Электрофореграмма белков *Candida maltosa* Тм-12:

1 — маркер, 2 — контроль; фосфемид в концентрациях: 3 — 0,1%, 4 — 0,01%, 5 — 0,001%, 6, 7 — 0,0001%

Fig. 1. Electrophoregram of *Candida maltosa* proteins Тм-12:

1 — marker, 2 — control; phosphemide in concentrations: 3 — 0.1%, 4 — 0.01%, 5 — 0.001%, 6, 7 — 0.0001%

уменьшается. Максимальный стимулирующий эффект через 24 ч наблюдался при культивировании клеток, полученных с использованием самой низкой концентрации — 0,0001% фосфемиды (рис. 2).

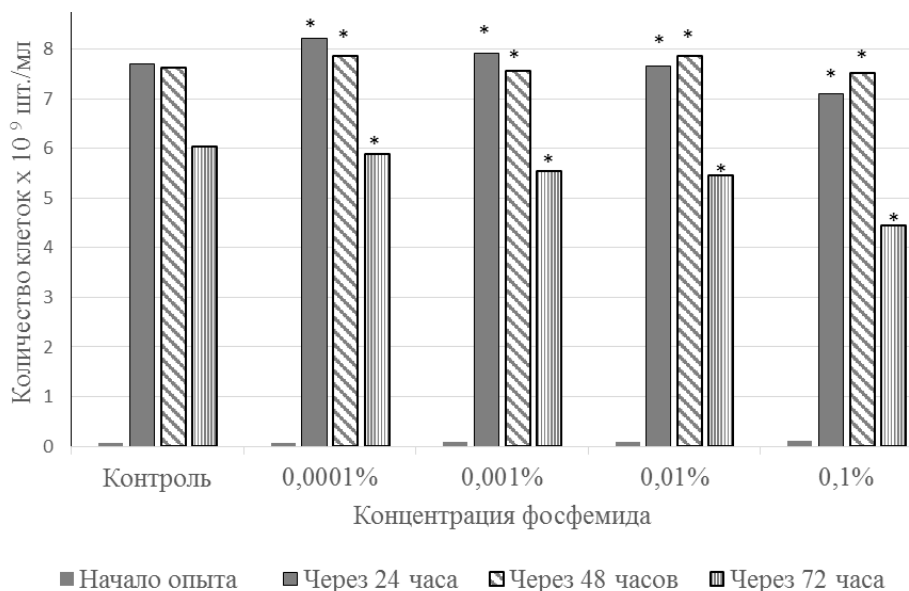


Рис. 2. Влияние фосфемиды на продуктивность *Candida maltosa* Tm-12

Примечание: \* — различия между контролем и вариантами с фосфемидом статистически достоверны при  $p < 0,05$ .

Fig. 2. Influence of phosphomide on the productivity of *Candida maltosa* Tm-12

Note: \* — the differences between control and variants with phosphomide are statistically significant at  $p < 0.05$ .

Еще со времен И. А. Рапопорта отмечалось стимулирующее действие химических мутагенов и даже супермутагенов в малых дозах [3]. Это связано с возникновением под влиянием мутагенов двойной генетической стимуляции: формированием после воздействия системы высокой гетерозиготности и активации ферментативных систем, которые положительно влияют на проявление продуктивных качеств. Подобный механизм действия низких концентраций фосфемиды ранее был показан на озимой мягкой пшенице [7]. Стимулирующий эффект фосфемиды на *Candida maltosa* Tm-12, вероятно, также можно объяснить механизмом двойной генетической стимуляции.

Культивирование штамма *Candida maltosa* Tm-12 в ферментере BioFlo 115 при автоматическом режиме в течение 24 ч позволило оценить увеличение прироста клеточной биомассы, полученной при применении самой низкой концентрации фосфемиды. Клетки штамма *Candida maltosa* Tm-12 из варианта с 0,0001% фосфемидой дают при культивировании прирост биомассы на 15,2 г/10 л больше, чем в контроле (таблица 2).

Таблица 2

Результаты культивирования *Candida maltosa* Тm-12 в ферментере

Table 2

Results of cultivation of *Candida maltosa* Тm-12 in a fermenter

Объем культуры	Контроль	0,0001% фосфемид
Объем полученной культуры, л	10	10
Осажденная клеточная биомасса, г	193	208,2
Прирост клеточной биомассы, г	—	15,2

### Заключение

Таким образом, показана эффективность использования низких концентраций фосфемиды для повышения продуктивности штамма *Candida maltosa* Тm-12. Выявлена обратная зависимость числа колоний дрожжей и общей их продуктивности от концентрации фосфемиды. С уменьшением концентрации фосфемиды (варианты с 0,001% и 0,0001% фосфемидом) число выживших колоний увеличивалось с увеличением сроков инкубации. Эффективность применения фосфемиды в концентрации 0,0001% проявилась в увеличении продуктивности штамма *Candida maltosa* Тm-12 (прирост биомассы на 15,2 г/10 л или в 1,08 раз в этом опытном варианте был больше, чем в контроле).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вайсфельд Л. И. Цитогенетическое действие фосфазины на клетки человека и мыши в культуре / Л. И. Вайсфельд // Генетика. 1965. № 4. С. 85-92.
2. Паспорт штамма *Candida maltosa* Тm-12 (ВКПМ У-612) / Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов // М.: Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». 16.04.2012.
3. Рапопорт И. А. Двойная генетическая стимуляция, индуцированная супермутагенами / И. А. Рапопорт // Мутационная селекция. М.: Наука, 1977. С. 230-242.
4. Чернов В. А. Цитотоксические вещества в химиотерапии злокачественных новообразований / В. А. Чернов. М.: Медицина, 1964. 320 с.
5. Aoyagi H. Production of Secretory Cutinase by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Protoplasts / H. Aoyagi, Y. Katakura, A. Iwasaki // SpringerPlus. 2016. No 5. P. 160.
6. Aruna A. Direct Bioethanol Production by Amylolytic Yeast *Candida albicans* / M. Nagavalli, V. Girijashankar, S. P. D. Ponamgi, V. Swathisree, L. Venkateswar Rao // Letters in Applied Microbiology. 2015. Vol. 60. No 3. Pp. 229-236.
7. Bome N. A. Ecological and Genetic Potential of Soft Spring Wheat in Conditions of the Northern Zauralye / N. A. Bome, A. Y. Bome, E. I. Ripberger // Biological



- 
- Systems, Biodiversity, and Stability of Plant Communities. New Jersey: Apple Academic Press, 2015. Pp. 345-359.
8. Geiger M. R. A Thermostable *Candida molischiana* Mutant Capable of Ethanol Production at Elevated Temperatures / M. R. Geiger, W. R. Gibbons, T. P. West // Journal of Pure and Applied Microbiology. 2014. Vol. 8. No 2. Pp. 1743-1748.
  9. Hara A. A Mutated Hygromycin Resistance Gene is Functional in the *n*-Alkane-Assimilating Yeast *Candida tropicalis* / A. Hara, M. Ueda, S. Misawa, T. Matsui, K. Furuhashi, A. Tanaka // Archives of Microbiology. 2000. Vol. 173. No 3. Pp. 187-192. DOI: 10.1007/s002039900125
  10. Jung S. Improving the Expression Yield of *Candida antarctica* Lipase B in *Escherichia coli* by Mutagenesis / S. Jung, S. Park // Biotechnology Letters. 2008. Vol. 30. No 4. Pp. 717-722.
  11. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. 1970. No 227. Pp. 680-685.
  12. Oakley B. R. A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels / B. R. Oakley, D. R. Kirsch, N. R. Morris // Analytical Biochemistry. 1980. Vol. 105. No 1. Pp. 361-363.
  13. Radha Krishna E. Strain Improvement of Selected Strain *Bacillus subtilis* (MTCC No. 10619) for Enhanced Production of Antimicrobial Metabolites / E. Radha Krishna, P. Shamsheer Kumar, B. Veerendra Kumar // Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2011. Vol. 1. No 3. Pp. 32-38.
  14. Tamakawa H. Efficient Production of *l*-Lactic Acid from Xylose by a Recombinant *Candida utilis* Strain / H. Tamakawa, S. Ikushima, S. Yoshida // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2012. Vol. 113. No 1. Pp. 73-75.
  15. Weisfeld L. I. About Cytogenetic Mechanism of Chemical Mutagenesis / L. I. Weisfeld // Ecological Consequences of Increasing Crop Productivity. Plant Breeding and Biotic Diversity. Toronto; New Jersey: Apple Academic Press, 2015. Pp. 259-269.

**Irina V. PAK<sup>1</sup>**

**Oleg V. TROFIMOV<sup>2</sup>**

**Larisa I. WEISFELD<sup>3</sup>**

**Rizvan D. RUSTAMOV<sup>4</sup>**

**Ksenia V. SKVORTSOVA<sup>5</sup>**

UDC 577.112

### **EFFICIENCY OF PHOSPHEMIDE EMPLOYMENT AT INCREASING THE PRODUCTIVITY OF THE *CANDIDA MALTOSA* TM-12 STRAIN**

<sup>1</sup> Dr. Sci. (Biol.), Professor,  
Head of the Department of Ecology and Genetics, University of Tyumen  
pakiv57@mail.ru

<sup>2</sup> Cand. Sci. (Biol.), Assistant Professor,  
Department of Ecology and Genetics, University of Tyumen  
oleg\_v\_trofimov@mail.ru

<sup>3</sup> Ph. D., Senior Researcher, N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian  
Academy of Sciences (Moscow)  
liv11@yandex.ru

<sup>4</sup> Postgraduate Student, Department of Ecology and Genetics, University of Tyumen  
kafedraekogen@mail.ru

<sup>5</sup> Postgraduate Student, Department of Ecology and Genetics, University of Tyumen  
kafedraekogen@mail.ru

#### **Abstract**

A new way of increasing the productivity of the *Candida maltosa* Tm-12 yeast strain using phosphemide was invented. Phosphemide was developed at the All-Union Scientific Research Chemical-Pharmaceutical Institute and proposed as a cytostatic agent that suppresses

---

**Citation:** Pak I. V., Trofimov O. V., Weisfeld L. I., Rustamov R. D., Skvortsova K. V. 2018. "Efficiency of Phosphemide Employment at Increasing the Productivity of the *Candida maltosa* Tm-12 Strain". Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 4, no 3, pp. 69-80.

DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-3-69-80

---

the proliferation of tumor cells. Its mutagenic effect was demonstrated on the cultures of human and mouse fibroblasts, and on several plant species. The impact of various concentrations of phosphemide (0.1; 0.01; 0.001, and 0.0001%) on the *Candida maltosa* Tm-12 yeasts was examined. The research showed that the studied concentrations of phosphemide affect both the number and sizes of building up colonies. An effective phosphemide concentration providing 1,08 more increase in biomass than in the control was established. It was also shown that the studied concentrations of phosphemide bear no effect on the *Candida maltosa* Tm-12 protein composition.

### Keywords

Yeasts, phosphemide, fermentation, producing strain.

DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-3-69-80

### REFERENCES

1. Weisfeld L. I. 1965. "Cytogenetic Effect of Phosphazine on Human and Mouse Cells in Culture". Russian Journal of Genetics, no 4, pp. 85-92.
2. Russian National Collection of Industrial Microorganisms of the State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms ("Genetika"). 2012. Passport of the Strain *Candida maltosa* Tm-12 (VKPM Y-612). 16 April. Moscow.
3. Rapoport I. A. 1977. "Dual Genetic Stimulation Induced by Supermutagens". In: Mutational Selection, pp. 230-242. Moscow: Nauka Publishers.
4. Chernov V. A. 1964. Employment of Cytotoxin Substances in the Chemotherapy of Malignant Tumors. Moscow: Meditsina.
5. Aoyagi H., Katakura Y., Iwasaki A. 2016. "Production of Secretory Cutinase by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Protoplasts". Springer Plus, no 5, p. 160.
6. Aruna A., Nagavalli M., Girijashankar V., Ponamgi S. P.D., Swathisree V., Venkateswar Rao L. 2015. "Direct Bioethanol Production by Amylolytic Yeast *Candida albicans*". Letters in Applied Microbiology, vol. 65, no 3, pp. 229-236.
7. Bome N. A., Bome A. Y., Ripberger E. I. 2015. "Ecological and Genetic Potential of Soft Spring Wheat in Conditions of the Northern Zauralye". In: Biological Systems, Biodiversity, and Stability of Plant Communities, pp. 345-359. New Jersey: Apple Academic Press.
8. Geiger M. R., Gibbons W. R., West T. P. 2014. "A Thermostable *Candida molischiana* Mutant Capable of Ethanol Production at Elevated Temperatures". Journal of Pure and Applied Microbiology, vol. 8, no 2, pp. 1743-1748.
9. Hara A., Ueda M., Misawa S., Matsui T., Furuhashi K., Tanaka A. 2000. "A Mutated Hygromycin Resistance Gene is Functional in the *n*-Alkane-Assimilating Yeast *Candida tropicalis*". Archives of Microbiology, vol. 173, no 3, pp. 187-192.  
DOI: 10.1007/s002039900125
10. Jung S., Park S. 2008. "Improving the expression of the Yield of *Candida antarctica* Lipase B in *Escherichia coli* by Mutagenesis". Biotechnology Letters, vol. 30, no 4, pp. 717-722.

11. Laemmli U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature*, no 227, pp. 680-685.
12. Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. 1980. "A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels". *Analytical Biochemistry*, vol. 105, no 1, pp. 361-363.
13. Radha Krishna E., Shamsheer Kumar P., Veerendra Kumar B. 2011. "Strain of Selected Strain *Bacillus subtilis* (MTCC No.10619) for Enhanced Production of Antimicrobial Metabolites". *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, vol. 1, no 3, pp. 32-38.
14. Tamakawa H., Ikushima S., Yoshida S. 2012. "Efficient Production of *l*-Lactic Acid from Xylose by a Recombinant *Candida utilis* Strain". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 113, no 1, pp. 73-75.
15. Weisfeld L. I. 2014. "About Cytogenetic Mechanism of Chemical Mutagenesis". In: Opalko A. I., Weisfeld L. I., Bekuzarova S. A., Bome N. A., Zaikov G. E. (eds.). *Ecological Consequences of Increasing Crop Productivity. Plant Breeding and Biotic Diversity*, pp. 259-269. Toronto; New Jersey: Apple Academic Press.