

ДИНАМІКА НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ Й КАРОТИНОСИНТЕЗУЮЧА АКТИВНІСТЬ *RHODOTORULA GLUTINIS* (FRESENIUS) F. C. HARRISON (1982) ЗА ДІЇ УЛЬТРАФІОЛЕТУ

I. M. КРАЄВСЬКА, Л. M. ВАСІНА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
кафедра біохімії та біотехнології,
вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012, Україна,
ivannakraievska@gmail.com

Для дріжджів *Rhodotorula glutinis* характерна висока здатність утворювати різноманітні цінні біологічно активні речовини, зокрема і каротиноїди. Цю велику групу пігментів широко використовують у різних галузях промисловості, в тому числі й аквакультури для стимуляції розвитку ікри та личинок, нормалізації життєдіяльності дорослих особин гідробіонтів. Серед інших мікроорганізмів дріжджі *Rhodotorula* вирізняються швидкістю росту, властивістю засвоювати легко- та важкодоступні вуглецеві субстрати, невибагливістю до мінерального складу поживного середовища, розмноженням за низьких значень рН. Нині триває активний пошук методів інтенсифікації синтезу пігментних сполук мікроорганізмами та здешевлення їх виробництва. У даній роботі апробовано метод фізичного мутагенезу ультрафіолетовим випромінюванням типу С з довжиною хвилі 254 нм. Експозицію мікроорганізмів ультрафіолетом здійснювали після 48-годинного культивування на твердому середовищі бактерицидними лампами у стерильних умовах протягом 120 хв на відстані 40 см від поверхні середовища. За дії УФ-С отримано культуру *Rhodotorula glutinis* з високою каротиносинтезуючою активністю. Показано, що після опромінення інтенсивність накопичення біомаси дріжджів зменшувалася в 1,5 разу. Вміст β -каротину у клітинах зміненого штаму зростає на 25 %, концентрація торулародину – на 69 % порівняно з нативною культурою, а торуліну виявляли незначну кількість. Поряд з цим помічено зміни окремих характеристик колоній порівняно із нативним штамом. Наприклад такі, як: поява яскраво-помаранчевого чи яскраво-рожевого забарвлення (на противагу блідо-помаранчевому у нативному штамі), матовий характер поверхні колоній (глянцевий для нативного) та прискорений час виникнення пігментації.

Ключові слова: *Rhodotorula glutinis*, біомаса, каротиноїди, УФ, мутагенез.

Вступ. Мікробіологічний синтез залишається актуальним методом отримання цінних біологічно активних речовин через свою економічну доцільність, можливість здійснення за нормальних умов, а також порівняно високий вихід та біодоступність цільових метаболітів (Magova et al., 2011). Тому пошук продуцентів, удосконалення методів їх культивування, стимуляції біосинтетичних властивостей – важлива проблема сучасної біотехнології.

Перспективними мікроорганізмами, яким притаманна висока синтетична активність корисних метаболітів, незначна вибагливість до умов культивування та складу поживного середовища є дріжджі *Rhodotorula glutinis*. Це прототрофні мікроскопічні гриби з великою швидкістю росту. Вони здатні продукувати широкий спектр біологічно активних речовин (БАР): ергостерол, ліпіди, екзополісахариди, багато цінних ферментів, а також каротиноїди – β -каротин, торулін та торулародин (Hernandez-Almanza et al., 2013).

Ці пігменти – важливі продукти мікробіологічного синтезу, оскільки вони

широко застосовуються тепер у різноманітних галузях виробництва: фармацевтичній, хімічній, кормовій, харчовій та інших (Kot et al., 2016). Це зумовлено корисними властивостями каротиноїдів, оскільки вони є попередниками вітаміну А, природними барвниками, здатні проявляти антиоксидантну, імуномодулюючу та канцеропротекторну дії (Сімонова, 2010; Skibsted, 2012).

Відомо, що нагромадження біомаси та синтез цінних метаболітів не завжди синхронізовані у часі та залежні від ідентичних факторів культивування. Індукторами синтезу метаболітів можуть бути попередники цінних речовин, стимулятори росту, а також мутагенні фактори (El-Banna et al, 2012). Зокрема, чинником, який тісно пов'язаний із накопиченням пігментних сполук, є ультрафіолетове випромінювання. Каротиноїди у дріжджовій клітині виконують роль фотопротекторів, компенсуючи відсутність специфічних антиоксидантних ензимів (Moline et al., 2012). Тому у відповідь на дію ультрафіолетового світла в клітинах мікроорганізмів відбувається інтенсивне

збільшення синтезу протекторних сполук, насамперед пігментів.

Метою роботи була апробація методів, що дозволили б збільшити каротинсинтезуючу активність дріжджів *Rhodotorula glutinis*.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження слугувала колекційна культура виду *Rhodotorula glutinis* УКМ Y-1242.

Посівний матеріал отримували культивування у рідкому середовищі Сабуро протягом 2 діб за температури 28°C. Концентрацію мікроорганізмів доводили до сталої величини та висівали у чашки Петрі. Після 48-годинного вирощування на твердому середовищі проводили опромінення бактерицидними лампами ДБ-60 з довжиною хвилі 254 нм у стерильних умовах протягом 120 хв на відстані 40 см від поверхні культури. Надалі колонії культивували 48 годин за попередньої температури у темряві, щоб уникнути фоторепарації генетичного матеріалу. Селекцію колоній здійснювали за ступенем інтенсивності їх забарвлення (Moline et al., 2012).

Біомасу відділяли від культуральної рідини центрифугуванням протягом 15 хв при 3000 об/хв на центрифугі ОПН-8. Осад відбирали та здійснювали хімічний гідроліз клітин 1Н розчином HCl. Надалі центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв для отримання осаду, з яким здійснювали подальші маніпуляції. Екстракцію пігментів виконували 100 %-ним ацетоном вичерпно до знебарвлення екстракту. Одержані екстракти випарювали до сухого залишку, потім перерозчиняли у тому ж розчиннику та використовували для якісно-кількісної реєстрації каротиноїдів (Machmudah, Goto, 2013).

Динаміку накопичення біомаси оцінювали, вимірюючи оптичну густину суспензії за допомогою спектрофотометра СФ 46 при довжині хвилі $\lambda = 625$ нм.

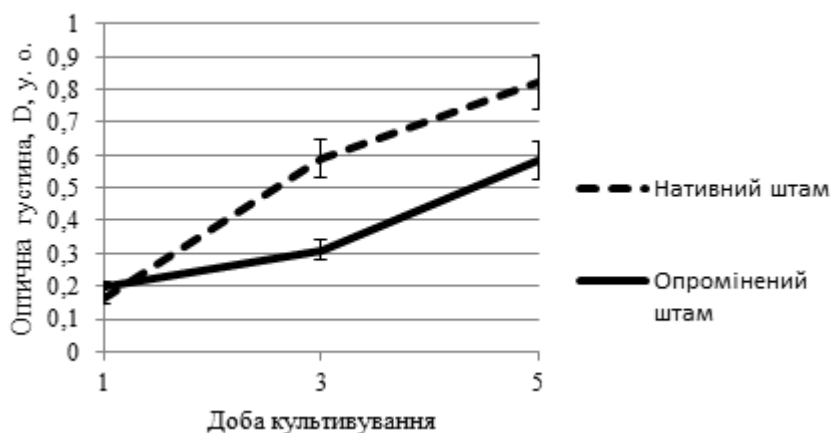


Рис. 1. Накопичення біомаси у нативній та опроміненій культурах дріжджів *R. glutinis*.

Визначення концентрації окремих пігментів проводили без попереднього розділення суміші на основі оптичної густини розчину. Виміри здійснювали при відповідних довжинах хвиль (450, 537, 509 нм) на спектрофотометрі Agilent Cary 60 та розраховували за відповідними формулами (Кирица, 2005).

Статистичну обробку даних виконували за критерієм Стьюдента. Отримані результати достовірні при значенні $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Ультрафіолетове випромінювання – фізичний мутаген, який спричиняє зміни в молекулі ДНК. Тому більшість організмів у процесі еволюції виробили різні стратегії боротьби з УФ. У клітинах дріжджів виявлено кілька речовин, які беруть участь у фотопротекції мікроорганізму: каротиноїди, мікоспорини та ергостерол (Moline, 2012). Підвищені дози ультрафіолету, індуючи утворення захисних сполук, використовуються як метод направленої синтезу цінних БАР. За літературними даними (Moline, 2010), для створення мутантних штамів із високими каротинсинтезуючими властивостями опромінення проводять УФ-А (з діапазоном довжини хвиль 400–315 нм) чи УФ-В (315–280 нм), зважаючи на їх низьку цитоцидну дію. Проте не досліджувався вплив УФ типу С на каротиногенез *Rhodotorula glutinis*.

Тому нами використано УФ-С з довжиною хвилі 254 нм. Після експозиції ультрафіолетом проводили кількаразове пасажування. Результатом селекції стало отримання культури, яка за своїми фізіолого-біохімічними та культуральними властивостями відрізнялася від нативної лінії. Зокрема це стосувалося швидкості накопичення біомаси (рис. 1).

Fig. 1. Accumulation of biomass in native and irradiated cultures of yeast *R. glutinis*.

Таблиця 1.
Порівняльна характеристика особливостей
нативної та опроміненої культур

Table 1.
Comparative characteristics of the native and
irradiated cultures

Ознака	Нативна культура	Опромінена культура
Колір	блідо-помаранчевий	яскраво-помаранчевий чи яскраво-рожевий
Характер поверхні	матова	глянцева
Час появи пігментації	4–5 доба	3 доба

Дослідження показало зменшення інтенсивності накопичення біомаси опроміненних мікроорганізмів в 1,5 разу. Такий ефект можна пояснити деструктивним впливом УФ на ДНК (Rastogi et al., 2010). Серед наслідків руйнівного впливу зазначають: окислювальну деструкцію, пов'язану як з безпосередньою дією опромінення, так і опосередкованою, внаслідок утворення вільних радикалів; появу розривів в одному чи обох ланцюгах ДНК; утворення УФ-індукованих піримідинових та пуринових фотопродуктів.

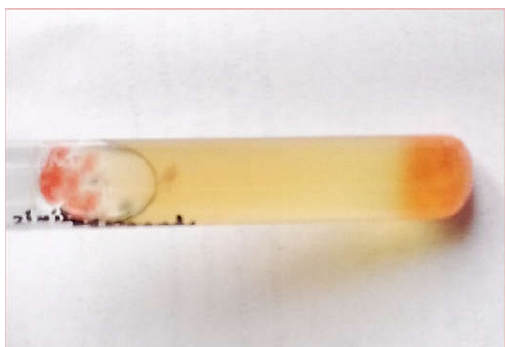


Рис. 2. Забарвлена плівка на поверхні рідкого
поживного середовища

Fig. 2. Painted pellicle on the surface of liquid nutrient
media

Також зазначено зміни окремих критеріїв, за якими зазвичай характеризують колонії

(табл. 1), насамперед колір та характер їх поверхні.

Окрім того, на поверхні рідкого поживного середовища після культивування протягом 5 діб помічено утворення плівки, що не було притаманне нативній культурі (рис. 2).

Водночас нами зафіксовано помітне підвищення каротиносинтезуючої активності культури (рис. 3).

Вміст β -каротину у клітинах дріжджів після опромінення збільшився на 25 %, а вміст торулародину – на 69 % порівняно з нативною культурою. При цьому торуліну була незначна кількість.

Такий вплив дії ультрафіолетового опромінення на пігментний склад дріжджів пояснюється особливостями метаболізму каротиноїдів. Як відомо, торулародин – це пігмент із високим антиоксидантним потенціалом, потужний поглинач синглетного кисню та пероксидних радикалів. При цьому ефективно гальмуються процеси пероксидного окиснення ліпідів, викликані дією УФ-випромінювання. За літературними даними (Moline et al., 2010), торулародин інгібує пероксиди ефективніше, ніж β -каротин та α -токоферол. Тому накопичення цього каротиноїду є відповіддю дріжджової клітини на окисдаивний стрес, спричинений дією УФ-променів.

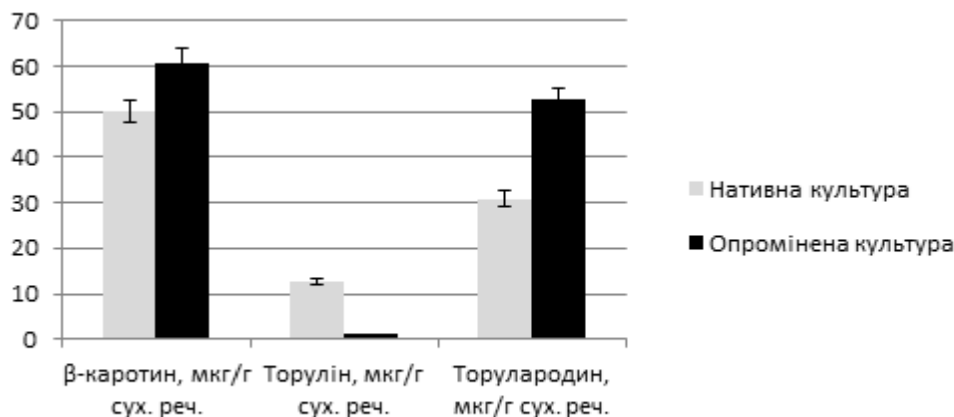


Рис. 3. Вміст каротиноїдів у клітинах нативної
та опроміненої культур R. glutinis

Fig. 3. The content of carotenoids in the cells of native
and irradiated cultures of R. glutinis

Відсутність торуліну може пояснюватися специфікою синтезу каротиноїдів: вважається, що видоспецифічний пігмент торулародин формується з торуліну через реакції гідроксилювання та оксигенації (Kot et al., 2016). Як свідчать літературні дані (Frengova, Beshkova, 2009), у мутантів *Rhodotorula glutinis*, отриманих за дії УФ-В, загальна кількість каротиноїдів зростає у 1,8-24 рази порівняно з дикими штамми, причому синтез їх відбувається за коротший час, а частка β-каротину становить від 60 до 80 %. Разом з цим відзначають незначний вміст торулародину, очевидно, пов'язаний з порушенням оксидазної активності. **Висновки.** За дії УФ-С отримано культуру *Rhodotorula glutinis*, яка володіла значною здатністю до каротиногенезу. Серед ідентифікованих пігментів найбільше змінювався вміст утворюваних нею β-каротину та торулародину.

Список літератури

1. Кирица Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23. – Кичнев, 2005. – 129 с.
2. Симонова М. Каротиноїди: будова, властивості та біологічна дія // Біологічні студії. – 2010. – Т. 4, № 2. – С. 159–170.
3. El-Banna A.A., El-Razek A. M., El-Mahdy A.R. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* // Food and nutrition sciences – 2012. – Vol. 3. – P. 64–67.
4. Frengova G. I., Beshkova D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance // Journal of industrial microbiology & biotechnology – 2009. – № 36. – P. 163–180.
5. Hernandez-Almanza A., Montanez J.C., Aguilar-Gonzalez M. A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry // Food bioscience. – 2014. – Vol. 5. – P. 64–72. doi: 10.1016/j.fbio.2013.11.007
6. Kot A.M., Blazejak S., Kurcz A. et al. *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries // Applied microbiology and biotechnology. – 2016. – Vol.100. – P.6103-6117.
7. Machmudah S., Goto M. Methods for extraction and analysis of carotenoids // Natural products. – 2013. – Vol. 3. – С. 3367–3411.
8. Marova I., Certik M., Breierova E. Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts – application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds // Biomass – detection, production and usage / Edited by Matovic D. – Rijeka, Croatia: InTech, 2011. – P.345–384.
9. Moline M., Flores M.R., Libkind D. Et al. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2010. – Vol. 9, №. 8. – P. 1145–1151.
10. Moline M., Libkind D., van Broock M. Production of torularhodin, torulene, and β-carotene by *Rhodotorula* yeasts // Microbial Carotenoids From Fungi / Edited by Barredo J.L. / Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), Vol. 898. – Humana Press, Totowa, NJ, 2012. – P. 275–283.
11. Rastogi R. P., Richa, Kumar A. et al. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair [Електронний ресурс] // Journal of nucleic acids. – 2010. – Режим доступу: <https://www.hindawi.com/journals/jna/2010/592980/>
12. Skibsted L. H. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers // Journal of agricultural and food chemistry. – 2012. –Vol. 60., №. 10. – С. 2409–2417.

References

1. Kiritsa E. Directional synthesis of carotenoids in yeasts and the prospect of their embedding: diss. ... of the biology: 03.00.23. – Kishinev, 2005. – 129 p. (In Russian)
2. Simonova M. Carotinoids: structure, peculiarity and biological effect // Biological studies. – 2010. – Vol. 4, № 2. – P. 159–170. (In Ukrainian)
3. El-Banna A.A., El-Razek A. M., El-Mahdy A.R. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* // Food and nutrition sciences – 2012. – Vol. 3. – P. 64–67.
4. Frengova G. I., Beshkova D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance // Journal of industrial microbiology & biotechnology – 2009. – № 36. – P. 163–180.
5. Hernandez-Almanza A., Montanez J.C., Aguilar-Gonzalez M. A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry // Food bioscience. – 2014. – Vol. 5. – P. 64–72. doi: 10.1016/j.fbio.2013.11.007
6. Kot A.M., Blazejak S., Kurcz A. et al. *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries // Applied microbiology and biotechnology. – 2016. – Vol.100. – P.6103-6117.
7. Machmudah S., Goto M. Methods for extraction and analysis of carotenoids // Natural products. – 2013. – Vol. 3. – С. 3367–3411.
8. Marova I., Certik M., Breierova E. Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts - application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds // Biomass – detection, production and usage / Edited by Matovic D. – Rijeka, Croatia: InTech, 2011. – P.345–384.
9. Moline M., Flores M.R., Libkind D. Et al. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2010. – Vol. 9, №. 8. – P. 1145–1151.
10. Moline M., Libkind D., van Broock M. Production of torularhodin, torulene, and β-carotene by *Rhodotorula* yeasts // Microbial Carotenoids From Fungi / Edited by Barredo J.L. / Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), Vol. 898. – Humana Press, Totowa, NJ, 2012. – P. 275–283.

11. Rastogi R. P., Richa, Kumar A. et al. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair [Електронний ресурс] // Journal of nucleic acids. – 2010. – Режим доступу: <https://www.hindawi.com/journals/jna/2010/592980/>
12. Skibsted L. H. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers // Journal of agricultural and food chemistry. – 2012. – Vol. 60, №. 10. – С. 2409–2417.

DYNAMICS OF BIOMASS AND CAROTINOGENESIS ACTIVITY RHODOTORULA GLUTINIS (FRESENIUS) F. C. HARRISON (1982) AFTER THE EFFECT OF ULTRAVIOLET

I. M. Kraievska, L. M. Vasina

Yeast Rhodotorula glutinis is characterized by a high ability to form various valuable biologically active substances, including carotenoids. This large group of pigments is widely used in various industries, including aquaculture to stimulate the development of caviar and larvae, normalizing the life of adult individuals hydrobionts. Among other microorganisms, yeasts Rhodotorula are characterized by growth rate, the ability to digest easily and hardly accessible carbon substrates, the unpretentiousness to the mineral composition of the nutrient medium, and reproduction in low pH values. At present, an active search for methods for intensifying the synthesis of pigment compounds by microorganisms and cheapening their production is underway. In this paper, the method of physical mutagenesis is tested by ultraviolet radiation of type C with a length of 254 nm. Exposure of microorganisms by ultraviolet radiation was carried out after 48-hour cultivation on solid medium by bactericidal lamps in sterile cells for 120 minutes at a distance of 40 cm from the surface of the medium. Under the action of UV-C, the culture of Rhodotorula glutinis, which has a high level of carotenoid synthesis activity. It was shown that after irradiation the intensity of accumulation of biomass of yeast decreased by 1.5 times. The content of β -carotene in modified strain cells increased by 25%, the concentration of torulodone was 69% higher than that of native culture, and torulin was found in non-intestinal quantities. At the same time, changes in the individual characteristics of the colonies were noted compared to the native strain. Among them: the appearance of bright orange or bright pink color (as opposed to pale orange in the native strain), the matte nature of the surface of the colonies (glossy for native) and accelerated appearance of pigmentation.

Key words: Rhodotorula glutini, biomass, carotenoids, UV, mutagenesis.

Отримано редколегією 16.12.2017