

ЗАСТОСУВАННЯ КАРОТИНСИНТЕЗУЮЧИХ ДРІЖДЖІВ *RHODOTORULA GLUTINIS* ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *SIMOCERPHALUS* *VETULUS* (MÜLLER, 1776) У ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ

О. В. КУШНІРИК, М. М. МАРЧЕНКО, О. І. ХУДИЙ, Л. М. ВАСІНА,
Л. В. ХУДА, О. М. КАБУЛЯ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: khudij@email.ua

Використання живих кормів на початкових етапах постембріонального розвитку риб позитивно впливає на виживаність мальків та їх ростові процеси. Зоопланктон, який зазвичай використовують у якості живого корму, не здатний до синтезу каротиноїдів, а лише до їх накопичення. У зв'язку з цим, актуальним є питання щодо розробки технології прижиттєвого насичення кормових організмів каротиноїдами. Промисловими продуцентами каротиноїдів можуть виступати різні групи організмів, зокрема водорості роду *Haematococcus* та дріжджі родів *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* і *Phaffia*. Враховуючи те, що для вирощування лабораторних культур планктонних ракоподібних традиційно використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, доцільним у біотехнології культивування зоопланктону є застосування дріжджів, але здатних до каротиногенезу. Одним із таких видів є *Rhodotorula glutinis*. При оцінці якісного складу каротиноїдів *R. glutinis* були застосовані різні системи розчинників у наступних комбінаціях: ацетон-бензол-петролейний ефір-гексан (10:10:3:10), бензол-ацетон-хлороформ (5:5:4), гексан-бензол (9:1) та хлороформ. Їх використання дозволило зафіксувати наявність однієї хроматографічної зони, яка відповідає β -каротину. При використанні іншої системи розчинників – гексан-бензол (29:1) – вдалося ідентифікувати три пігментні смуги, що відповідали β -каротину та специфічним для цього роду дріжджів каротиноїдам, присутність яких була підтверджена спектрофотометричними дослідженнями. При дослідженні впливу ретинолу ацетату, натрію ацетату та пероксиду водню на біосинтетичну здатність *R. glutinis* відмічено стимулюючу дію сполук на каротиногенез, при чому максимальні зміни проявлялись при використанні пероксиду водню. Встановлено, що застосування *R. glutinis* у якості кормового субстрату дозволяє збільшити у живих кормах вміст каротиноїдів майже у 2 рази, а також супроводжується підвищенням вмісту загальних протеїнів та зниженням частки загальних ліпідів. Варто відмітити, що заміна дріжджів *S. cerevisiae* на каротинсинтезуючі достовірно не відобразилася на динаміці наростання культури *S. vetulus*. Аналіз фізико-хімічних показників культурального середовища засвідчив незначні коливання вмісту розчиненого кисню та стабільніші показники рН, окисно-відновного потенціалу, електропровідності та загальної мінералізації при вирощуванні *S. vetulus* на *R. glutinis*. Це зумовлює можливість скорочення кількості операцій контролю якості культивуваного середовища, що дозволяє істотно спростити технологію насичення зоопланктону каротиноїдами мікробного походження.

Ключові слова: культивування, *Simocерphalus vetulus*, дріжджі, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, каротиноїди.

Вступ. Живі корми є важливим та необхідним компонентом у раціоні молоді риб для їх нормального розвитку при переході на екзогенне харчування (Bogut et al., 2010; Lavens, Sorgeloos, 1996). Використання живих кормів на початкових етапах постембріонального розвитку риб стимулює роботу шлунково-кишкового тракту, що позитивно впливає на виживаність мальків та їх ростові процеси (Биологически активные..., 2009; Блага та ін., 2008).

Важливу роль для росту та розвитку риб відіграють каротиноїди. Завдяки вітамін А-прекурсорній дії, а також антиоксидантному, антимутагенному та УФ-протекторному ефекту, вони володіють високою біологічною цінністю (Carotenoids..., 2009; Stahl, Sies, 2005). Також зна-

чною є роль каротиноїдів у процесах статевого дозрівання та стимуляції розвитку ікри. Нездатність риб до синтезу в організмі цих пігментів *de novo* спричиняє необхідність включення каротиноїдів до їх раціону.

Відомо, що зоопланктон, який зазвичай використовують у якості живого корму, також не здатний до синтезу каротиноїдів, а лише до їх накопичення. У зв'язку з цим, актуальним є питання щодо розробки технології його насичення цими сполуками. Промисловими продуцентами каротиноїдів можуть виступати різні групи організмів, зокрема водорості роду *Haematococcus* та дріжджі родів *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* і *Phaffia* (Frengova, Beshkova, 2009; Moline, 2012). Враховуючи те, що для вирощування лаборатор-

них культур планктонних ракоподібних традиційно використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, доцільним у біотехнології культивування зоопланктону є застосування дріжджів, але здатних до каротиногенезу. Перспективність використання каротинсинтезуючих дріжджів як кормового субстрату для зоопланктону пов'язана з мікробіологічним шляхом отримання каротиноїдів, що є економічно доцільнішим (Mata-Gómez et al., 2014; Latha et al., 2005).

Процес біосинтезу каротиноїдів мікроорганізмами значною мірою залежить від складу поживного середовища (El-Banna et al., 2012). Тому, кількісний та якісний склад каротиноїдів можна корегувати шляхом додавання в середовище культивування попередників отриманого продукту, індукторів або стимуляторів (Liu, 2006; Chanchay, 2012).

Відповідно, метою нашого дослідження було встановлення ефективності культивування зоопланктону за умов використання як кормового субстрату каротинсинтезуючих дріжджів *Rhodotorula glutinis*.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на культурі *Simosephalus vetulus* (Müller, 1776) (Cladocera). Культивування дафній здійснювали згідно загальноприйнятих методик (Біотехнологія культивування..., 1999) в ємностях об'ємом 0,5 л за 16-годинного фотоперіоду та температури $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в умовах кліматичної кімнати.

В якості харчового субстрату для зоопланктону використовували водні суспензії двох видів дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae* та *Rhodotorula glutinis*), стандартизовані за кількістю клітин 24×10^6 на 1 л живильного середовища. Підрахунок кількості клітин здійснювали з використанням камери Горяєва під біокулярним мікроскопом MicroMed XS-3300. Попередньо проведеними дослідженнями була визначена оптимальна тривалість пасажування, що становила 28 діб, з інтервалом внесення суспензії дріжджів 56 годин.

Дріжджі *R. glutinis* культивували на рідкому живильному середовищі глибинним способом. Культивування посівного матеріалу тривало 48 годин, а основна ферментація – 5 діб при $t=28^\circ\text{C}$ на шейкері ЛАБ-ПУ-01 (160 об./хв). Для стимулювання біосинтетичної активності нижчих грибів використовували: ретинолу ацетат, натрію ацетат, пероксид водню. Після деструкції дріжджових клітин на УЗДН-2Т та екстракції пігментів, здійснювали їх кількісне визначення спектрофотометричним методом (Fregova, 1994).

Визначення фракційного складу каротиноїдів проводили методом тонкошарової хроматографії у тонкому шарі сорбенту на пластинках "Silufol – UV – 254" (Чехія) з використанням різних систем

розчинників: ацетон-бензол-петролейний ефір-гексан (10:10:3:10), бензол-ацетон-хлороформ (5:5:4), гексан-бензол (29:1), гексан-бензол (9:1) та хлороформ (Чечета и др., 2008).

Визначення вмісту загальних протеїнів, загальних ліпідів та каротиноїдів у *S. vetulus* здійснювали згідно загальноприйнятих методик та обраховували на 1 г сухої речовини (Біохімія гідробіонтів..., 2009; Zooplankton methodology..., 2000; Продукты пищевые..., 2011).

Протягом періоду культивування визначали динаміку основних фізико-хімічних показників середовища. Рівень рН та ОВП фіксували за допомогою іономіру 1-160 МИ з використанням відповідних селективних електродів. Визначення електропровідності та загальної мінералізації середовища культивування проводили із застосуванням кондуктометра SX-650 «ULab». Контроль вмісту розчинного кисню проводили потенціометричним методом із застосуванням киснеміру PDO-607.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення *Microsoft Excel*. Відмінності результатів, що обговорюються в роботі, вірогідні при рівні достовірності $p \leq 0,05$ за критерієм Стьюдента. На рисунках представлені типові хроматограми.

Результати й обговорення. При оцінці якісного складу каротиноїдів дріжджів *R. glutinis* були застосовані різні системи розчинників. Використання більшості з них дозволило зафіксувати наявність однієї хроматографічної зони, ідентифікованої як такої, що належить β -каротину.

При використанні системи розчинників гексан-бензол (29:1) відмічено появу трьох пігментних смуг: жовто-оранжевого кольору (R_f 0,56), що свідчить про наявність β -каротину, жовто-рожевого (R_f 0,43) та червоно-оранжевого кольору (R_f 0,37). Останні вказують на можливу появу специфічних для *Rhodotorula* пігментів (рис. 1).

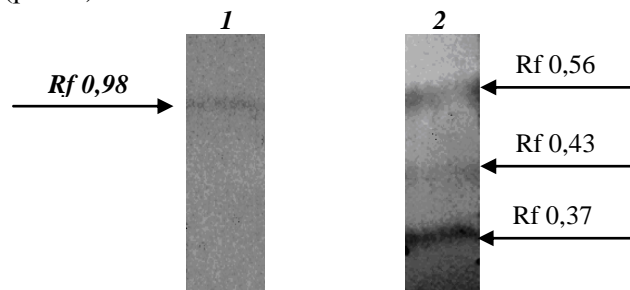


Рис. 1. Хроматографічний розподіл каротиноїдів *Rhodotorula glutinis*

Примітка: 1) хлороформ; 2) гексан-бензол (29:1).

Fig. 1. The chromatographic distribution of *Rhodotorula glutinis* carotenoids

Note: 1) chloroform; 2) hexane-benzene (29:1).

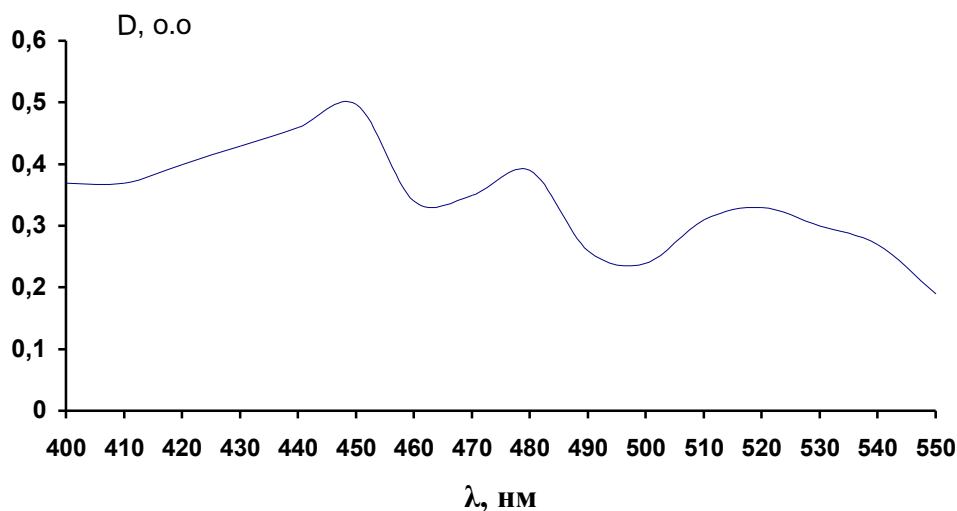


Рис. 2. Спектральна характеристика каротиноїдних пігментів *Rhodotorula glutinis*

Fig. 2. The spectral characteristic of carotenoid pigments of *Rhodotorula glutinis*

Результати хроматографічного аналізу були підтверджені спектрофотометричними дослідженнями у діапазоні 400-550 нм (Britton, 2004). Так, був зафіксований максимум поглинання при $\lambda = 450$ нм, характерний для β -каротину, інший пік (при $\lambda = 480$ нм) – притаманний торуліну. Зареєстрований третій максимум поглинання у діапазоні 510-520 нм дозволяє підтвердити наявність торулародину (рис. 2).

Для оцінки біосинтетичної здатності штамів-продуцентів біологічно активних речовин застосовують не лише їх якісну характеристику, а й кількісну. При визначенні вмісту загальних каротиноїдів та їх окремих фракцій зафіксований рівень каротиноїдів у клітинах *R. glutinis* 65 мкг/г сухої речовини, з яких на β -каротин припадає 52 мкг/г сухої речовини.

При дослідженні впливу ретинолу, ацетату натрію та перексиду водню на біосинтетичну здатність *R. glutinis* відмічено стимулюючу дію усіх використаних сполук на каротиногенез, причому максимальні зміни проявлялись за використання перексиду водню. Даний окислюючий агент викликав збільшення загального вмісту каротиноїдів у 2,3 рази, β -каротину – у 2,5 рази, торуліну – 1,7, торулародину – у 2 рази.

За умов додавання ацетату натрію зареєстровано зростання сумарного вмісту каротиноїдів, проте не виявлено значних змін у кількості червоних пігментів (торуліну, торулародину), цінних у промисловому відношенні та характерних саме для даного роду дріжджів. Використання даної сполуки, очевидно, доцільне у випадку направлено синтезу дріжджами *Rhodotorula* β -каротину. Найменшою мірою стимулюючий вплив на синтез пігментів проявляв ретинолу ацетат.

Попередній аналіз вмісту каротиноїдів у *R. glutinis* дозволяє передбачити їх використання як джерела каротиноїдів для *S. vetulus*. Так, використання *R. glutinis* як альтернативного харчового субстрату замість *S. cerevisiae* забезпечило збільшення вмісту загальних каротиноїдів майже в 2 рази та зміну відносної кількості інших нутрієнтів у організмі *S. vetulus* (табл. 1).

Показано, що зростання вмісту каротиноїдів може супроводжуватись стимулюванням транскрипційної активності мРНК (Ben-Dor et al., 2005), що, імовірно, може зумовлювати встановлене нами підвищення загальних протеїнів у дафній при вигодовуванні каротинсинтезуючими дріжджами. Поряд з цим, частка загальних ліпідів на фоні підвищення вмісту каротиноїдів скоротилася майже на 65%. Відомо, що споживання каротиноїдів може призводити до пригнічення диференціації адипоцитів із клітин-попередників (Tourniaire et al., 2009).

Табл. 1.

Нутрієнтний склад *S. vetulus* при використанні в якості харчового субстрату *S. cerevisiae* та *R. glutinis*

Табл. 1.

The nutritional composition of *S. vetulus* while using as a food substrate *S. cerevisiae* and *R. glutinis*

Нутрієнтний склад	Харчовий субстрат	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Каротиноїди, мкг/г	148,2 ± 23,63	355,6 ± 25,66
Протеїни, мг/г	501,7 ± 43,79	861,3 ± 79,01
Ліпіди, мг/г	179,3 ± 5,27	114,5 ± 13,40

Примітка: Усі відмінності є достовірними при $p \leq 0,05$.
Note: All differences are significant at $p \leq 0,05$.

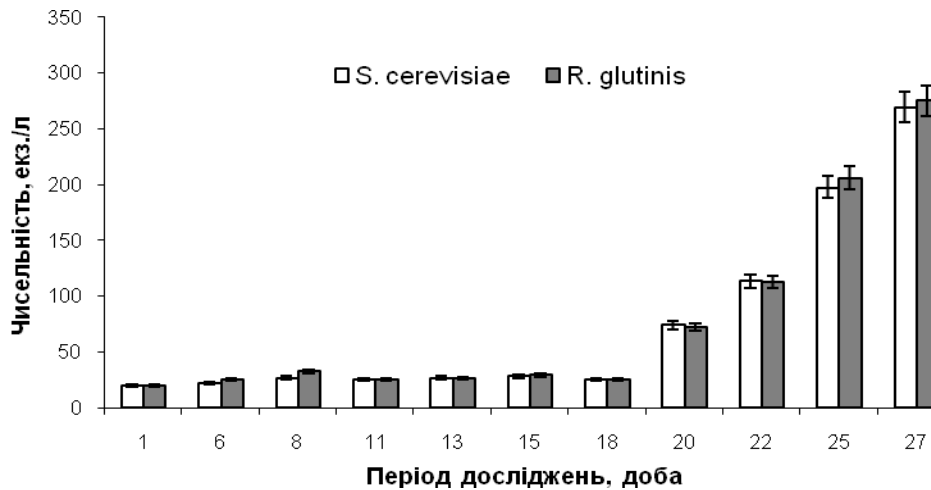


Рис. 3. Динаміка кількості особин *S. vetulus* у монокультурі при вирощуванні з використанням дріжджів *S. cerevisiae* та *R. glutinis*

Fig. 3. The dynamics of *S. vetulus* individuals' amount in monoculture during the growth while using the yeast *S. cerevisiae* and *R. glutinis*

Корекція нутрієнтного складу кормових організмів може супроводжуватись зниженням показників темпів росту культури. За результатами проведених досліджень заміна дріжджів *S. cerevisiae* на каротинсинтезуючі як харчового субстрату не призвела до пригнічення культури

S. vetulus (рис. 3). Позитивним також є те, що вигодовування дафній каротинсинтезуючими дріжджами не призводить до істотних змін основних фізико-хімічних показників культивування середовища у порівнянні з контрольною групою, вирощеною на *S. cerevisiae* (рис. 4).

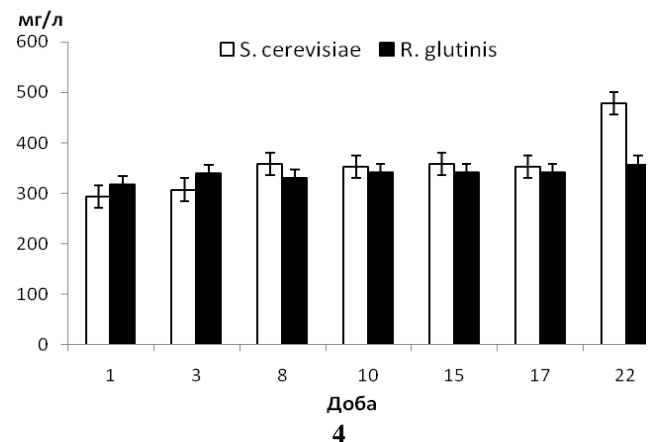
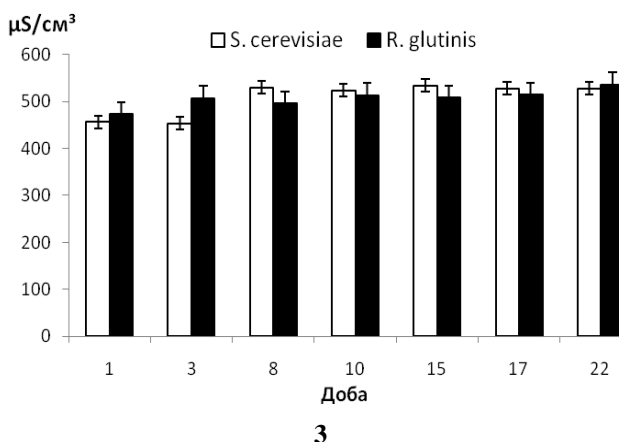
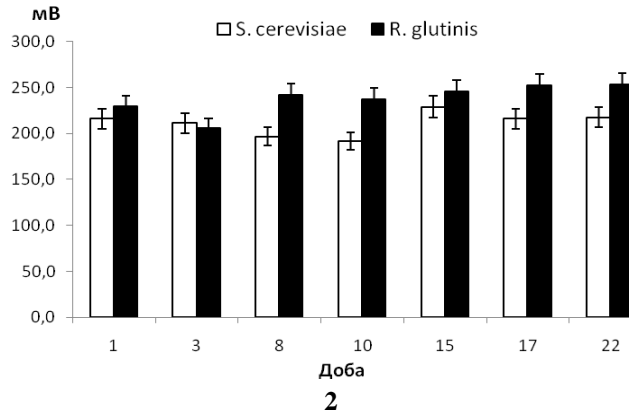
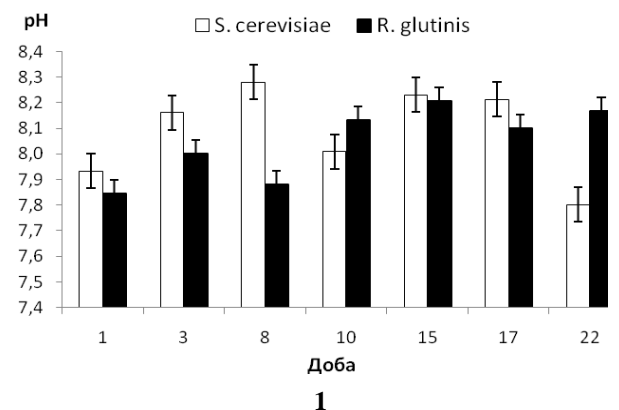


Рис. 4. Динаміка фізико-хімічних показників культурального середовища під час культивування *S. vetulus* при використанні дріжджів *S. cerevisiae* та *R. glutinis*

Fig. 4. The dynamics of physicochemical parameters of the culture medium during cultivation of *S. vetulus* while using the yeast *S. cerevisiae* and *R. glutinis*

Примітка: 1) рН; 2) ОВП (мВ); 3) електропровідність ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$); 4) загальна мінералізація (мг/л).

Note: 1) pH; 2) redox potential (mV); 3) conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$); 4) total mineralization (mg/l).

Так, протягом всього періоду культивування вміст розчиненого кисню залишався у межах 5,0-6,5 мг/л. Стабільнішими виявилися показники рН, електропровідності та загальної мінералізації при вирощуванні *S. vetulus* на *R. glutinis*. Це зумовлює можливість скорочення кількості операцій контролю якості культиваційного середовища, що дозволяє істотно спростити технологію насичення зоопланктону каротиноїдами мікробіологічного походження.

Висновки. Застосування каротинсинтезуючих дріжджів *R. glutinis* у якості кормового субстрату для *S. vetulus* дозволяє збагатити живі корми каротиноїдами майже у 2 рази, що може підвищити їх харчову цінність для личинок риб. Окрім того, використання *R. glutinis* забезпечує подібний приріст монокультури, як і в дослідках з використанням *S. cerevisiae*, однак в меншій мірі спричиняє зміну фізико-хімічних показників середовища культивування.

Список літератури:

1. Біохімія гідробіонтів / [Л.П. Вогнівенко, М.Ю. Свтушенко, М.В. Шевряков та ін.]. – Херсон: Олді-плюс, 2009. – 536 с.
2. Биологически активные вещества пресноводных ракообразных: способы получения и перспективы применения / Мукатова М.Д., Привезенцев А.В., Боева Т.В., Юнес А.М. // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. – 2009. – №2. – С. 109–113.
3. Биотехнология культивирования гидробионтов / Романенко В.Д., Крот Ю.Г., Сиренко Л.А., Соломатина В.Д. – К.: Институт гидробиологии НАН Украины, 1999. – 243 с.
4. Блага О.М. Жирнокислотний склад природних і штучних кормів ставів / О.М. Блага, М.М. Цап, Й.Ф. Рівіс // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. – 2008. – Вип. 9, №3. – С. 11–20.
5. Продукты пищевые функциональные. Метод определения каротиноидов: ГОСТ Р 54058-2010. – М.: Стандартинформ, 2011. – 8 с.
6. Чечета О.В. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента / О.В. Чечета, Е.В. Сафонова, А.И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8, Вып. 2. – С. 320–326.
7. Ben-Dor A. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system / [A. Ben-Dor, M. Steiner, L. Gheber et al.] // Mol. Cancer. Ther. – 2005. – 4 (1). – P. 177–186.
8. Bogut I. Nutritional value of planktonic cladoceran *Daphnia magna* for common carp (*Cyprinus carpio*) fry feeding / I. Bogut, Z. Adameck et al. // Ribalstvo. – 2010. – 68 (1). – P. 2–12.
9. Britton G. Carotenoids: Handbook / G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – Springer, 2004. – 647 p.
10. Carotenoids: physical, chemical, and biological functions and properties / Edit. John T. Landrum. – CRC Press, 2009. – 568 p.
11. Chanchay N. Optimal conditions for carotenoid production and antioxidation characteristics by *Rhodotorula rubra* / N. Chanchay, S. Sirisansanuyarul, C. Chaiyasut, N. Poosaran // World academy of science, engineering and technology. – 2012. Vol. 68. – P. 8 – 29.
12. El-Banna A.A. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* / Amr A. El-Banna, Amal M. Abd El-Razek, Ahmed R. El-Mahdy // Food and Nutrition Sciences. – 2012. – Vol. 3, №1. – P. 64–71.
13. Frengova G. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate / G. Frengova, E. Simova, K. Pavlova, D. Beshkova, D. Grigorova // Biotechnology and Bioengineering. – 1994. – Vol.44. – P. 888–894.
14. Frengova G.I. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance / G.I. Frengova, D.M. Beshkova // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 36. – P. 163–180.
15. Latha B.V. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source / B.V. Latha, K. Jeevaratnam, H.S. Murali, K.S. Manja // Indian Journal of Biotechnology. – 2005. – Vol. 4. – P. 353–357.
16. Lavens P. Manual on the production and use of live food for aquaculture / P. Lavens, P. Sorgeloos. – Rome, FAO Fisheries Technical Paper, 1996. – 295 p.
17. Liu Y.S. Hydrogen peroxide induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous* / Y.S. Liu, J.Y. Wu // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol.73. – P.663–668.
18. Mata-Gómez L.C. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview / L.C. Mata-Gómez, J.C. Montañez, A. Méndez-Zavala et al. // Microbial Cell Factories. – 2014. – №13. – P. 12–23.
19. Moline M. Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts / Moline M, Libkind D., van Broock M. // Methods Mol. Biol. – 2012. – Vol. 898. – P.275–283.
20. Stahl W. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids / W. Stahl, H. Sies // Biochimica et Biophysica Acta. – 2005. – Vol. 1740, №2. – P. 101–107.
21. Tourniaire F. β -Carotene conversion products and their effects on adipose tissue / [F. Tourniaire, E. Gouranton, J. von Lintig et al.] // Genes Nutr. – 2009. – №4. – P. 179–187.
22. Zooplankton methodology manual / Harris R.P., Wiebe P.H., Lenz J., Skjoldal H.R. et al. – London: Academic Press, 2000. – 684 p.

THE APPLICATION OF YEAST *RHODOTORULA GLUTINIS* FOR CULTIVATION OF *SIMOCEPHALUS VETULUS* (MÜLLER, 1776) UNDER THE LABORATORY CONDITIONS

O. V. Kushniryk, M. M. Marchenko, O. I. Khudyi, L. M. Vasina, L. V. Khuda,
O. M. Kavulya

The usage of live feeds on the early stages of fish post-embryonic development has a positive effect on the fry survival and growth processes. Zooplankton which commonly used as live food is not able to synthesize such important groups of substances for normal development of animal organism as carotenoids, but only to their accumulation. In this regard, the important issue is the development of technology in vivo saturation of forage organisms by carotenoids. The different groups of organisms, including algae of the genus Haematococcus and yeast of genera Rhodosporidium, Rhodotorula and Phaffia, can serve as industrial producers of carotenoids. Given that for growing laboratory cultures of planktonic crustaceans the yeast Saccharomyces cerevisiae is traditionally used, the appropriate trend in the biotechnology of zooplankton cultivation is application of yeast, but capable of carotenogenesis. One of such species is Rhodotorula glutinis. In assessing the qualitative composition of carotenoids in R. glutinis it was used a variety of solvents in the following combinations: acetone-benzene- petroleum ether-hexane (10:10:3:10), benzene-acetone-chloroform (5:5:4), hexane-benzene (9:1) and chloroform. Their use has allowed to detect the presence of one chromatographic zone – β -carotene. When using an another system of solvents – hexane-benzene (29:1) – it was made able to identify three pigmented bands, corresponding β -, γ -carotene and xanthophylls torulin and torularodyn whose presence was confirmed by spectrophotometric studies. In the study of retinol, sodium acetate and hydrogen peroxide influence on the biosynthetic ability of R. glutinis it was observed the catalytic effect of compounds on the carotenogenesis, with maximum changes shown when using hydrogen peroxide. It was established that the usage of R. glutinis as feed substrate causes an increase the carotenoid content in live feeds almost 2 times, and is accompanied by an increase in total protein content and a decrease in the share of total lipids. It should be noted that the replacement of the yeast S. cerevisiae to carotene-productional yeast do not significantly impacts on the growth dynamics of the culture S. vetulus. Analysis of physical and chemical characteristics of the culture medium showed minor fluctuations of dissolved oxygen and stable pH, redox potential, conductivity and total mineralization when growing S. vetulus on R. glutinis. This leads to the possibility of reducing the number of operations by control the quality of cultural medium, what can significantly simplify the technology of zooplankton saturation by carotenoids of microbiological origin.

Keywords: cultivation, Simocephalus vetulus, yeast, Rhodotorula glutinis, Saccharomyces serevisiae, carotenoids.

Одержано редколлегією 10.03.2014