

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ОЦІНКА ВМІСТУ КАРОТИНОЇДІВ У БІОМАСІ RHODOTORULA ЗІ ДІЇ
РІЗНИХ ЕКСТРАГЕНТІВ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 407 групи
Адамкович Валерія Сергіївна

Керівник:

кандидат біологічних наук,
доцент **Худа Л.В.**

*До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2024 р.
Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г. П.*

Чернівці – 2024

Анотація

Ключові слова: *органічний розчинник, екстракція, каротиноїди, Rhodotorula glutinis, R. minuta, Rhodotorula rubra, етанол, хлороформ, ацетон, УФ опромінення*

Дипломна робота присвячена підбору органічного розчинника, який би забезпечував найефективнішу екстракцію каротиноїдів з біомаси *Rhodotorula glutinis* УКМ Y-1295, *R. minuta* УКМ Y-1349 та *Rhodotorula rubra*.

Встановлено, що максимальний вміст загальних каротиноїдів, які були екстраговані з біомаси дріжджів *Rhodotorula*, отриманий при використанні етанолу та суміші хлороформ-етанол. Зареєстровано, що на максимальний вихід специфічних торуліну та торулародину впливає застосування хлороформ-етанольної та хлороформ-ацетонової сумішей. Застосування УФ опромінення ($\lambda=254$ нм) культури *R. minuta* призвело до збільшення виходу торулародину за умов екстракції етанолом у 3,3 рази в порівнянні з нативним штамом при незмінній кількості екстрагованого β -каротину.

Annotation

Keywords: *organic solvent, extraction, carotenoids, Rhodotorula glutinis, R. Minuta, Rhodotorula rubra, ethanol, chloroform, acetone, UV irradiation*

The bachelor's thesis is devoted to the to selecting an organic solvent that ensures the most effective extraction of carotenoids from the biomass of *Rhodotorula glutinis* UKM Y-1295, *R. minuta* UKM Y-1349, and *Rhodotorula rubra*.

It has been established that the maximum content of total carotenoids extracted from the biomass of *Rhodotorula* yeast is obtained using ethanol and a chloroform-ethanol mixture. It has been recorded that the maximum yield of specific torulene and torularhodin is influenced by the application of chloroform-ethanol and chloroform-acetone mixtures. The application of UV irradiation ($\lambda=254$ nm) to the *R. minuta* culture led to a 3.3-fold increase in the yield of torularhodin under ethanol extraction conditions compared to the native strain, with an unchanged amount of extracted β -carotene.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ В.С. Адамкович

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Загальна характеристика каротиноїдів та їх класифікація.....	6
1.2. Дріжджі – продуценти каротиноїдів.....	10
1.3. Шляхи біосинтезу каротиноїдів у <i>Rhodotorula</i>	15
1.4. Методи екстракції каротиноїдів.....	18
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	21
2.1. Матеріали дослідження.....	21
2.2. Методи дослідження.....	23
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	25
3.1. Оцінка вмісту загальних каротиноїдів та їх фракцій в біомасі дріжджів <i>Rhodotorula</i> sp. за умов екстракції різними органічними розчинниками та їх сумішами.....	25
3.2. Вміст каротиноїдів у біомасі УФ-опроміненої культури <i>Rhodotorula minuta</i>	31
ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	36

ВСТУП

На сьогоднішній день каротиноїди є досить затребуваними сполуками в промисловій біотехнології. До каротиногенезу здатні рослини, деякі види дріжджів, водоростей та бактерій. Дані пігменти виконують ряд функцій, зокрема, антиоксидантну, антиканцерогенну, захист від ультрафіолету, надають колір живим організмам [4]. Завдяки своїм властивостям каротиноїди є досить цінною сировиною і можуть використовуватися в харчовій, медичній, косметологічній, хімічній галузях та в кормовиробництві.

Переваги природних каротиноїдів над синтетичними пігментами, насамперед відсутність токсичної дії на організм людини та тварин, спричиняють активні дослідження в напрямку пошуку продуцентів каротиноїдів та способів їх вилучення [5].

Перспективним шляхом промислового отримання каротиноїдів є мікробний синтез. Серед основних переваг мікроорганізмів-продуцентів каротиноїдів - швидкий ріст та висока здатність до накопичення біомаси.

Особливої уваги серед мікробних продуцентів каротиноїдів заслуговують здатні до каротиногенезу дріжджі роду *Rhodotorula* spp, які синтезують, зокрема β -, γ -каротин, астаксантин, торулін, торулародин. Родина *Rhodotorula* включає близько 40 видів дріжджів. Найвідомішими серед них є *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra*, які відрізняються морфологією, особливостями культивування та здатністю накопичувати каротиноїди.

Екстракція є одним із головних етапів вилучення каротиноїдів із біомаси продуцентів. Однак для каротиноїдів притаманні процеси швидкого окислення, що обмежує вплив тепла, світла, різних кислот та тривалості екстракції. Методи екстракції, які досить широко застосовують при вилученні каротиноїдів, можна класифікувати наступним чином: екстракція за допомогою мікрохвиль або ультразвуку; за допомогою імпульсного електричного поля; за допомогою різних типів розчинників [4,5].

Завдяки своїм гідрофобним властивостям каротиноїди найчастіше екстрагують за допомогою органічних розчинників, зокрема метанолу, етанолу, хлороформу, ацетону, гексану, петролейного ефіру, етилацетату тощо [4].

Однією з найголовніших функцій каротиноїдів є фотопротекторна. Показано, що опромінення як фізичний чинник може бути застосоване з метою інтенсифікації каротиногенезу у штамів-продуцентів.

Отже, метою роботи підбір органічного розчинника, який би забезпечував найефективнішу екстракцію каротиноїдів з біомаси *Rhodotorula glutinis* УКМ Y-1295, *R. minuta* УКМ Y-1349 та *Rhodotorula rubra*.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Провести екстракцію каротиноїдів з біомаси каротиногенних дріжджів *Rhodotorula glutinis* УКМ Y-1295, *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349 та *Rhodotorula rubra*.

2. Визначити вміст загальних каротиноїдів та їх фракцій (β -каротину, торулародину, торуліну) за дії різних екстрагентів.

3. Порівняти вміст загальних каротиноїдів та їх фракцій, екстрагованих з нативної та попередньо опроміненої ультрафіолетовим опроміненням ($\lambda=254$ нм) біомаси *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика каротиноїдів. Класифікація каротиноїдів

Каротиноїди (лат. Carotinoida, лат. Carota — морква) — жовті, жовтогарячі або червоні пігменти, які мають циклічну чи ациклічну будову та складаються із восьми залишків ізопрену, з'єднаних таким чином, що дві найближчі до центру молекули метильних груп знаходяться у положеннях 1:6, тоді як всі інші бокові метильні групи розміщені в положеннях 1:5, а серії кон'югованих подвійних зв'язків між атомами карбону складають хромофорну систему каротиноїдів (рис.1.1.). Вони можуть бути синтезовані бактеріями, грибами і вищими рослинами [1,16].

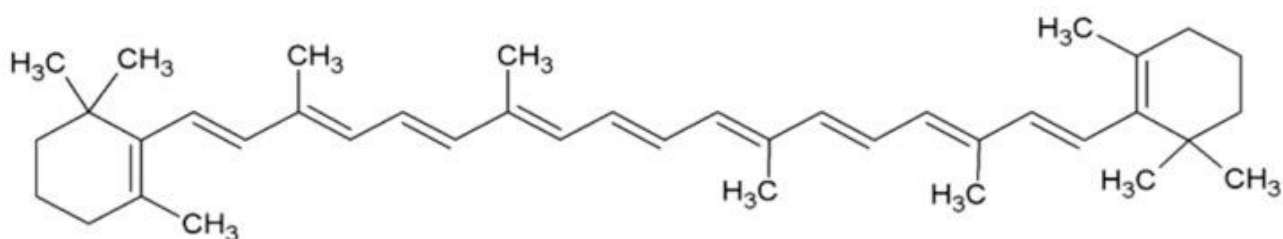


Рис.1.1. Структурна формула β-каротину [32]

За хімічним складом каротиноїди класифікують на:

- каротиноїдні вуглеводні (α -, β -, γ -каротини, торулін, торулародин, лікопін);
- ксантофіли (астаксантин, зеаксантин, віолаксантин);
- каротиноїдні кислоти [16].

Каротини – хімічні сполуки, що складаються з короткого вуглеводневого ланцюга, який не містить кисню в кінцевих кільцях молекули та надають організмам червоного або помаранчевого забарвлення [6]. Серед найбільш відомих каротинів можна виділити:

α -каротин – природній жиророзчинний пігмент помаранчевого кольору, який містить в будові одне альфа-іонне і одне бета-іонне кільця та наявний подвійний зв'язок. До промислових продуцентів, які продукують α -каротин

належать *Dunaliella salina* та *Blakeslea trispora*. α -каротин подібно до β -каротину, є провітаміном А, але має меншу провітамінну активність, ніж останній. Також діє як антиоксидант, нейтралізуючи вільні радикали і зменшуючи окислювальний стрес в організмі. Даний каротин можуть використовувати в різних галузях, зокрема, в харчовій промисловості як харчова добавка для підвищення вмісту вітаміну А в продуктах харчування та як натуральний барвник. У фармацевтичній та косметологічній промисловостях використовується як антиоксидантний препарат [12,20].

β -каротин – найпоширеніший пігмент червоного або помаранчевого забарвлення, в якого на обох кінцях молекули знаходяться бета-іонні циклічні структури та містить 11 кон'югованих подвійних зв'язків, які чергуються вздовж вуглецевого ланцюга [1]. Є чутливим до окислення та розкладається під впливом світла, тепла та кисню. β -каротин є провітаміном А та ефективніший в перетворенні на ретинол, ніж інші каротиноїди, а також як і α -каротин є потужним антиоксидантом. У промислових виробництвах використовують декілька продуцентів, які продукують β -каротин, а саме *Dunaliella salina*, *Blakeslea trispora*, *Rhodotorula sp.*, *Sphingomonas sp.* та *Phycomyces blakesleeanus*. β -каротин застосовується як харчова добавка та натуральний барвник у харчовій галузі, також в фармації та косметології як засіб для підвищення імунітету та входить до складу захисних кремів для шкіри [16,23,33].

γ -каротин – сполука червоного або помаранчевого кольору, структура якої має подібність до інших каротиноїдів, але різниться конфігурація подвійних зв'язків. Як і інші каротиноїди виконує антиоксидантну функцію. Серед промислових продуцентів γ -каротину можна виділити *Xanthophyllomyces*, *Rhodospiridium*, та *Blakeslea trispora*. γ -каротин за рахунок насиченого кольору входить в склад косметологічних продуктів, також може використовуватися як натуральний барвник у харчовій промисловості та як дієтична добавка [20,23].

Торулін – каротиноїд червоного або рожевого кольору, молекулярна структура якого є полієновою з поліцикловим кільцем. У ньому присутні множинні зв'язки, що роблять його ароматичним каротиноїдом. До продуцентів,

які синтезують торулін належать *Rhodotorula glutinis* і *Sporobolomyces ruberrimus*. Щодо використання, то на даний момент про це мало відомо, але є дані, що торулін можна застосовувати в косметології, а також як харчову добавку [7,22,23].

Лікопін – сполука червоно-помаранчевого кольору, яка має різні структурні ізомери, що відрізняються в розташуванні подвійних зв'язків у молекулі. Серед промислових продуцентів, які синтезують лікопін, виділяють *Blakeslea trispora*, у якого вміст даного каротину складає приблизно 10%. Лікопін застосовують як добавку до кормів у тваринництві, входить до складу масок для волосся в косметології [23,27].

Ксантофіли – це сполуки, що складається з вуглеводневого ланцюга, що містить в своєму складі кисень та мають жовтий колір (рис. 1.2). Вони можуть міститися не тільки в рослинах, бактеріях та водоростях, а й накопичуватися в тваринних структурах, наприклад у жовтку яєць або екзоскелеті деяких членистоногих [6]. До найвідоміших ксантофілів належать:

Торулародин – пігмент, який має помаранчеве забарвлення. Він володіє високим антиоксидантним потенціалом, виступає потужним поглиначем синглетного кисню та пероксидних радикалів та синтезується із торуліну. До промислових продуцентів торулародину відносять *Rhodotorula sp.*, *Xanthophyllomyces*. Торулародин застосовується в косметології, у фармакології входить до складу ліків проти пухлинних захворювань, а також як дієтична добавка. Також може використовуватися як біомаркер в наукових дослідженнях [22,23,34].

Астаксантин – складається з довгого ланцюга подвійних зв'язків з двома кінцевими кільцями, кожне з яких містить оксогрупу та гідроксильну групу. Ці функціональні групи надають астаксантину його антиоксидантні властивості. До продуцентів, які синтезують астаксантин належать *Haematococcus pluvialis* та *Phaffia rhodozyma*. У фармацевтичній галузі астаксантин входить до складу лікарських препаратів, які зокрема застосовуються при лікуванні запальних

захворювань, серцево-судинних хвороб та проблем з зором. Також входить до складу кормів і надає насиченого забарвлення м'ясу риби та креветкам [18,23,32].

Зеаксантин – це сполука, яка містить довгий ланцюг кон'югованих подвійних зв'язків і має дві оксогрупи (гідроксильні групи) на кінцях молекули. Найвідомішими промисловими продуцентами зеаксантину є *Chlorella zofingiensis*, *Dunaliella salina* та *Phaffia rhodozyma*. Зеаксантин досить часто входить в склад лікарських засобів для лікування і профілактики захворювань очей, а також використовується як харчова добавка до напоїв та кондитерських виробів у харчовій галузі [13,23,24].

Віолаксантин – це природній пігмент, який синтезується із зеаксантину шляхом епоксидування. До промислових продуцентів, які синтезують даний ксантофіл, слід віднести *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*. Щодо використання віолаксантину, то він є барвником для харчових продуктів, а також входить в склад дієтичних добавок [13,23,24].

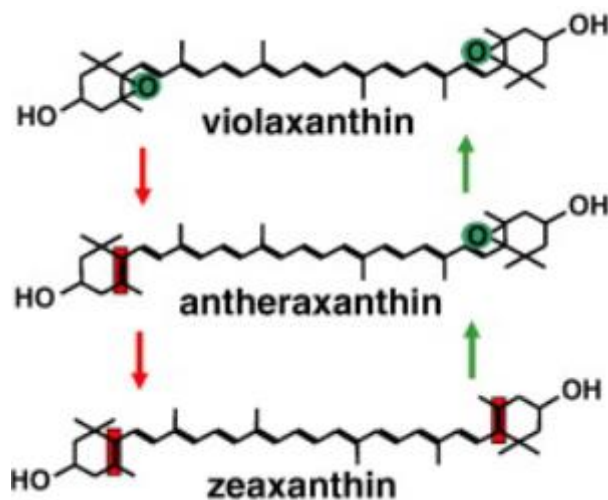


Рис. 1.2. Структурна будова ксантофілів [13]

Каротиноїди виконують ряд надважливих біологічних функцій в організмах тварин та людини. Зокрема, вітамінна активність, адже β -каротин є попередником вітаміну А, який в свою чергу необхідний для процесу фоторепарації, підтримки імунної системи, функціонування репродуктивної системи і росту та розвитку самого організму. Також варто зазначити, що каротиноїди виконують антиоксидантну функцію, тобто захищають клітини

організму від пошкоджень, викликаних вільними радикалами. Ця захисна дія може зменшити ризик розвитку хронічних захворювань, таких як рак, серцево-судинні захворювання, вікова дегенерація жовтої плями. Щодо тварин, то вони також надають м'ясу птиці та риб відповідного насиченого кольору, підвищують якість продуктів тваринного походження [1,4].

Слід зазначити, що каротиноїди не можуть синтезуватися в організмі тварин та людини. Тому зважаючи на це, при вигодовуванні тварин слід використовувати збалансовані корма та премікси для того, щоб забезпечити організм каротиноїдами, а людям слід споживати відповідну харчову продукцію продукції [6].

1.2. Дріжджі – продуценти каротиноїдів

Представники роду *Rhodotorula*, які відомі через свій зовнішній вигляд під назвою “червоні дріжджі”, належать до великого класу неспорогенних пігментованих дріжджів *Basidiomycetes* [2,8]. Використання цих дріжджів як продуцентів каротиноїдів має ряд переваг над іншими мікроорганізмами, наприклад, водоростями та деякими грибами. До таких переваг належать:

- висока швидкість росту;
- велика кількість накопичувальної біомаси, яку можна легко отримати в лабораторних умовах;
- невибагливість до компонентного складу поживного середовища;
- відносно легка адаптація до різних умов навколишнього середовища;
- економічна вигідність;
- здатність утворювати біологічно активні речовини;
- синтез не лише каротиноїдів, а також білків, ліпідів, вуглеводів;

Родина *Rhodotorula* налічує близько 40 видів дріжджів. Найвідомішими серед каротинсинтезуючих видів є *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra*. Всі дані види відрізняються зовнішньою

морфологією, властивостями культивування та здатністю накопичувати біологічно активні речовини, зокрема каротиноїди [2].

Rhodotorula mucilaginosa – це гетеротрофний та аеробний вид каротинсинтезуючих дріжджів, колонії, яких мають рожевий або червоний колір. Клітини округлої форми та можуть бути одиночними чи утворювати певні ланцюги із клітин. *R. mucilaginosa* поширені в різних природних середовищах та можуть зустрічатися у воді, ґрунті та в рослинних матеріалах. Цей вид дріжджів може бути симбіонтами із іншими мікроорганізмами, тобто з деякими бактеріями, грибами і іншими дріжджами.

Як вже сказано вище, *R. mucilaginosa* є гетеротрофними мікроорганізмами, а отже, їм потрібні середовища, в яких є високий вміст карбону, що можна отримати із вуглеводів, наприклад, глюкози, сахарози та ін. Також для правильного функціонування необхідні джерела нітрогену, вітаміни та мінеральні солі. Найчастіше для вирощування цих культур використовують середовище Сабуро, яке містить глюкозу. Оптимальна температура, при якій *Rhodotorula mucilaginosa* добре росте та розмножується, лежить в проміжку близько 25-30 °С. *R. mucilaginosa* є фотосинтезуючими організмами, тому їм необхідне певне освітлення. Оптимальне рН для культивування цих дріжджів коливається в межах від 4,5 до 6,5. Також дані мікроорганізми можуть досить добре синтезувати каротиноїди при вирощуванні їх за несприятливих умов, тобто при окисному, осмотичному та сольовому стресі (рис. 1.3.) [2].

Rhodotorula glutinis – це аеробний вид каротинсинтезуючих дріжджів рожевого чи червоного відтінку і колір їм надає великий вміст родотоксину, торулародину та β-каротину. Клітини овальної форми, що можуть бути одиночними або створювати колонії (рис. 1.4.). *R. glutinis* культивуються на різних середовищах, включаючи рідкі та тверді. В культуральних середовищах має бути високий вміст карбону, тому в їхній склад входять глюкоза, сахароза, мальтоза чи лактоза молочної сироватки [9].



Рис. 1.3. *Rhodotorula mucilaginosa* на твердому поживному середовищі [2]

Також необхідні амінокислоти, вітаміни та мінеральні солі, і можливе внесення в середовище гліцеролу. Найчастіше використовують середовища, такі як ЕМС або Сабуро. Температура для культивування даних дріжджів для нормального розвитку та розмноження коливається в межах від 26°C до 30°C. *R. glutinis* є аеробними продуцентами, тому їм необхідна певна аерація. Оптимальне рН для цих каротинсинтезуючих дріжджів коливається в межах від 4 до 7 [9,10].



Рис. 1.4. *Rhodotorula glutinis* на твердому поживному середовищі [10].

Rhodotorula minuta – це аеробний вид дріжджів роду *Rhodotorula*, рожевого чи оранжевого кольору, які мають клітини округлої форми (рис. 1.5.). Їхній колір зумовлений наявністю великої кількості β -каротину.

Щодо культивування то ці дріжджі, як і *Rhodotorula glutinis*, можуть вирощуватися на рідких та твердих середовищах. Середовище має містити велику кількість карбону, нітрогену, вуглеводів і мінеральних речовин. Найчастіше використовують таке поживне середовище як Сабуро. Температура, при якій дані дріжджі будуть розвиватися, розташована в межах 20-30 °С. Оптимальне рН зазвичай коливається від 3 до 7 [29].



Рис. 1.5. *Rhodotorula minuta* на твердому поживному середовищі [29]

Rhodotorula rubra – каротинсинтезуючі дріжджі, клітини яких мають червоне чи помаранчеве забарвлення та овальну форму. Їхній колір пов'язаний із великим вмістом астаксантину та β -каротину.

Культивуватися дані дріжджі можуть глибинним способом у м'ясо-пептонному бульйоні, а також можуть використовуватися середовища ЕМС та Сабуро. Також для продуктивного культивування використовуються глюкоза або лактоза як джерело карбону, вітаміни та амінокислоти як джерело нітрогену. Оптимальна температура культивування для нормального росту та розмноження в межах від 22 до 30°C. Для даних каротинсинтезуючих мікроорганізмів оптимальне рН коливається від 3 до 8 [34].



Рис. 1.6. *Rhodotorula rubra* на твердому поживному середовищі [34]

У промислових масштабах “Червоні дріжджі” роду *Rhodotorula* досить доцільно та вигідно використовувати. Як вже було сказано вище, дані мікроорганізми повністю підходять для відносно легкого культивування в лабораторних умовах і завдяки цьому накопичують досить багато різних видів каротиноїдних пігментів, яких використовують в сільському господарстві та аквакультурі для виготовлення кормів [11].

Застосування даних продуцентів для промислової біотехнології є доцільним з огляду на зменшення затрат на виробництво продукції. Дріжджі роду *Rhodotorula* можуть культивуватися на різних відходах сільськогосподарської діяльності, що знову ж таки є економічно доцільним для виробництва [9,30].

Також дані мікроорганізми демонструють відносно швидкий ріст та відповідно швидке накопичення біомаси, що дає змогу скоротити час виробничого циклу, що є не менш важливим для підприємств [9].

1.3. Шляхи біосинтезу каротиноїдів у *Rhodotorula*

Види *Rhodotorula* є сапрофітними дріжджами, які можуть бути присутніми в місцях існування з широким географічним розташуванням різновидів. Штами

Rhodotorula здатні рости на різних субстратах в різноманітних екологічних умовах, таких як вода, повітря, ґрунт і гній, а також в тілах тварин, рослин і деяких нижчих організмів [21]. Однією з найбільш помітних характеристик *Rhodotorula* є біосинтез каротиноїдів. Дріжджі *Rhodotorula* є продуцентами основних каротиноїдних пігментів, зокрема атаксантину, β-, γ-каротинів, торуліну, торулародину (рис. 1.7.) [7,22].

Шлях біосинтезу каротиноїдів у "червоних дріжджах" *Rhodotorula* починається із мевалонатного шляху, де конденсується ацетил-СоА рядом реакцій в мевалонатну кислоту, яка, в свою чергу, перетворюється на ізопентенілпірофосфат.

У ізопреновому біосинтезі у ряді конденсацій ізопреноїдних ланок утворюється сполука фітоен - основа з 40 атомів карбону. Потім ця сполука перетворюється в інші ациклічні каротиноїди, такі як лікопін, а останній в свою чергу перетворюється на γ-каротин шляхом циклізації через ферментативну реакцію, яку каталізує лікопін ε-циклаза (рис. 1.8.).

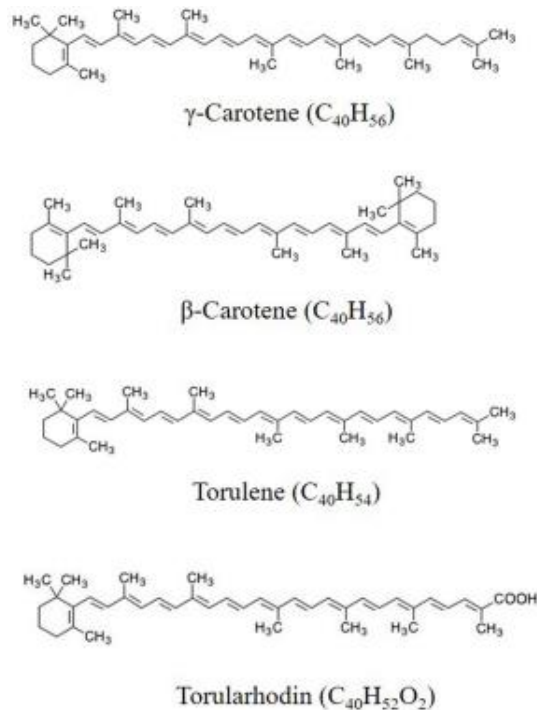


Рис. 1.7. Структурна будова каротиноїдів *Rhodotorula* [22]

КЄ два незалежних шляхи біосинтезу каротиноїдів із γ -каротину, даючи в якості кінцевих продуктів або торулін, або β -каротин.

У свою чергу β -каротин може перетворюватися на астаксантин, досить затребуваний каротиноїд у промислових масштабах. Специфічний каротиноїд торулародин утворюється з торулїну шляхом заміщення однієї метильної групи на одну карбоксильну групу (тобто 14 подвійних зв'язків) внаслідок реакцій гідроксилювання та оксигенації. Торулародин – це пігмент із високим антиоксидантним потенціалом, потужний поглинач синглетного кисню та пероксидних радикалів [21, 22].

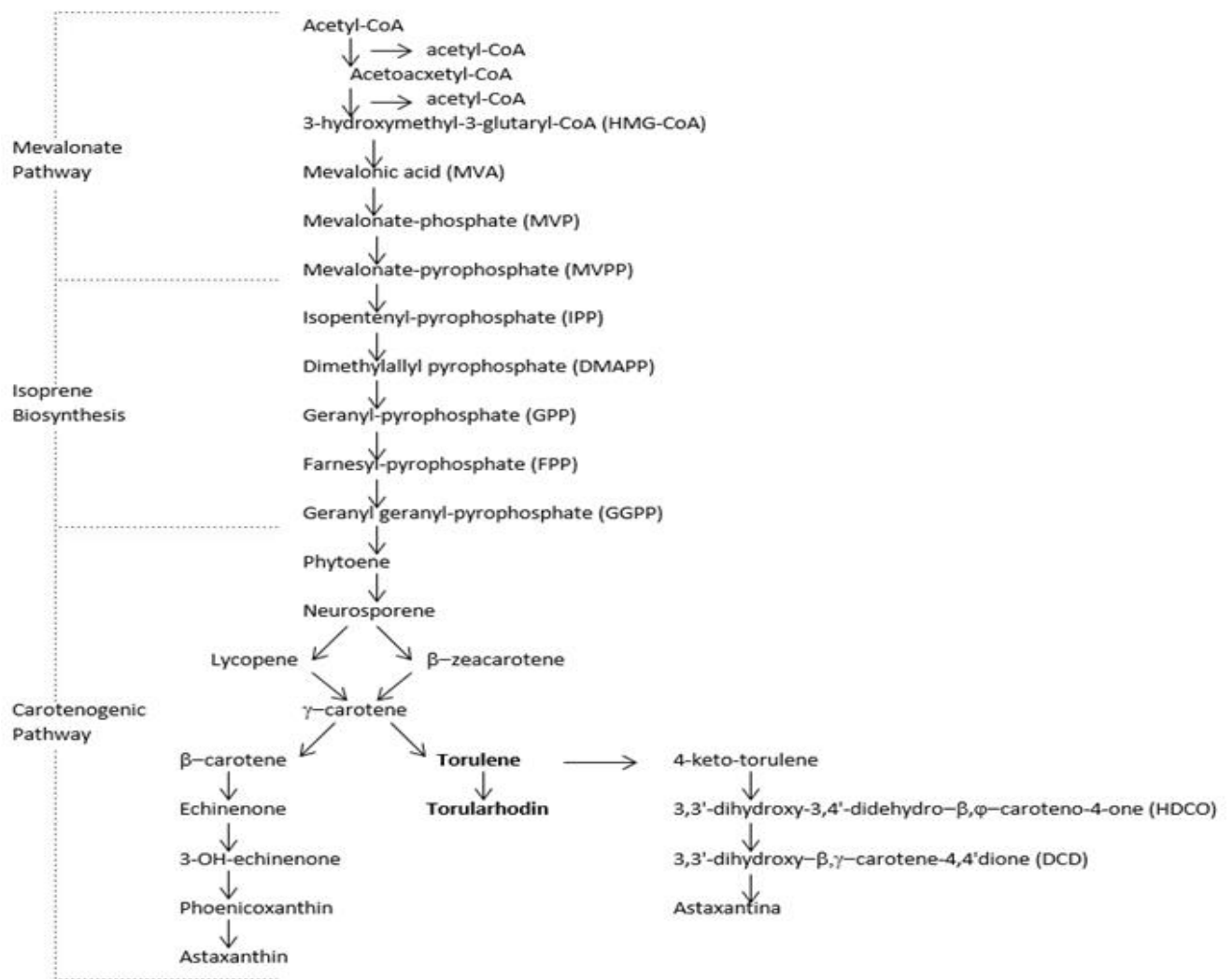


Рис. 1.8. Шлях біосинтезу каротиноїдів у дріжджах *Rhodotorula* [22]

Дріжджі роду *Rhodotorula* здатні синтезувати досить велику кількість різних біологічно активних сполук, зокрема, каротиноїди, які є важливими у промисловому використанні. На синтез та накопичення великої кількості біомаси впливають ряд чинників, а саме біологічні, хімічні та фізичні. До індукторів синтезу необхідних метаболітів належать попередники самих сполук, речовини, які входять до складу поживних речовин, мутагени. Одним із таких факторів виступає ультрафіолетове випромінювання [25].

Ультрафіолетове випромінювання – це частина електромагнітного спектру, яка має довжину хвилі від 10 до 400 нанометрів, що розташована між видимим світлом і рентгенівськими променями.

УФ може впливати на різні біологічні процеси в живих організмах, так як є фізичним мутагеном. До таких процесів належать зміни в молекулі ДНК, стимулювання біологічно активних речовин та виникнення фотохімічних реакцій. Внаслідок цього живі організми у процесі еволюції розробили власні методи боротьби із мутагеном. Зокрема, дріжджі роду *Rhodotorula* мають наявні сполуки, які беруть участь у фотопротекції, а саме каротиноїди, мікоспорини та ергостерол [25].

У дріжджах *Rhodotorula sp.* серед каротиноїдів роль фотопротекторів виконують β -каротин, торулін та торулародин, тому при використанні ультрафіолетового випромінювання їхня кількість в біомасі збільшується. Таким чином, для збільшення синтезу каротиноїдів слід застосовувати певні дози УФ.

Для отримання мутантних штамів використовують різні типи ультрафіолетового випромінювання, які відрізняються довжиною хвиль. До них відносять УФ-А з діапазоном хвиль від 400-315 нм, УФ-В діапазон хвиль якого складає 315-280 нм та УФ-С від 280 до 100 нм [7,25].

1.4. Методи екстракції каротиноїдів

Для отримання каротиноїдів необхідно спочатку наростити біомасу продуцентів, надалі її відділити (центрифугування, сепарування, фільтрування), наступним та надважливим етапом йде екстрагування каротиноїдів. Дані сполуки є ліпофільними, тому їх екстракцію проводять за допомогою різних хімічних речовин, які зможуть розчинити дані сполуки. До таких екстрагентів можна віднести метанол, етанол, ацетон, хлороформ, гексан, петролейний ефір та різні суміші цих хімічних речовин [4]. Цей етап необхідний для того, щоб вилучити природні пігменти із рослин, водоростей, бактерій та деяких грибів без лишніх забруднень та компонентів самих клітин.

Найчастіше для екстрагування використовують такі екстрагенти як ацетон, етанол, етилацетат, хлороформ та їх суміші.

- Ацетон – це розчинник, який має низьку полярність, в'язкість та високу рухливість і за рахунок цього він добре розчиняє деякі каротиноїди, зокрема α - та β -каротини, лікопін, турулін, турулародин та астаксантин. Також ацетон є досить доступним та недорогим екстрагентом і саме тому його вигідно обирати для екстракції.

- Етанол – це розчинник, який досить ефективно очищає екстракт від забруднень та відповідно виділяє більшу концентровану суміш каротиноїдів. Етанол, як і ацетон, є легкодоступним та недорогим розчинником. Також він має низьку токсичність і є менш шкідливим для людей і навколишнього середовища, тому його можна сміло використовувати для екстракції.

- Етилацетат – це суміш етанолу та ацетату, яка дозволяє швидко та якісно виділити каротиноїди, такі як α - та β -каротини, турулародин, турулін та інші. Також він володіє високою розчинністю у воді та органічних розчинниках, але має низьку здатність розчинятися у жирних розчинниках. Завдяки цьому вилучення каротиноїдів буде проходити якісніше, оскільки деякі жирні компоненти будуть відокремлені від екстракту. Етилацетат, як і етанол, має низьку токсичність, але має характерний фруктовий запах.

- Хлороформ – це ліпофільний розчинник, який має хорошу розмежовувальну здатність і це дозволяє краще відокремити каротиноїди від інших компонентів. Тобто, за рахунок цього можна отримати чисту суміш каротиноїдів без лишніх забруднень. Але хлороформ є досить легкою та небезпечною для здоров'я сполукою, тому під час його використання потрібно дотримуватися всіх належних заходів безпеки. [4,5,15].

Однак, варто зазначити, що під час екстракції з каротиноїдами в екстракт можуть потрапити і інші компоненти, наприклад, ліпіди та хлорофіли, які будуть заважати при визначенні каротиноїдів. Для усунення такої проблеми необхідно проводити омилення хлорофілів і ліпідів з додаванням в етанольний екстракт спиртовий розчин КОН. Омилення здійснюється шляхом нагрівання на водяній бані. Оскільки за таких умов омилення може відбуватися часткове окислення каротиноїдів, реакцію проводять в атмосфері азоту і додають аскорбінову кислоту, щоб запобігти їхньому окисленню [17].

Після проведення екстракції визначають сумарний вміст каротиноїдів за допомогою спектрофотометричного методу за поглинанням в синій області спектра в самому екстракті. Даний метод базується на тому, що спектр поглинання каротиноїдів сягає проміжку 400-500 нм. Спектрофотометрія є досить легкою та швидкою у використанні, а також серед переваг є те, що при потраплянні в екстракт хлорофілів цей метод може все рівно дати чітку оцінку, щодо визначення кількості каротиноїдів. Але варто зауважити, що при використанні цього методу неможливо визначити якісний склад каротиноїдів [3].

Щодо якісного складу каротиноїдів, то їх визначають за допомогою тонкошарової хроматографії. Тонкошарова хроматографія (ТШХ) – це планарний варіант рідинної хроматографії, метод розділення, у якому використовується нерухома фаза, що складається з відповідного матеріалу, нанесеного у вигляді стандартизованого тонкого шару і зафіксованого на основі (пластинці) зі скла, металу або пластмаси. Перед хроматографуванням розчини речовин, що аналізують, наносять на пластинку. Розділення засновано на процесах адсорбції, розподілу, іонного обміну та їх комбінації й здійснюється за

допомогою переміщення в тонкому шарі (нерухомій фазі) досліджуваних речовин, розчинених у розчиннику або у відповідній суміші розчинників (рухомій фазі). Як сорбенти можуть використовуватися оксид алюмінію, целюлоза, бензол, петролейний ефір, гексан, ацетон, бензин та діетиловий ефір, але у фармацевтичному аналізі найчастіше використовують стандартизований подрібнений силікагель. Варто зазначити, що на хроматографічний аналіз впливає багато факторів, які можуть спричинити не відтворюваність результатів аналізу. Одним з найважливіших чинників є активність сорбенту та ТШХ-пластинки, які використовуються для аналізу [35].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

Матеріалами для дослідження слугували культури каротинсинтезуючих дріжджів родини *Rhodotorula spp.*, а саме *Rhodotorula glutinis* УКМ Y-1295, *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349, *Rhodotorula rubra*, які були взяті із колекції кафедри біохімії та біотехнологій ННІБХБ.

Культивування дріжджів проводили у поживному середовищі Сабуро, для приготування якого відважували по 10 г глюкози та 2,5 г пептону і поміщали в конічні скляні колби. Суміш доводили дистильованою водою до 250 мл. Готове середовище стерилізували протягом 30 хвилин.

Під потоком стерильного повітря в умовах ламінарного боксу в пробірки вносили 5 мл середовища Сабуро та петлю штамів-продуцентів *Rhodotorula*. Вирощування посівного матеріалу культур відбувалося протягом 48 годин у термостаті при температурі 28°C.

Основна ферментація проводилася в колбах середовищем Сабуро на 250 мл, в які вносили по 5 мл інокуляту. Вирощування культур відбувалося протягом трьох діб за температури 28°C.

Надалі здійснювали відділення культуральної рідини від біомаси дріжджів центрифугуванням протягом 15 хвилин при 3000 обертів/хвилину (ОПН-8). Отриманий осад відбирали та здійснювали лізис клітин за допомогою ультразвуку протягом 7 хв [25].

Подрібнену біомасу в кількості 520 мг заливали 2 мл відповідного органічного розчинника. Використовували 6 типів екстрагентів, а саме:

- ацетон,
- етанол (96%),
- хлороформ,
- суміш ацетон-етанол (3:1 за об'ємом)
- суміш хлороформ-етанолом (3:1)
- суміш хлороформ-ацетоном (3:1)

Екстрагування проводили протягом трьох діб у темному місці [26].

В отриманих екстрактах спектрофотометричним методом кількісно визначали вміст загальних каротиноїдів та їх фракцій (β -каротину, торуліну, торулародину).

На наступному етапі досліджень для інтенсифікації синтезу каротиноїдів культуру *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349 опромінювали УФ-променями.

Для цього початково здійснювали висів культури на тверде поживне середовище. Для приготування твердого середовища Сабуро відважували 15,5 г сухого агару Сабуро і поміщали в скляні конічні колби. Суміш доводили до 250 мл дистилатом. Готове середовище стерилізували протягом 60 хв. Під потоком стерильного повітря в умовах ламінарного боксу за допомогою шпателя Дригальського висівали по всій поверхні твердого середовища в чашки Петрі посівний матеріал. Культивування проводили протягом 48 годин при температурі 28°C.

Після 48 годинного культивування проводили опромінення бактерицидними лампами ДБ-60 з довжиною хвилі 254 нм у стерильних умовах протягом 120 хв на відстані 40 см від поверхні культури. Опромінений матеріал культивували протягом 48 год при температурі 28°C, щоб уникнути репарації генетичного матеріалу. Селекцію колоній здійснювали після культивування за ступенем інтенсивності їх забарвлення [25].

Надалі петлю опромінених та контрольних штамів-продуцентів *Rhodotorula minuta* пересаджували у рідке середовище Сабуро та всі подальші маніпуляції здійснювали як описано вище.

Екстракцію пігментів здійснювали 96% етанолом протягом трьох діб у темному місці. Визначали вміст загальних каротиноїдів та окремих фракцій спектрофотометричним методом [25,26].

Статистичну обробку проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Усі дослідження проводили в 3-х кратній повторюваності. Відмінності отриманих результатів розраховувалися за t-критерієм Ст'юдента.

2.2. Методи дослідження

Метод визначення загальної кількості каротиноїдів.

Кількісне визначення загальних каротиноїдів в екстрактах здійснювали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Agilent Cary 60. Вимірювання проводили в 1-см кюветі при довжині хвилі 450 нм проти відповідного розчинника.

«Розрахунок вмісту загальних каротиноїдів (мг/г) проводили за формулою:

$$x = D \cdot V \cdot 100 / 260 \cdot m, \text{ де}$$

D – оптична густина при $\lambda = 450$ нм;

V – об'єм екстракту, мл;

260 – питомий показник поглинання 1% β -каротину;

m – наважка сухої біомаси, взятої на екстракцію, г» [26].

Метод кількісного визначення окремих фракцій каротиноїдів.

Кількісне визначення окремих фракцій каротиноїдів проводили спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Agilent Cary 60. Вимірювання проводили в 1-см кюветі при трьох довжинах хвиль: 450 нм (β -каротин); 509 нм (торулін); 537 нм (торулародину)

Розрахунки концентрації каротиноїдів проводилися за такими формулами:

«Вміст β -каротину, C_1 мкг/мл:

$$C_1 = 3,9 \cdot D_{450} + 1,8 \cdot D_{537} - 3,6 \cdot D_{509}$$

Вміст торуліну, мкг/мл (C_2):

$$C_2 = 5,3 \cdot D_{509} - 6,7 \cdot D_{537}$$

Вміст торулародину, мкг/мл (C_3):

$$C_3 = 6,7 D_{537} - 1,1 \cdot D_{509}$$

Перерахунок кількості каротиноїдів на мкг/г проводили за формулою:

$$A = C \cdot V / m, \text{ де}$$

A – вміст каротиноїдів на грам біомаси дріжджів, мкг/г;

C – концентрація каротиноїдів, мкг/мл;

V – об'єм екстракту, мл;

m – наважка сухої біомаси взятої на екстракцію, г »[26].

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка вмісту загальних каротиноїдів та їх фракцій в біомасі дріжджів *Rhodotorula* sp. за умов екстракції різними органічними розчинниками та їх сумішами

Каротиноїди успішно використовуються в харчовій, кормовій, медичній та косметичній галузях, і в 2022 році обсяг їхнього ринку сягнув понад 2 мільярди доларів США. Зростаюче занепокоєння щодо безпеки харчових продуктів призвело до збільшення попиту на натуральні каротиноїди, і ця тенденція значною мірою сприяла використанню мікробної ферментації для природного виробництва каротиноїдів [2].

На даний час багато галузей виробництв широко використовують мікробні продуценти як джерело каротиноїдів для розробки кормів. Такими продуцентами можуть бути водорості, деякі гриби та дріжджі і різноманітні бактерії. Перспективним є отримання каротиноїдів із таких продуцентів, які відрізняються інтенсивним ростом та відповідно володіють високою здатністю до накопичення біомаси. Також важливо, щоб культивування продуцентів було економічно вигідним. Серед мікроорганізмів, які б могли відповідати таким вимогам промисловості, слід відмітити каротинсинтезуючі дріжджі роду *Rhodotorula* [4]. Вони можуть рости на синтетичних середовищах, в склад, яких можуть входити побічні продукти агропромислового походження, що є альтернативою до вирішення економічних, екологічних та енергетичних проблем з утилізацією відходів від виробництв [9,30].

Для проведення дослідження було обрано три штами дріжджів роду *Rhodotorula*: *Rhodotorula glutinis* УКМ Y-1295, *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349 та *Rhodotorula rubra* та шість типів екстрагентів: 96% етанолом, 100% ацетоном та їх сумішю, хлороформом, хлороформом з етанолом (1:3) та хлороформом з ацетоном (1:3).

Після проведення екстракції здійснювали кількісне визначення вмісту загальних каротиноїдів та їх фракцій. Результати проведених досліджень представлені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

**Вміст загальних каротиноїдів, екстрагованих з біомаси дріжджів
роду *Rhodotorula***

Екстрагент	Вміст загальних каротиноїдів, мг/г		
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
Ацетон	6,1±0,52	5,5±0,62	5,69±0,71
Етанол	5,19±0,47	9,8±0,79*	7,57±0,69*
Ацетон+етанол	4,89±0,52	5,2±0,33	4,82±0,43
Хлороформ	3,9±0,46*	3,1±0,41*	3,67±0,49*
Хлороформ+етанол	5,7±0,62	7,6±0,91*	5,6±0,77
Хлороформ+ацетон	5,9±0,60	6,3±0,81	4,8±0,53

Примітка (тут і надалі): * - достовірна різниця відносно значень, отриманих при використанні ацетону ($p \leq 0,05$)

Традиційно в якості екстрагенту при виділенні каротиноїдів використовують ацетон [17]. Відповідно, порівняння отриманих величин кількості каротиноїдів при застосуванні інших органічних розчинників та їх сумішей ми проводили зі значеннями, отриманими при проведенні екстракції ацетоном.

Як видно з таблиці 3.1. , максимальний вміст загальних каротиноїдів, які були екстраговані з біомаси родоторул, отриманий при використанні етанолу та суміші хлороформу з етанолом (1:3). Так, найбільша кількість загальних каротиноїдів екстрагувалась етанолом з біомаси *Rhodotorula minuta* - 9,8±0,79 мг/г. Цим же ж розчинником екстрагована й найбільша кількість каротиноїдів у *Rhodotorula rubra*. Досить високі показники загальних каротиноїдів відмічено також при застосуванні суміші хлороформу з етанолом. Проте сам хлороформ

екстрагував найменшу кількість каротиноїдів з біомаси усіх трьох досліджуваних культур.

Як відомо, дріжджі *Rhodotorula* є продуцентами різних каротиноїдних пігментів, зокрема астаксантину, β -, γ -каротинів, торуліну, торулародину. Нами було проаналізовано, як саме використання різних екстрагентів впливає на вихід окремих фракцій каротиноїдів.

На рисунку 3.1. наведено результати екстракції β -каротину різними екстрагентами в трьох штаммах дріжджів *Rhodotorula*.

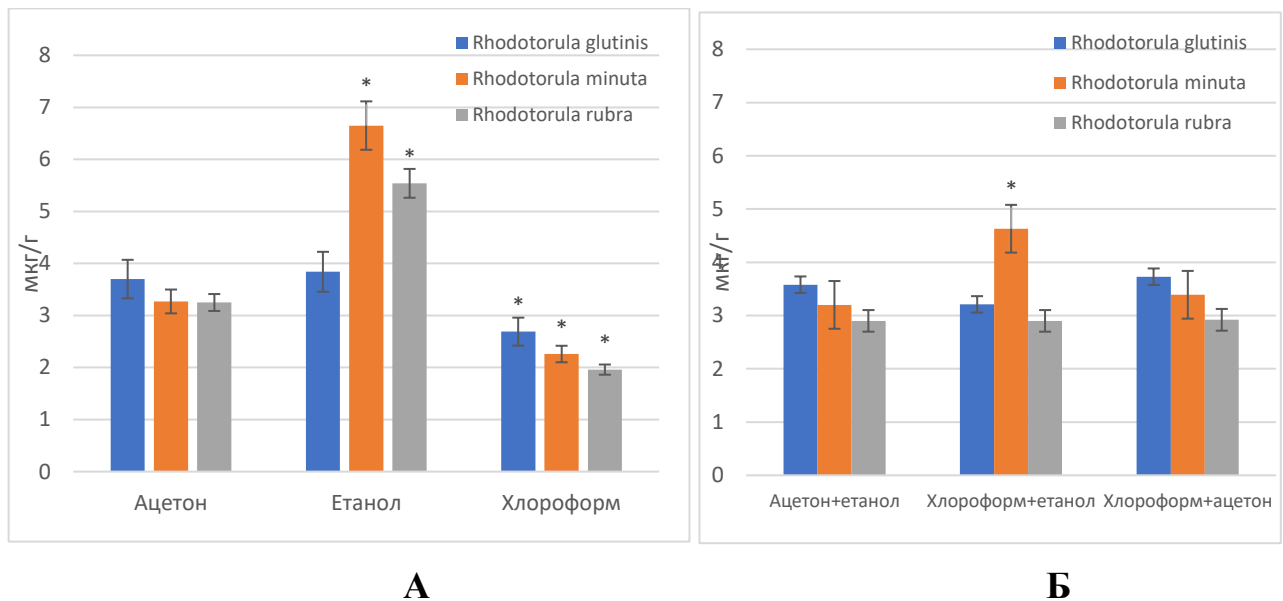


Рис. 3.1. Вміст β -каротину, екстрагованого різними типами органічних розчинників (А) та їх сумішей (Б) з біомаси культур *Rhodotorula*

Примітка (тут і надалі): * - достовірна різниця відносно значень, отриманих при використанні ацетону ($p \leq 0,05$)

Результати показали відмінний вихід β -каротину в різних видів родоторул, що узгоджується з результатами інших авторів [31]. Привертає увагу, що найбільший вихід даної сполуки отриманий з біомаси *Rhodotorula minuta*. Кількість β -каротину, отриманого за умов екстракції етанолом (6,65 мкг/г) та сумішшю хлороформ-етанол (4,63 мкг/г) достовірно відрізняється від усіх інших варіантів дослідю.

Проаналізувавши дані можна сказати, що вихід β -каротину з біомаси дріжджів за допомогою екстракції 100% ацетоном складає в середньому в 1,5 разів менше, ніж екстракцією 96% етанолом та в 1,4 рази більше за екстракцію каротину хлороформом. Це свідчить про те, що ацетон як розчинник непогано проявив свої властивості і його також можна застосовувати як екстрагент. Проте, ацетон є більш токсичним, а також швидко окислюється, що є не вигідним порівняно з іншими екстрагентами, наприклад, етанолом [14,17].

Метод екстракції β -каротину 96% етанолом за даними результатами показав себе найефективніше. Отриманий вихід β -каротину в середньому є більшим у 1,5 разів, ніж за екстракції ацетоном та 2,3 рази більшим за екстракції хлороформом. Етанол є найменш токсичним серед досліджуваних розчинників і не так швидко окислюється у порівнянні з іншими екстрагентами [17].

Варто зазначити, що рядом авторів використовується великий спектр поєднання екстрагентів між собою, що допомагає збільшити ймовірність отримання більшої кількості бажаних каротиноїдів [15,17]. Проте, нашими дослідженнями не встановлена статистично достовірна перевага застосування сумішей органічних розчинників при екстракції β -каротину.

Вихід специфічного каротиноїду родоторул – торулародину визначається метаболічним шляхом його синтезу у дріжджів. Адже торулародин синтезується із торуліну, тому їх кількості в клітинах взаємозалежні [22].

За деякими дослідженнями торулародин інтенсивно синтезується біомасою виду *Rhodotorula rubra* [34]. Згідно наших результатів, які наведені на рисунку 3.2., показники виходу торулародину в біомасі *Rhodotorula rubra* та *Rhodotorula minuta* є близькими за значеннями.

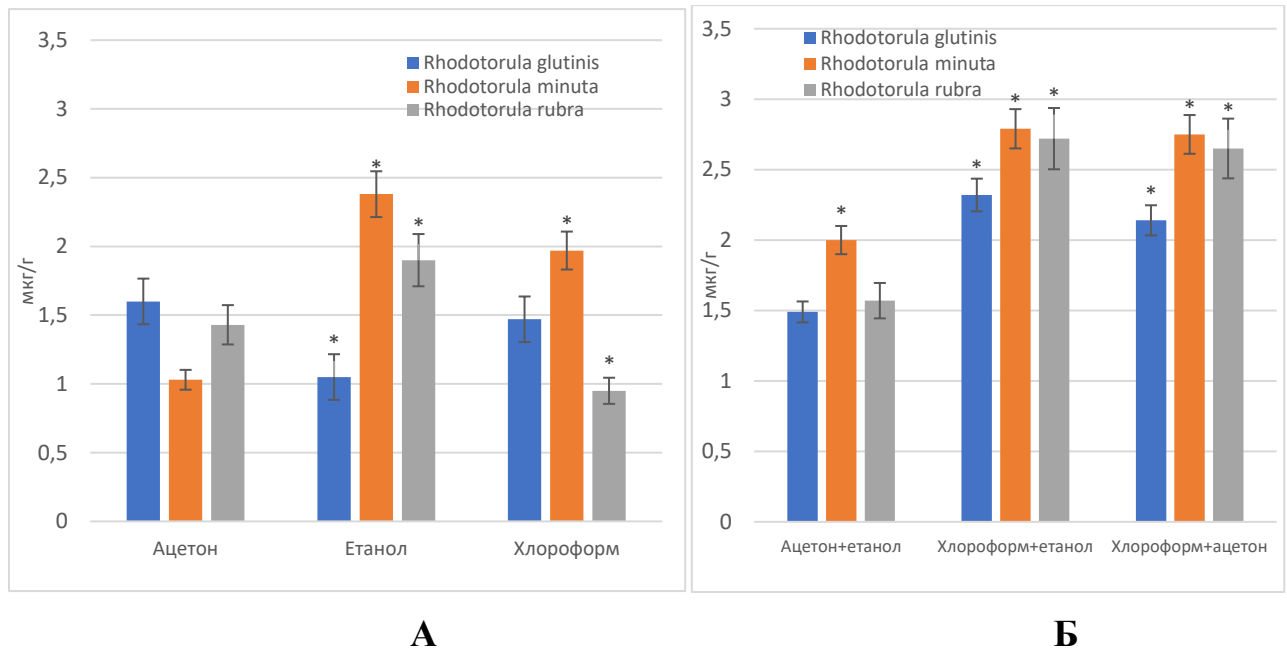


Рис. 3.2. Вміст торулародину, екстрагованого різними типами органічних розчинників (А) та їх сумішей (Б) з біомаси культур *Rhodotorula*

Також варто зазначити, що для отримання високого вмісту в дріжджах *Rhodotorula sp.* даного ксантофілу слід застосовувати суміші досліджуваних екстрагентів. Так, нами встановлено, що максимальний вихід торулародину, причому для всіх досліджуваних видів родоторул, зареєстровано при використанні хлороформ-вмісних сумішей - хлороформ-етанол та хлороформ-ацетон. Причому, застосування лише хлороформу призвело до виходу торулародину майже удвічі меншого, ніж при екстракції вказаними сумішами.

Отже, використання суміші екстрагентів мають ряд переваг. По-перше, суміш хлороформ-етанол забезпечує середню полярність, що дозволяє ефективно екстрагувати каротиноїди. Адже, 96% етанол покращує розчинність водорозчинних компонентів, тоді як хлороформ у свою чергу забезпечує екстракцію ліпофільних сполук, таких як каротиноїди. По-друге, хлороформ, як менш полярний розчинник, допомагає зберегти стабільність каротиноїдів, знижуючи ризик окислення, а етанол через те, що є менш окисним може забезпечувати додатковий захист каротиноїдів. Всі ці якості одне одного доповнюючи, підвищують конкурентноспроможність суміші серед інших екстрагентів [15].

На рисунку 3.3. наведено результати екстракції торуліну з біомаси різних видів дріжджів *Rhodotorula*.

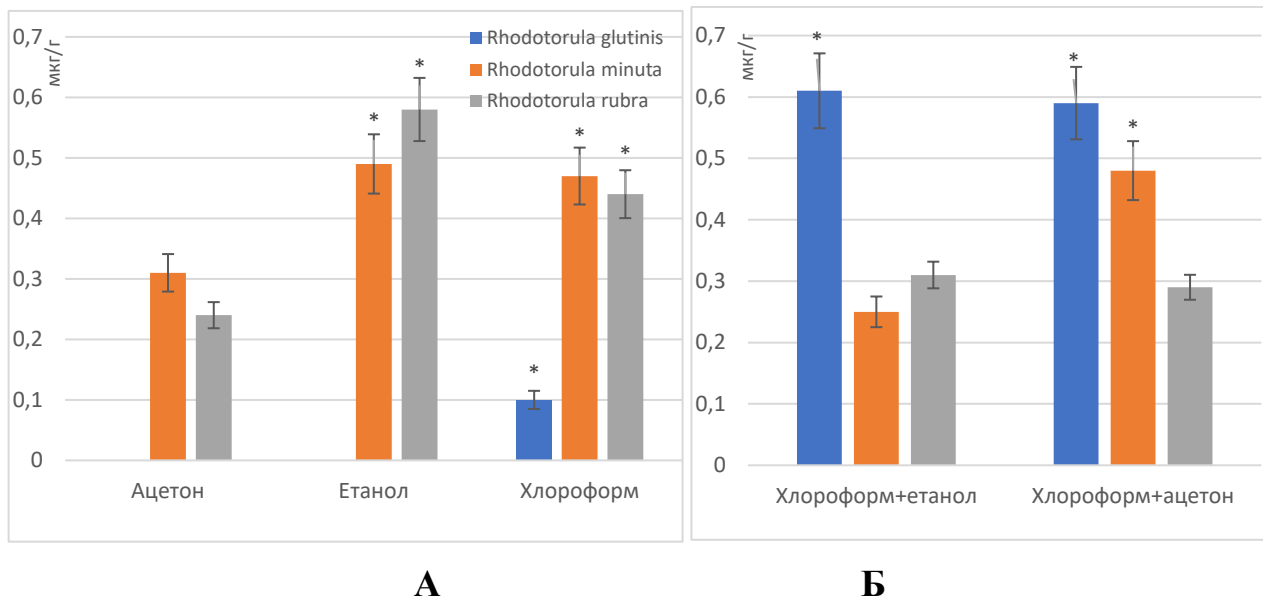


Рис. 3.3 Вміст торуліну, екстрагованого різними типами органічних розчинників (А) та їх сумішей (Б) з біомаси культур *Rhodotorula*

Торулін є специфічним каротиноїдом для дріжджів роду *Rhodotorula* та цінним каротином для багатьох галузей [22].

В роботі [20] показано, що торулін у більшій мірі синтезується *Rhodotorula glutinis*, ніж іншими видами роду *Rhodotorula*. Нашими дослідженнями встановлено, що вихід торуліну серед інших видів родоторул дійсно є найвищим за умов застосування сумішей екстрагентів: хлороформ-етанол та хлороформ-ацетон. Натомість, екстракція іншими розчинниками (ацетон, етанол та їх суміш, хлороформ) призводить до мінімального виходу торуліну.

Слід зауважити, що концентрація торуліну в клітинах родоторул безпосередньо залежить від концентрації торулародину та астаксантину – сполук, що синтезуються з торуліну в метаболічному шляху синтезу каротиноїдів у родоторул [22].

3.2. Вміст каротиноїдів у біомасі УФ-опроміненої культури

Rhodotorula minuta

Ультрафіолетове випромінювання (УФ) – це фізичний мутаген, який досить суттєво впливає на молекулярно-біохімічні реакції організмів.

Ультрафіолетове випромінювання умовно ділиться на:

- довгі ультрафіолетові хвилі (від 315 до 400 нм);
- середні ультрафіолетові хвилі (від 280 до 315 нм);
- короткі ультрафіолетові хвилі (10-280 нм).

Ультрафіолетове випромінювання залежно від дози може мати різний вплив на мікроорганізми. УФ при невеликих дозах може сприяти накопиченню ряду біологічно активних речовин. Щодо великих доз ультрафіолету, то таке опромінювання впливає на структуру та функціональні властивості макромолекул, зокрема ДНК. Проте, в ході еволюції живі організми виробили ряд пристосувань до дії цього мутагену [28]. Так, каротинсинтезуючі дріжджі роду *Rhodotorula* в своїх клітинах накопичують каротиноїди, однією з найголовніших функцій яких є антиоксидантна, тобто захист клітин від пошкоджень за дії ультрафіолетового випромінювання, чим стають ще ціннішими для біотехнології та біоінженерії [6].

Серед мутагенів, які можуть впливати на збільшення кількості каротиноїдів у біомасі дріжджів роду *Rhodotorula* виділяють хімічні, біологічні та фізичні чинники. До біологічних чинників відносять експресію генів, які закладені в геномі самих дріжджів, штам, залежність від фази росту самих клітин. До хімічних чинників належать речовини, які працюють як стимулятори росту та накопичення каротиноїдів і входять в склад поживного середовища. Щодо фізичних чинників, то одним із них є опромінення ультрафіолетом [4,25].

У ході даного експерименту використовували короткохвильове ультрафіолетове випромінювання з довжиною хвилі 254 нм з метою інтенсифікації накопичення каротиноїдів у біомасі штаму *Rhodotorula minuta* УКМ У-1349.

Результати аналізу показали, що кількість клітин у нативній культурі була більша, ніж в опроміненій в 1,8 раз (табл. 3.2). Також слід зазначити, що розмір клітин в нативній культурі був меншим, ніж в опроміненій.

Табл. 3.2.

Порівняльна характеристика особливостей нативної та опроміненої культури дріжджів *Rhodotorula minuta*

Ознака	Нативна культура	Опромінена культура
Колір	Блідо-помаранчевий	Яскраво-помаранчевий
Час появи пігментації	4 доба	3 доба
КУО/ мл	155±8	80±10 *

Примітка: * - достовірна різниця відносно контролю (неопроміненої нативної культури) ($p \leq 0,05$)

Екстракцію каротиноїдів здійснювали 96% етанолом. Щодо вибору розчинника, то керувалися результатами попереднього етапу дослідження.

На рисунку 3.4. представлено результати екстракції 96% етанолом β -каротину із біомаси нативної та опроміненої *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349.

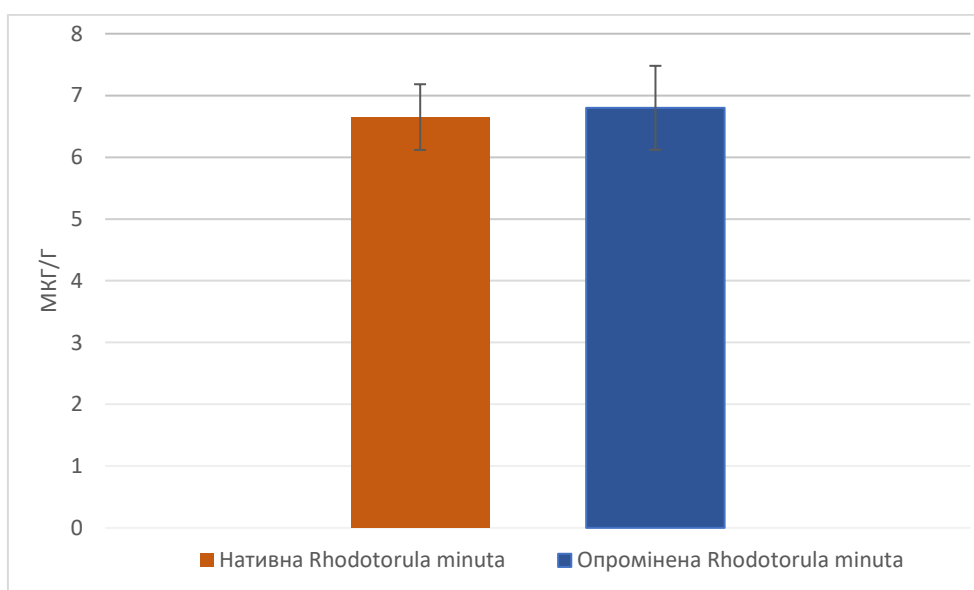


Рис. 3.4. Вміст β -каротину в біомасі нативної та опроміненої культури *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349 за умов екстракції 96% етанолом

Проаналізувавши дані можемо відмітити, що вміст β -каротину в біомасі нативної та опроміненої культури *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349 достовірно не змінився.

Натомість, істотна різниця встановлена при визначенні вмісту торулародину. На рисунку 3.5. наведено отримані результати виходу торулародину екстракцією 96% етанолом.

Проаналізувавши дані можна сказати, що за дії УФ вміст торулародину в біомасі опроміненої *Rhodotorula minuta* збільшився у 3,3 рази за кількості цього ксантофілу в біомасі нативних дріжджів. Ймовірно, посилений синтез торулародину пов'язаний з його фотопротекторною дією у відповідь на вплив ультрафіолетового опромінення.

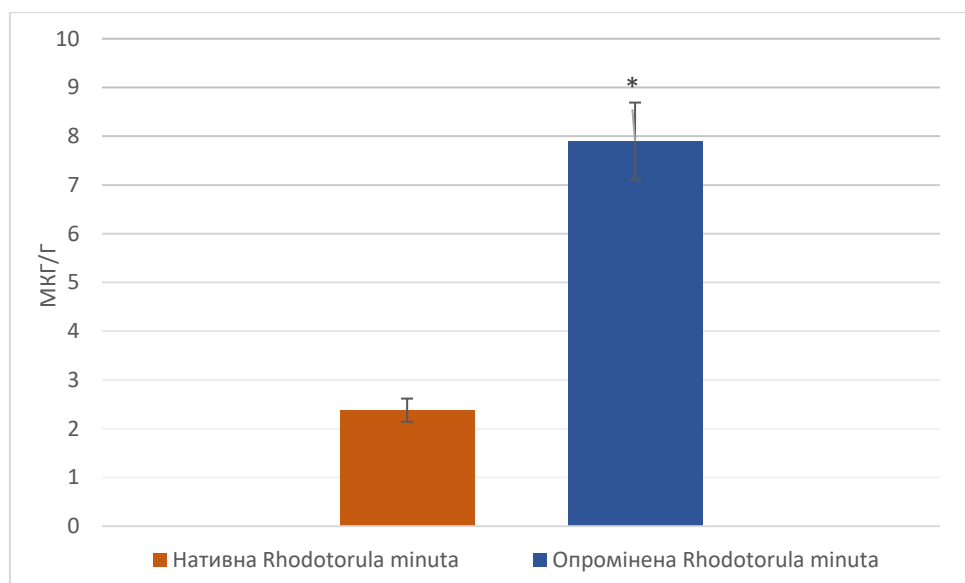


Рис. 3.5. Вміст торулародину в біомасі нативної та опроміненої культури *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349 за умов екстракції 96% етанолом

Накопичення даного каротиноїду є відповіддю дріжджів на стресовий вплив ультрафіолетом, адже, торулародин є потужнішим поглиначем пероксидних радикалів, ніж β -каротин. Тому кількість торулародину є набагато більшою, ніж інших каротиноїдів у опроміненому штамі дріжджів *Rhodotorula minuta* [22, 25].

Нами не зареєстровано наявності толуліну за досліджуваних умов в біомасі опромінених каротинсинтезуючих дріжджів *Rhodotorula minuta*. Це можна пояснити тим, що велика кількість толулародину в клітинах дріжджів змогла синтезуватися в ході метаболічної реакції гідроксилювання та оксигенації із каротину – толуліну [21,22].

ВИСНОВКИ

1. Максимальний вміст загальних каротиноїдів, які були екстраговані з біомаси дріжджів роду *Rhodotorula*, отриманий при використанні етанолу та суміші хлороформ-етанол.

2. Найбільший вихід специфічних для родоторул каротиноїдів – торуліну та торулародину зареєстровано при застосуванні хлороформ-етанольної та хлороформ-ацетонової сумішей.

3. Ультрафіолетове опромінення ($\lambda=254$ нм) культури *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349 призвело до збільшення виходу торулародину за умов екстракції етанолом у 3,3 рази в порівнянні з нативним штамом при незмінній кількості екстрагованого β -каротину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сімахіна, Г. О. (2010). Функціональна роль каротиноїдів та особливості їх використання у харчових технологіях. Наукові праці НУХТ, (33), 45-48.
2. Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., & He, Z. (2019). Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507-517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>
3. Спасьонова, Л. М., Тобілко, В. Ю., & Пилипенко, І. В. (2019). Інструментальні методи хімічного аналізу. Електрохімічні, спектроскопічні, хроматографічні методи.
4. Park, P. K. (2007). Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, 53(2), 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.06.026>
5. Šovljanski, O., Saveljić, A., & Tomić, A. (2022). Carotenoid-producing yeasts: Selection of the best-performing strain and the total carotenoid extraction procedure. *Processes*, 10(1699). <https://doi.org/10.3390/pr10091699>
6. Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 163.
7. Moliné, M., Libkind, D., & van Broock, M. (2012). Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts. *Methods in Molecular Biology*, 898, 275-283. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-918-1_19
8. Mannazzu, I., Landolfo, S., Lopes da Silva, T., & Buzzini, P. (2015). Red yeasts and carotenoid production: Outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1665-1673. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1927-x>
9. Aksu, Z., & Eren, A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical engineering journal*, 35(2), 107-113.

10. El-Banna, A., El-Razek, A., & El-Mahdy, A. (2012). Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food and Nutrition Sciences*, 64-71. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.31011>
11. Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Gientka, I., & Kieliszek, M. (2016). *Rhodotorula glutinis* - Potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6103-6117. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>
12. Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743-756.
13. Jahns, P., Latowski, D., & Strzalka, K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(1), 3-14.
14. Дзигун, Л. П., Палюшок, О. А., & Чуднівєць, О. М. (2016). Підбір методів екстракції каротиноїдів із глибинного міцелію *Laetiporus Sulphureus*. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*, 30-35.
15. Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 90-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
16. Шевченко, Л. В., Михальська, В. М., Яремчук, О. С., Камінська, О. В., & Байєр, О. В. (2018). Джерела каротиноїдів та їх характеристика (огляд). *Science Review*, (8(15)), 19-26.
17. Салєба, В., Сарібекова, Д., & Куник, О. (2016). Дослідження процесу екстрагування каротиноїдів. *Вісник ХНТУ*, (2(57)), 178-182.
18. Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185-196.
19. Meléndez-Martínez, A. J. (2007). Carotenoid pigments: Structural and physicochemical considerations. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 109-117.

20. Packer, L., Obermüller-Jevic, U., Kraemer, K., & Sies, H. (2005). Carotenoids and retinoids: Molecular aspects and health issues. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 351-356.
21. Tang, W., & Wang, Y. (2019). Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507-517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01022>
22. Zoz, L. (2014). Torularhodin and torulene: Bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics - a review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(2), 109-117. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201400152>
23. Бездрабко, А. Д. (2020). Технологія виробництва вітаміну А. Дільниця біосинтезу (Bachelor's thesis, КПІ ім. Ігоря Сікорського). 10-17.
24. Orosa, M., Torres, E., & Fidalgo, P. et al. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, 12, 553-556. <https://doi.org/10.1023/A:1008173807143>
25. Краєвська, І. М., & Васіна, Л. М. (2017). Динаміка накопичення біомаси і каротинсинтезуюча активність *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) FC Harrison (1982) за дії ультрафіолету. *Біологічні системи*, 9(2), 183-186.
26. Кирица, Е. (2005). Спрямований синтез каротиноїдів у дріжджів та перспектива їх використання: дис. ... доктора біології: 03.00.23. Кишинів, 129 с.
27. Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
28. Hockberger, P. E. (2002). A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 76(6), 561-569.
29. Yadav, K. S., & Prabha, R. (2014). Effect of pH and temperature on carotenoid pigments produced from *Rhodotorula minuta*. *International Journal of Fermented Foods*, 3(2), 105-113.
30. da Silva, S. R. S., Stamford, T. C. M., Albuquerque, W. W. C., Vidal, E. E., & Stamford, T. L. M. (2020). Reutilization of residual glycerin for the produce β -carotene by *Rhodotorula minuta*. *Biotechnology letters*, 42, 437-443.

31. Yurkov, A. M., Vustin, M. M., Tyaglov, B. V., Maksimova, I. A., & Sineokiy, S. P. (2008). Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising source of carotenoids and ubiquinone Q 10. *Microbiology*, 77, 1-6.
32. Rapoport, A., Guzhova, I., Bernetti, L., Buzzini, P., Kieliszek, M., & Kot, A. M. (2021). Carotenoids and some other pigments from fungi and yeasts. *Metabolites*, 11(2), 92.
33. Raja, R., Hemaiswarya, S., & Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 517–523. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0776-7>.
34. Ungureanu, C., Ferdes, M., & Chirvase, A. A. (2012). Torularhodin biosynthesis and extraction by yeast cells of *Rhodotorula rubra*. *Revista de Chimie*, 63*(3), 316–318.
35. Cazes, J., & Scott, R. P. (2002). *Chromatography theory* (Vol. 88). CRC press.

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Дозволяється працювати лише на заземлених об'єктах.

Приміщення хімічних лабораторій обладнуються вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин – відсмоктувачами.

Підлоги лабораторій повинні мати рівну, неслизьку, зручну для очищення поверхню, бути стійкими до дії механічних навантажень, вологи і агресивних середовищ.

Кожен працівник у лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце.

Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

У спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини замінюють пластиковими.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При розведенні речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- усю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;
- при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;
- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями;
- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації.

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт та ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при ввімкненій вентиляції, вимкнутих газових пальниках і нагрівальних електроприладах.

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогнебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;
- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра.

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.

Забороняється використовувати речовини без етикеток та із закінченим терміном зберігання;

Після закінчення роботи необхідно вимити та висушити посуд, прибрати робоче місце, провітрити приміщення, відключити всі нагрівальні та освітлювальні прилади, закрутити водопровідні та газові крани.

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

Виходячи з лабораторії, обов'язково перевірити, чи вимкнені газ, вода,

електроенергія.

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймісті рідини, вогонь засипати піском. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і, перекочуючи, збивати полум'я.

У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2 %-го KMnO_4 , а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змастити маззю від опіків.

При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3 %-вим розчином натрій гідрогенкарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2 %-вим розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди, і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2 %-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5 %-вим розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна

заклеїти антисептичним пластиром.

При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.