

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

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

**ЗАСТОСУВАННЯ УФ-МУТАНТНОЇ КУЛЬТУРИ *RHODOTORULA
MINUTA* В ТЕХНОЛОГІЇ БІОІНКАПСУЛЯЦІЇ ЖИВИХ КОРМІВ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 407 групи
Спеціальності 162

«Біотехнології та біоінженерія»

Демчук Галина Михайлівна

Керівник:

кандидат біологічних наук, доцент

Худа Л.В.

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2025 р.

Зав. кафедрою _____ Волощук О.М.

Чернівці – 2025

Анотація

Кваліфікаційна робота присвячена оцінці впливу УФ-опроміненої культури *Rhodotorula minuta* на каротиноїдний профіль та про-антиоксидантний статус *Daphnia magna* в умовах біоінкапсуляції. Встановлено, що УФ-опромінення індукує підвищення рівня торуліну й торулародину у біомасі *R. minuta* на 8 добу культивування. Інкапсуляція *D. magna* УФ-опроміненою культурою *R. minuta* приводить до підвищення концентрації досліджуваних каротиноїдів впродовж експерименту. Встановлено збільшення чисельності інкапсульованої *D. magna* на 37% порівняно з контролем на 16-у добу вигодовування. Вміст карбонільних похідних та ТБК-активних продуктів в гомогенатах *D. magna*, що отримували УФ-опромінену культуру, вищий у порівнянні з контролем протягом усього терміну експерименту. Рівень активності супероксиддисмутази у гомогенатах *D. magna*, які протягом 16 діб інкапсулювали УФ-опроміненою біомасою дріжджів *R. minuta*, удвічі перевищує значення, встановлені для контрольної групи. Отримані результати свідчать про перспективність застосування УФ-індукованих штамів *R. minuta* у технологіях біоінкапсуляції для аквакультури.

Ключові слова: *Rhodotorula minuta*, біоінкапсуляція, *Daphnia magna*, каротиноїди, антиоксидантна активність.

Abstract

The qualification thesis is dedicated to assessing the impact of UV-irradiated *Rhodotorula minuta* culture on the carotenoid profile and pro-/antioxidant status of *Daphnia magna* under bioencapsulation conditions. It was established that UV exposure induces an increase in torulene and torularhodin levels in *R. minuta* biomass by the 8th day of cultivation. Encapsulation of *D. magna* with UV-irradiated *R. minuta* culture leads to a rise in the concentration of the studied carotenoids throughout the experiment. A 37% increase in the population of encapsulated *D. magna* was recorded compared to the control group on the 16th

day of feeding. The content of carbonyl derivatives and TBARS in homogenates of *D. magna* fed with UV-irradiated culture was higher compared to the control throughout the entire experimental period. The superoxide dismutase activity level in homogenates of *D. magna* encapsulated with UV-irradiated *R. minuta* biomass for 16 days was twice as high as in the control group. The obtained results indicate the potential of UV-induced *R. minuta* strains for use in bioencapsulation technologies for aquaculture.

Keywords: *Rhodotorula minuta*, bioencapsulation, *Daphnia magna*, carotenoids, antioxidant activity.

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

підпис автора

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Характеристика та класифікація каротиноїдів.....	8
1.2. Фізіолого-біохімічні та культуральні особливості <i>Rodotorulla sp.</i> як продуцентів каротиноїдів.....	11
1.3. Шляхи біосинтезу каротиноїдів у <i>Rodotorulla minuta</i> та вплив УФ-опромінення на інтенсифікацію синтезу каротиноїдів.....	12
1.4. Вільнорадикальні процеси за умов УФ-опромінення.....	14
1.5. Застосування технології біоінкапсуляції каротиногенних дріжджів у <i>Daphnia magna</i> як живий корм.....	16
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	18
2.1. Матеріали дослідження.....	18
2.2. Методи дослідження.....	19
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	26
3.1. Аналіз вмісту каротиноїдів в біомасі нативної та УФ-опроміненої культури <i>Rhodotorula minuta</i>	26
3.2. Динаміка кількості <i>Daphnia magna</i> впродовж інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів <i>Rhodotorula minuta</i>	30
3.3. Аналіз рівня оксидативної модифікації білків <i>Daphnia magna</i> за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів <i>Rhodotorula minuta</i>	31
3.4. Рівень накопичення ТБК-активних продуктів <i>Daphnia magna</i> за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів <i>Rhodotorula minuta</i>	33
3.5. Супероксиддисмутазна активність <i>Daphnia magna</i> за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів	

<i>Rhodotorula minuta</i>	34
ВИСНОВКИ.....	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	38
ДОДАТКИ.....	44

ВСТУП

У сучасній аквакультурі забезпечення високої виживаності та оптимального росту личинок риби на ранніх стадіях розвитку залишається критичним завданням. Після виснаження жовткового мішка личинки переходять від ендogenous до екзогенного живлення, однак їхній шлунково-кишковий тракт ще недостатньо розвинений для ефективного засвоєння штучних кормів. Крім того, обмежені можливості через незрілість щелеп, м'язів та зорових нервів ускладнюють споживання нерухомих частинок корму. У цьому контексті живі корми, такі як фітопланктон і зоопланктон, є незамінними на початкових етапах вирощування, оскільки вони забезпечують високу біодоступність поживних речовин та стимулюють природні харчові реакції личинок [1].

Проте використання живих кормів пов'язане з низкою викликів, зокрема, варіабельністю їхнього поживного складу, високими витратами на культивування та ризиком перенесення патогенних мікроорганізмів. Ці фактори стимулюють пошук інноваційних підходів до збагачення живих кормів, зокрема, шляхом біоінкапсуляції функціональних добавок, таких як каротиноїди [2].

Каротиноїди, зокрема β -каротин, торулін і торулародин, є природними антиоксидантами, які відіграють ключову роль у захисті клітин від ушкоджень, спричинених активними формами кисню та ультрафіолетовим випромінюванням. Дріжджі роду *Rhodotorula*, зокрема *Rhodotorula minuta*, здатні синтезувати значні кількості каротиноїдів, що робить їх перспективними об'єктами для збагачення живих кормів.

Ультрафіолетове (УФ) опромінення є ефективним методом індукції мутацій у мікроорганізмах, що може призвести до підвищення продукції каротиноїдів у дріжджах. Дослідження показали, що опромінення дріжджів *Rhodotorula minuta* УФ-світлом стимулює синтез каротиноїдів та інших фотозахисних сполук, таких як мікоспорини. Ці сполуки можуть бути

ефективно використані для збагачення живих кормів, покращуючи їхню поживну цінність та функціональні властивості [3].

Актуальність даного дослідження зумовлена зростаючим попитом на екологічно безпечні та функціонально збагачені корми для аквакультури, зокрема на ранніх етапах розвитку гідробіонтів. Застосування біоінкапсуляції дафній з використанням УФ-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta*, що продукують високий вміст каротиноїдів, відкриває нові можливості для підвищення поживної цінності живих кормів. Це дозволяє не лише оптимізувати імунологічну та окисно-відновну рівновагу у вирощуваних організмів, але й сприяє розвитку сталих біотехнологічних рішень у галузі рибництва.

Метою нашої роботи було оцінити вплив УФ-опроміненої культури *Rhodotorula minuta* на каротиноїдний профіль та про-антиоксидантний статус *Daphnia magna* в умовах біоінкапсуляції.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Визначити кількісний вміст каротиноїдів в нативній та опромінених культурах *R. minuta*;
2. Оцінити ефективність біоінкапсуляції опроміненою культурою *R. minuta* за показниками вмісту каротиноїдів та динамікою чисельності особин *D. magna*;
3. Кількісно оцінити ступінь індукованого оксидативного стресу в *D. magna* за умов інкапсуляції опроміненою культурою *R. minuta* впродовж експерименту;
4. Визначити активність супероксиддисмутази у *D. magna* на 8-му та 16-ту добу інкапсуляції.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика та класифікація каротиноїдів

Каротиноїди – це ліпофільні тетратерпеноїдні пігменти, що містять вісім ізопренових залишків, з'єднаних системою спряжених подвійних зв'язків, що дозволяє їм ефективно поглинати світло в діапазоні 400–500 нм, та, таким чином діяти як фотопротектори в природі. Ці сполуки виступають захистом для клітини від надмірного світла та ультрафіолетового випромінювання, а також уповільнюють процес утворення вільних радикалів. Водночас, їхня здатність делокалізувати неспарені електрони дозволяє їм нейтралізувати активні форми кисню, захищаючи клітини від оксидативного стресу.

Каротиноїди – розчинні в ліпідах пігменти, які надають клітинним структурам різні кольори – від жовто-помаранчевих до червоних відтінків. Залежно від наявності чи відсутності кисневих функціональних груп їх поділяють на два великі класи:

- Каротини — насичені вуглеводневі сполуки, які розчиняються в жирах та органічних розчинниках (наприклад β -каротин, α -каротин, лікопін)
- Ксантофіли — похідні, які містять гідроксильні, епоксидні або карбонільні групи, що в свою чергу робить їх більш полярними та частково розчинними в спиртах (наприклад лютеїн, зеаксантин, астаксантин).

Ці сполуки синтезуються усіма організмами, окрім тварин. Останні не можуть виробляти каротиноїди та повинні отримувати їх виключно з їжі. Функціонально каротиноїди відіграють низку ключових ролей. Наприклад, у рослин та фотосинтезуючих мікроорганізмів вони відіграють ключову роль у захисті фотосистем, а у людей та тварин деякі з них (β -каротин) діють як провітамін А, покращують загальний імунітет організму, а також

підтримують зорові функції, захищаючи сітківку ока від ушкоджень, викликаних синім світлом [3].

У природі каротиноїди зустрічаються переважно в транс-формі, але вони також можуть існувати у вільному стані у вигляді ефірів жирних кислот та глікозидів, а також у каротино-протеїнових комплексах, зв'язаних з білками [5].

У дріжджів роду *Rhodotorula* в найбільшій мірі синтезуються β -Каротин, торулін та торулародин.

β -Каротин ($C_{40}H_{56}$) — це тетратерпеновий пігмент яскраво-помаранчевого кольору, що складається з двох β -іононових кілець, з'єднаних полієновим ланцюгом, який містить одинадцять спряжених подвійних зв'язків. Ця структура забезпечує його здатність до поглинання світла в діапазоні 400–500 нм. β -Каротин є жиророзчинним каротиноїдом і водночас провітамін А, здатним перетворюватися на ретиналь в організмі. Завдяки цим властивостям він широко застосовується в фармацевтичній, харчовій, косметичній промисловості, а також у виробництві кормових добавок. За даними сучасних досліджень, у видів *Rhodotorula* β -каротин може становити до 70-80% загального вмісту каротиноїдів, що робить ці мікроорганізми привабливими з точки зору біотехнологічного виробництва [5, 6, 10,].

Торулін ($C_{40}H_{54}$) — це червоний каротиноїд, що складається з одного β -іононового кільця, з'єданого з полієновим ланцюгом, який містить 13 спряжених подвійних зв'язків. Він синтезується внаслідок деградування γ -каротину з утворенням додаткового подвійного зв'язку в положенні C13. У дріжджах *Rhodotorula* під впливом осмотичного стресу та високої солоності спостерігається посилення синтезу торуліну, що допомагає захищати клітинні мембрани від ліпідної пероксидації. Його синтез відбувається через мевалонатний шлях, і за наявності мутацій або відповідної оптимізації умов культивування можливе суттєве збільшення продукції [11, 17].

Торулародин ($C_{40}H_{52}O_2$) — це ксантофіл з полярною структурою, що містить карбоксильну групу. Він є окисленим похідним торулену й містить 14 спряжених подвійних зв'язків. Саме завдяки наявності додаткового подвійного зв'язку та полярної функціональної групи торулародин демонструє найвищу антиоксидантну в активність серед усіх каротиноїдів, що синтезуються дріжджами *Rhodotorula*. Саме тому цей пігмент активно нейтралізує активні форми кисню, знижує ступінь перекисного окиснення ліпідів та запобігає пошкодженню клітинних структур [8, 9, 7, 11].

Крім антиоксидантної дії торулену та торулародину, згідно з проведеними дослідженнями, слід відмітити протипухлинну активність у тваринних моделях та антимікробну ефективність проти широкого спектра мікроорганізмів. Ці властивості, а також можливість їх біосинтезу у контрольованих умовах, свідчать про доцільність подальших досліджень щодо промислового застосування обох пігментів як природних біологічно активних сполук [5, 8].

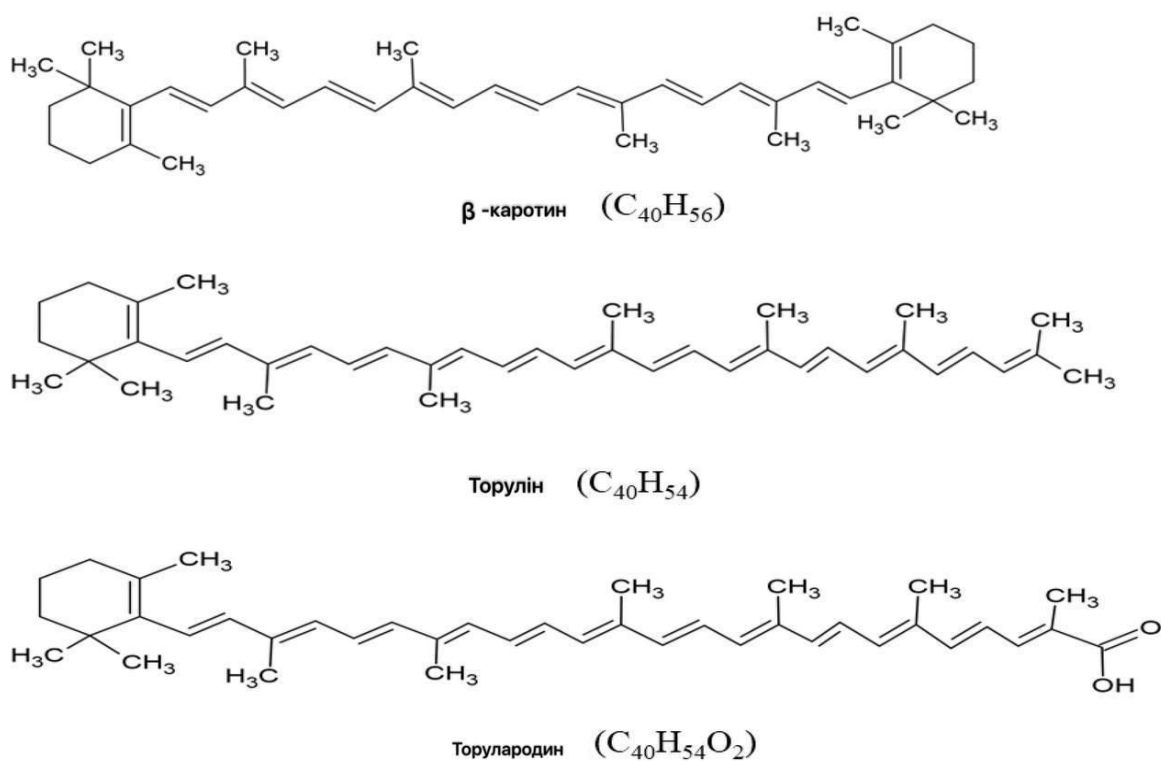


Рис. 1.1. Хімічні структури основних каротиноїдів, які синтезуються дріжджами *Rhodotorula* [6]

Астаксантин ($C_{40}H_{52}O_4$) — це червоно-оранжевий ксантофіл-каротиноїд, структура якого включає 13 спряжених подвійних зв'язків, дві гідроксильні та дві карбонільні групи, що забезпечує йому високу антиоксидантну активність. Наявність кисневмісних функціональних груп дозволяє цьому пігменту ефективно поглинати вільні радикали та генерувати синглетний кисень, що проявляється у здатності захищати клітини від оксидативного стресу. Завдяки ліпофільній природі астаксантин накопичується в мембранах, стабілізуючи їх та запобігаючи перекисному окисненню ліпідів [12, 13].

Лікопен ($C_{40}H_{56}$) — це тетратерпеноїдний каротиноїд із лінійною структурою, яка містить 11 спряжених і 2 неспряжені подвійні зв'язки, що забезпечує йому інтенсивне світлопоглинання в діапазоні 470-510 нм та зумовлює його яскраво червоне забарвлення. Ця будова визначає високу антиоксидантну активність – він ефективно гасить синглетний кисень та перехоплює вільні радикали. Лікопен є жиророзчинною речовиною, нерозчинною у воді, але добре розчинною в хлороформі, гексані та інших органічних розчинниках. Його стабільність залежить від умов середовища – він легко деградує за дії світла, високих температур та в присутності кисню, ізомеризуючись з транс- у цис-ізомери, що знижує його біологічну активність [12].

1.2. Фізіолого-біохімічні та культуральні особливості *Rhodotorula* sp. як продуцентів каротиноїдів

Дріжджі роду *Rhodotorula* – це перспективні мікроорганізми, відомі завдяки своїй здатності до біосинтезу каротиноїдів, таких як β -каротин, γ -каротин, торулен та торулародин. Ці пігменти мають великий потенціал застосування в різних напрямках, таких як харчова та кормова промисловість, фармацевтика, косметологія [10].

Представники роду *Rhodotorula* є сапротрофними дріжджами які є розповсюдженими в різних екологічних нішах починаючи від ґрунтів та водних середовищ і закінчуючи рослинами та тваринними організмами. Вони здатні активно нарощувати свою біомасу на різних недорогих субстратах, що робить їх привабливими для біотехнологічного використання [5].

Особливу увагу привертає *Rhodotorula minuta* оскільки по-перше ці представники є природним джерелом β -каротину, торулену та інших каротиноїдів, синтез яких не потребує генетичної модифікації, що забезпечує натуральне походження продукту — важливу умову для його застосування в харчовій, фармацевтичній та косметичній галузях. По-друге, ці дріжджі здатні ефективно нарощувати свою біомасу на дешевих та доступних субстратах, зокрема на побічних продуктах харчової та біопаливної промисловості (гліцерин, фруктові шкірки, патока, крохмальні залишки), що сприяє зменшенню витрат і утилізації органічних відходів [14].

Ці мікроорганізми демонструють високу адаптивність до умов вирощування, зокрема толерантність до коливань рН (4,5–9) і температури (25–30 °С), що робить їх привабливими для масштабного культивування. У відповідь на різні стрес-фактори, зокрема опромінення ультрафіолетовими променями, культури *Rhodotorula minuta* посилюється інтенсифікація каротиноїдів [15].

У процесі культивування дріжджів *Rhodotorula* активне накопичення біомаси відбувається переважно на початкових етапах, тоді як інтенсивний синтез каротиноїдів спостерігається із настанням стаціонарної фази росту, а саме на 5-7 день ферментації [16]

1.3. Шляхи біосинтезу каротиноїдів у *Rhodotorula minuta* та вплив УФ-опромінення на інтенсифікацію синтезу каротиноїдів

Біосинтез пігментів в клітинах дріжджів включає низку ферментативних процесів, які реалізуються через мевалоновий шлях [21].

Спочатку йде реакція перетворення ацетил-КоА на 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА), яка каталізується ГМГ-КА синтетазою і після модифікується в мевалоновій кислоті (МВА). Наступним кроком мевалонієва кислота в реакціях фосфорилування та декарбоксилування перетворюється в ізопентенілпірофосфат (IPP). Після IPP трансформується на диметилалілпірофосфат (DMAPP), який в свою чергу перетворюється на геранілгеранілпірофосфат (GGPP) в реакції приєднання трьох молекул IPP. В подальшому через конденсацію двох молекул цієї ж сполуки утворюється фіотен, який згодом перетворюється на лікопен та 3,4-дидегідролікопен. Ця реакція каталізується фітендесатуразою, шляхом чотири- та п'ятиступеневого дегідрування. Наступним є перетворення лікопену на γ -каротин та β -каротин шляхом одностадійної та двостадійної циклізації. В подальшому 3,4-дидегідролікопен може бути трансформований на торулін в реакції, яка каталізується біфункціональною лікопенциклазою/фітенсинтазою через шлях одностадійної циклізації. В подальшому він може перетворюватися на торулародин через серію реакцій гідроксилування та окислення. Варто зазначити, що γ -каротин є попередником біосинтезу β -каротину, а торулін виступає попередником торулародину. Такий поділ на аліфатичні та окислені форми забезпечує широке функціональне різноманіття продуктів метаболізму дріжджів [6, 8, 21].

Отже, випромінювання необхідне для підтримки основних життєво важливих функцій живих організмів. Проте інтенсивне ультрафіолетове випромінювання (УФ) є небезпечним для організмів і може завдавати значних пошкоджень, які можемо поділити на прямі та непрямі. Перші означають вплив на макромолекули, такі як білки та ліпіди. Непряме ушкодження відбувається через генерацію активних форм кисню (АФК), які порушують біологічні функції клітин.

Для боротьби із пошкодженнями які були спричиненні ультрафіолетовим випромінюванням організми застосовують різні методи.

Найбільш поширеною стратегією для уникнення шкоди в мікроорганізмах є синтез хімічних речовин таких як каротиноїди. Було виявлено, що каротиноїди проявляють антиоксидантні властивості у бактеріях, водоростях, грибах та рослинах. Вони відповідають за багато функцій зокрема захист від УФ-випромінювання та активних форм кисню (АФК) та тісно пов'язані із мембранними ліпідами. Таким чином, наявність каротиноїдів підвищує стійкість клітин до радіації, зміни температурних умов та окислення [6].

1.4. Вільнорадикальні процеси за умов УФ-опромінення

Мутагенез – це класичний метод збільшення виходу каротиноїдів з диких штамів мікроорганізмів. Серед головних мутагенних факторів - УФ-опромінення, γ -опромінення, хімічні агенти, такі як N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (NTG), етилметансульфонат (EMS) а також вплив високого гідростатичного тиску [10].

Ультрафіолетове опромінення в діапазоні довжин хвиль 320-400 нм викликає не мпряме пошкодження макромолекул, а саме ДНК, білків та ліпідів – через генерацію активних форм кисню (АФК). В той час як випромінювання довжиною 280-320 нм призводить до прямих пошкоджень ДНК. Активні форми кисню, такі як супероксид-аніон (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2) та гідроксильний радикал ($\cdot OH$), є побічними продуктами клітинного метаболізму та можуть утворюватися під впливом зовнішніх чинників, в тому числі УФ-опромінення. Надмірне накопичення АФК порушує баланс між їх утворенням та знешкодженням, що призводить до оксидативного стресу [6, 18, 19].

Одним із ключових проявів оксидативного стресу є пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ), яке полягає в ушкодженні поліненасичених жирних кислот у складі клітинних мембран. Первинними маркерами ПОЛ є дієнові кон'югати (ДК), що утворюються внаслідок ізомеризації подвійних зв'язків у

поліненасичених жирних кислотах за дії вільних радикалів. Їх наявність свідчить про початкову фазу ушкодження ліпідних мембран та активацію вільнорадикальних процесів. Накопичення ДК є передумовою для утворення гідропероксидів, які надалі можуть розпадатися з утворенням вторинних токсичних продуктів, таких як малоновий діальдегід (МДА), пропаналь, гексаналь та 4-гідроксिनоненаль (4-HNE). Особливу увагу приділяють МДА, оскільки він є стабільним і широко використовуваним маркером ступеня окисного пошкодження. МДА здатний ковалентно взаємодіяти з аміногрупами білків, утворюючи шиффові основи, що змінюють третинну структуру білкових молекул та можуть призводити до утворення нерозчинних білок-ліпідних комплексів [19, 20].

Каротиноїди, завдяки своїй структурі з кон'югованими подвійними зв'язками, можуть ефективно нейтралізувати вільні радикали, приймаючи електрони від АФК. Це дозволяє зменшити рівень окисативного стресу в клітинах. Дослідження Моліне та його колег показало, що пігментовані штами дріжджів *Rhodotorula* були більш стійкими до УФ-опромінення, ніж альбіносні штамами. Крім того, був виявлений збільшений вміст каротиноїдів у клітинах дріжджів, що зумовлювало підвищення виживаності мікроорганізмів [21].

Зокрема, дослідженнями Сакакі та співавторів виявлено, що торулародин демонструє найпотужнішу антиоксидантну активність серед інших пігментів, ефективніше інгібуючи деградацію субстратів, викликану синглетним киснем, та краще підтримуючи антиоксидантну активність у клітинах. Біосинтетичні дослідження на дріжджах *Rhodotorula glutinis* показали, що додавання АФК не впливає на утворення β -каротину, проте значно активує синтез торуліну та торулародину, що свідчить про їхню більш виражену здатність до захисту клітин від окисного ушкодження [19, 16, 22].

Завдяки ендogenousму захисту, який забезпечується каротиноїдами, певні групи нефототрофних мікроорганізмів здатні протистояти

світлоіндукованому окисненню та виживати в умовах природного УФ-опромінення. Це дозволяє їм ефективно колонізувати широкий спектр природного середовища, незважаючи на потенційно стресові умови довкілля [10].

1.5. Застосування технології біоінкапсуляції каротиногенних дріжджів у *Daphnia magna* як живий корм

У період переходу рибних личинок від ендогенного до екзогенного живлення особливо актуальним є використання живих кормів, серед яких важливе місце посідають планктонні ракоподібні. Живі корми не лише відповідають за фізіологічні потреби молоді, а й компенсують недостатню гідролітичну активність травної системи личинок завдяки наявності власних ензимів. Ці ферменти сприяють активації травлення та запускають процес автолізу кормових організмів, що підвищує ефективність засвоєння поживних речовин. Попри значні переваги живих кормів, їхня нутрієнтна цінність іноді потребує доповнення, зокрема шляхом збагачення біологічно активними компонентами – пробіотиками, вітамінами, поліненасиченими жирними кислотами, каротиноїдами тощо. Така можливість реалізується завдяки фільтраційному типу живлення зоопланктону, що дозволяє впроваджувати процедуру біоінкапсуляції – введення функціональних добавок у організм кормових об'єктів із подальшим передаванням риби-споживачу [23, 24, 25].

Особливе місце в цій технології належить представникам роду *Daphnia magna*, які є модельним об'єктом в екологічних, токсикологічних, еволюційних дослідженнях завдяки своїй широкій географічній поширеності, чутливості до змін середовища та здатності до циклічного партеногенезу. Цей життєвий цикл дозволяє контролювати фенотипічну варіативність без залучання генетичних змін, що є цінним для дослідження впливу факторів

середовища та робить представників цього зоопланктону особливо привабливими для різних біотехнологічних розробок [26].

Вигодовування дафній дріжджами *Rhodotorula* є перспективною та ефективною стратегією в аквакультурі, особливо в контексті виробництва живих кормів для молоді риб. На відміну від традиційних кормових субстратів, таких як дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, каротинсинтезуючі дріжджі *Rhodotorula minuta* мають здатність продукувати широкий спектр каротиноїдів, зокрема β -каротин, γ -каротин, торулен, торулародин та астаксантин [27].

Інкапсуляція *Rhodotorula* у зоопланктон, зокрема у *Daphnia magna*, дозволяє природним шляхом наситити кормовий об'єкт комплексом есенціальних мікронутрієнтів. При цьому дафнії не лише передають каротиноїди далі по трофічному ланцюгу, а й збагачуються іншими поживними речовинами, які синтезуються дріжджами: білками, вітамінами, поліненасиченими жирними кислотами, біоактивними метаболітами. Завдяки цьому *Rhodotorula* можна розглядати не лише як джерело пігментів, а як повноцінний, високоякісний субстрат для вирощування дафній, що дозволяє підвищити харчову цінність корму і покращити показники росту, виживання та імунної стійкості риб на критичних ранніх етапах розвитку [10, 27].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

У ході роботи було використано культуру дріжджів *Rhodotorula minuta* УКМ Y-1349 з колекції кафедри біохімії та біотехнології ННІБХБ ЧНУ. Як модельний об'єкт для біоінкапсуляції каротиноїдів застосовували ракоподібних *Daphnia magna*, яких відбирали з маточної культури.

Інкубацію *Daphnia magna* проводили у шести скляних ємностях, кожна з яких містила по 200 мл відстояної води. У кожен ємність вносили по 20 особин. Умови культивування включали підтримку температури на рівні $22\pm 1^\circ\text{C}$ та фотоперіод тривалістю 16 годин.

Початкове культивування дріжджів *Rhodotorula minuta* здійснювали на твердому поживному середовищі Сабуро протягом 48 годин при температурі 28°C . Перед наступними етапами частину культур піддавали ультрафіолетовому опроміненню за допомогою бактерицидної лампи ДБ-60 (довжина хвилі — 254 нм). Опромінення проводили у стерильних умовах протягом 120 хвилин, розмістивши джерело випромінювання на відстані 50 см від поверхні культур.

Після завершення опромінення, а також для контрольних (неопромінених) зразків, здійснювали пересаджування культури у рідке поживне середовище Сабуро. Подальше культивування проводилося протягом 8 діб за аналогічних умов.

Вигодовування *Daphnia magna* суспензією дріжджів здійснювали кожні 48 годин. Кількість клітин родоторул для проведення процедури біоінкапсуляції стандартизованою культурою дріжджів розраховували віззповідно до кінцевої концентрації $1,5\times 10^4$ КУО/мл.

2.2. Методи дослідження

Приготування поживного середовища

Для культивування дріжджових культур використовували тверде та рідке середовища Сабуро.

Тверде середовище Сабуро. Для приготування поживного середовища відважували 15,5 г готової сухої суміші агар-Сабуро, яку розчиняли в 250 мл дистильованої води у конічних колбах. Середовище стерилізували протягом 60 хвилин та після охолодження його розливали в чашки Петрі з дотриманням асептичних умов.

Рідке середовище Сабуро. Для нарощування біомаси дріжджів *Rhodotorula minuta*, у тому числі опромінених та контрольних проб, готували рідке поживне середовище. В конічні скляні колби вносили 10 г глюкози та 2,5 г пептону, після чого об'єм доводили дистильованою водою до 250 мл. Поживне середовище стерилізували та після охолодження здійснювали пересів культури з твердого на рідке поживне середовище.

Визначення кількості клітин в нарощеній біомасі дріжджів

Підрахунок клітин дріжджів *Rhodotorula minuta* здійснювали за допомогою лічильної камери Горяєва.

На чисту лічильну камеру наносити невелику краплю дріжджової суспензії за допомогою скляної палички. Поверх неї обережно накладали покривне скло, притискаючи його до бокових виступів, щоб забезпечити необхідний об'єм заповнення.

Лічильну камеру розглядали на біноклярі під збільшенням 10 х. Підрахунок здійснювали в п'яти великих квадратах.

Розрахунки проводили за цією формулою:

$$C = \frac{N}{n \cdot h \cdot S}, \text{ де}$$

N – кількість підрахованих клітин;

n – кількість квадратів в яких проводили підрахунки;

h – глибина камери;

s – площа камери [28].

Аналіз вмісту каротиноїдів в біомасі нативної та УФ-опроміненої культури *Rhodotorula minuta*

Кількісне визначення вмісту каротиноїдів у зразках дріжджів *Rhodotorula minuta* та гомогенатах *Daphnia magna* проводили спектрофотометричним методом. Вимірювання здійснювали у кварцових кюветах з товщиною 1см при довжинах хвиль 450 нм, 509 нм та 537 нм відносно чистого ацетону.

Визначення каротиноїдів у дріжджах. З кожної чашки з культурою дріжджів відбирали по одній бактеріологічній петлі біомаси, яку переносили в пробірки з 2 мл ацетону. Екстракцію проводили у темному місці при кімнатній температурі протягом 3 діб. На 4-й день проби центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хвилин, після чого відбирали надосадову рідину для спектрофотометричного аналізу.

Визначення каротиноїдів у нарощеній біомасі. На 8-й день культивування дріжджів, в рідкому середовищі Сабуро, для оцінки накопичення пігментів відбирали 1 мл культуральної рідини, центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хвилин, над осадову рідину видаляли та до осаду додавали 2 мл ацетону. Зразки, як і в попередньому вимірюванні екстрагували, центрифугували та здійснювали вимірювання.

Визначення каротиноїдів у гомогенатах зоопланктону. Для визначення вмісту пігментів в *Daphnia magna* на 6-й та 16-й день відбирали по 5 особин з дослідних та контрольних груп. Вимірювання здійснювали за всіма маніпуляціями які описані вище [12, 13].

Розрахунки концентрацій 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, C_2 мкг/мл:

$$C_2 = 5,3 \cdot D 509 - 6,7 \cdot D 537$$

Вміст торулародину, C_3 мкг/мл:

$$C_3 = 6,7 \cdot D 537 - 1,1 \cdot D 509$$

Перерахунок кількості каротиноїдів (у мкг/г біомаси) 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 » [12].

Динаміка кількості *Daphnia magna* впродовж інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів

Rhodotorula minuta

Для вивчення впливу УФ-мутантної та контрольної культури *Rhodotorula minuta* на динаміку чисельності зоопланктону проводили модельний експеримент з використанням *Daphnia magna*. Як середовище культивування використовували відстояну водопровідну воду, попередньо проаналізовану на вміст важких металів із метою забезпечення екологічно безпечних умов утримання.

Дафній переносили у скляні ємності об'ємом 200 мл, що містили зазначене середовище, у кількості 20 особин на одну банку. Вигодовування проводили кожні 48 годин біомасою дріжджів *Rhodotorula minuta* — як контрольного штаму, так і попередньо опроміненого ультрафіолетовими променями. Із тією ж періодичністю (1 раз на 48 годин) здійснювали

підрахунок чисельності дафній з метою реєстрації змін популяційної динаміки у процесі інкапсуляції, з та статистичним аналізом даних.

Приготування гомогенатів *Daphnia magna*

Гомогенати готували на 8-й та 16-й день вигодовування зоопланктону. Для цього з кожної проби відбирали по 5 особин *Daphnia magna*, які гомогенізували у 2 мл 1М буфера Tris-HCL (pH 7,0) до утворення однорідної суспензії. Отримані зразки піддавали ультразвуковій обробці протягом 120 хв та надалі здійснювали центрифугування при 3000 об/хв тривалістю 15 хв [13].

Аналіз рівня оксидативної модифікації білків *Daphnia magna* за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta*

Методика ґрунтується на утворенні комплексної сполуки між карбонільованими білками та 2,4-динітрофенілгіdraзином (ДНФГ), з подальшим спектрофотометричним визначенням при 370 нм.

В ході проведення аналізу спочатку здійснювали підготовку проб. Для дослідної проби до 0,05мл гомогенату додавали 1 мл 20% ТХО та здійснювали центрифугування протягом 10 хв (3000 об/хв.) після чого додавали 1 мл 0,1 М ДНФГ. Для контрольної проби здійснювали ті ж самі маніпуляції, проте замість ДНФГ додавали 1 мл 2 М HCL. Надалі усі проби витримували при температурі 37°C протягом 1 години.

Після інкубації проби центрифугували 15 хв (3000 об/хв.), осад, який утворився, тричі промивали розчином етанол:етилацетат та після кожного промивання центрифугували при 3000 об/хв протягом 5 хв. Розчинення осаду проводили у 2,5 мл 8 М сечовини на водяній бані.

Вимірювання оптичної густини розчину проводили при довжині хвилі 370 нм у кюветі товщиною 10 мм.

Для подальших розрахунків у гомогенаті додатково визначали загальний вміст білку за Лоурі [29].

Розрахунки вмісту карбонільованих похідних білків у гомогенатах проводили за цією формулою:

$$\frac{E \cdot 3 \text{ мл} \cdot 1000 \text{ мг}}{21 \cdot 0,1 \text{ мл} \cdot C \text{ білка}}, \text{ де}$$

E – екстинція;

21 M⁻¹ см⁻¹ – молярний коефіцієнт екстинкції;

0,1 мл – кількість досліджуваної речовини;

C білка – вміст білку в мг/мл (за методом Лоурі) [30].

Рівень накопичення ТБК-активних продуктів *Daphnia magna* за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta*

Вміст ТБК-активних продуктів (ТБКАП) у безклітинних екстрактах визначали за реакцією малонового діальдегіду (МДА) з тіобарбітуровою кислотою, що відбувається при високій температурі та кислому рН. Утворюється тримолекулярний комплекс (1 МДА : 2 ТБК), який має характерне світло поглинання при довжині хвилі 532 нм.

В ході проведення аналізу до 0,4 мл без клітинного екстракту додавали 3 мл 10 мМ фосфатного буфера (К-На) на основі 125 мМ КСl, рН 7,4. Пероксидаційний стрес індукували шляхом дворазового додавання 125 мкл 10 мМ FeSO₄ з інтервалом 10 хв. Реакцію зупиняли додаванням три хлороцтової кислоти з подальшим центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 10 хв.

До 2 мл супернатану додавали 0,5 мл 1 н НСl та 1 мл 0,7 мМ ТБК. Інкубували зразки на водяній бані при температурі 95-100 °С протягом 20 хв. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, інтенсивно перемішували та центрифугували при попередньому режимі.

Оптичну щільність вимірювали у верхньому бутаноловому шарі при довжині хвилі 532 нм. Для кількісного аналізу використовували молярний коефіцієнт поглинання $156000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Вміст ТБК-активних продуктів здійснювали за такою формулою:

$$\text{ТБКАП} = \frac{A_{532}}{\epsilon \cdot l} \times \frac{V_{\text{заг}}}{C_{\text{білка}}}, \text{ де}$$

A_{532} – оптична густина проби при 532 нм;

$\epsilon = 156000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – молярний коефіцієнт поглинання МДА;

l – товщина кювети;

$V_{\text{заг}}$ – загальний об'єм проби;

$C_{\text{білка}}$ – концентрація білка в пробі в мг/мл (за методом Лоурі) [31, 32].

Супероксиддисмутазна активність *Daphnia magna* за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta*

Активність ензиму супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) визначали за його здатністю інгібувати ауто окиснення адреналіну в лужному середовищі. Продукт реакції – адренохром – має характерне поглинання при довжині хвилі 347 нм, що дозволяє кількісно оцінити інгубувальну дію СОД.

В ході проведення аналізу спочатку було підготовлено дві проби. Для дослідної проби до 2 мл 0,2 М карбонатного буфера (рН 10.6) додавали 10 мкл гомогенату та 100 мкл 0,1% розчину адреналіну. Реакційну суміш перемішували та одразу розпочинали спектрофотометричне вимірювання при 347 нм з інтервалом у 30 с протягом 3-5 хв.

Для контрольної проби до 2,5 мл 0,2 М карбонатного буфера (рН 10.6) додавали 100 мкл адреналіну та здійснювали вимірювання.

Інгібування СОД розраховували за відсотковим зменшенням швидкості утворення адренохрому, оскільки 1 одиниця ферментативної активності СОД

відповідає 1% інгібування аутоокиснення адреналіну. Активність виражали в одиницях на мг білка (білок визначали за методом Лоурі).

Відсоток інгібування вираховували за формулою:

$$I\% = [1 - (D_d / D_k)] * 100\%, \text{ де}$$

D_d і D_k – швидкості реакції аутоокиснення адреналіну в присутності і у відсутності.

Супероксиддисмутазну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{I\%}{100\% - I\%} \times \frac{2N}{a}, \text{ де}$$

$I\%$ - відсоток інгібування;

N – розведення;

a – концентрація білка в нерозведених пробах (за методом Лоурі) [33].

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням критичного рівня значущості $p \leq 0,05$ та програмного забезпечення Microsoft Excel. За наявності статистично достовірної різниці додатково застосовували t -критерій Стюдента [34]

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз вмісту каротиноїдів в біомасі нативної та УФ-опроміненої культури *Rhodotorula minuta*

Каротиноїди – це ліпофільні тетрапеоїдні пігменти з системою спряжених подвійних зв'язків, які виконують важливу біологічну функцію у процесах нейтралізації активних форм кисню. Одним із ефективних природних продуцентів цих сполук є дріжджі роду *Rhodotorula minuta*, які здатні накопичувати значну кількість β -каротину, торуліну та торулародину, що разом можуть становити до 70% від загального каротиноїдного профілю клітини.

На початковому етапі нашого дослідження нами було проведено аналіз каротиноїдного профілю *R. minuta*, одразу після проведення опромінення УФ-променями та після 8-ми денного культивування в рідкому поживному середовищі. Контролем слугувала неопромінена культура (рис. 3.1.).

У ході дослідження встановлено, що УФ-опромінення індукує підвищення рівня каротиноїдів у клітинах *Rhodotorula minuta*, що особливо виражено на 8 добу культивування. На ранньому етапі, після дії ультрафіолетових променів, небуло зафіксовано зростання вмісту пігментів в культурах, що ймовірно вказує на мобілізацію антиоксидантних систем клітин. Проте на восьмий день культивування спостерігали тенденцію до зростання вмісту досліджуваних пігментів в УФ-опромінених зразках, зокрема вміст торуліну та торулародину зростав на понад 63% та 53% відповідно. Отримані дані підтверджують активну участь каротиноїдів у захисті клітин мікроорганізмів від фотодеструктивної дії УФ-випромінювання згідно літературних даних [35].

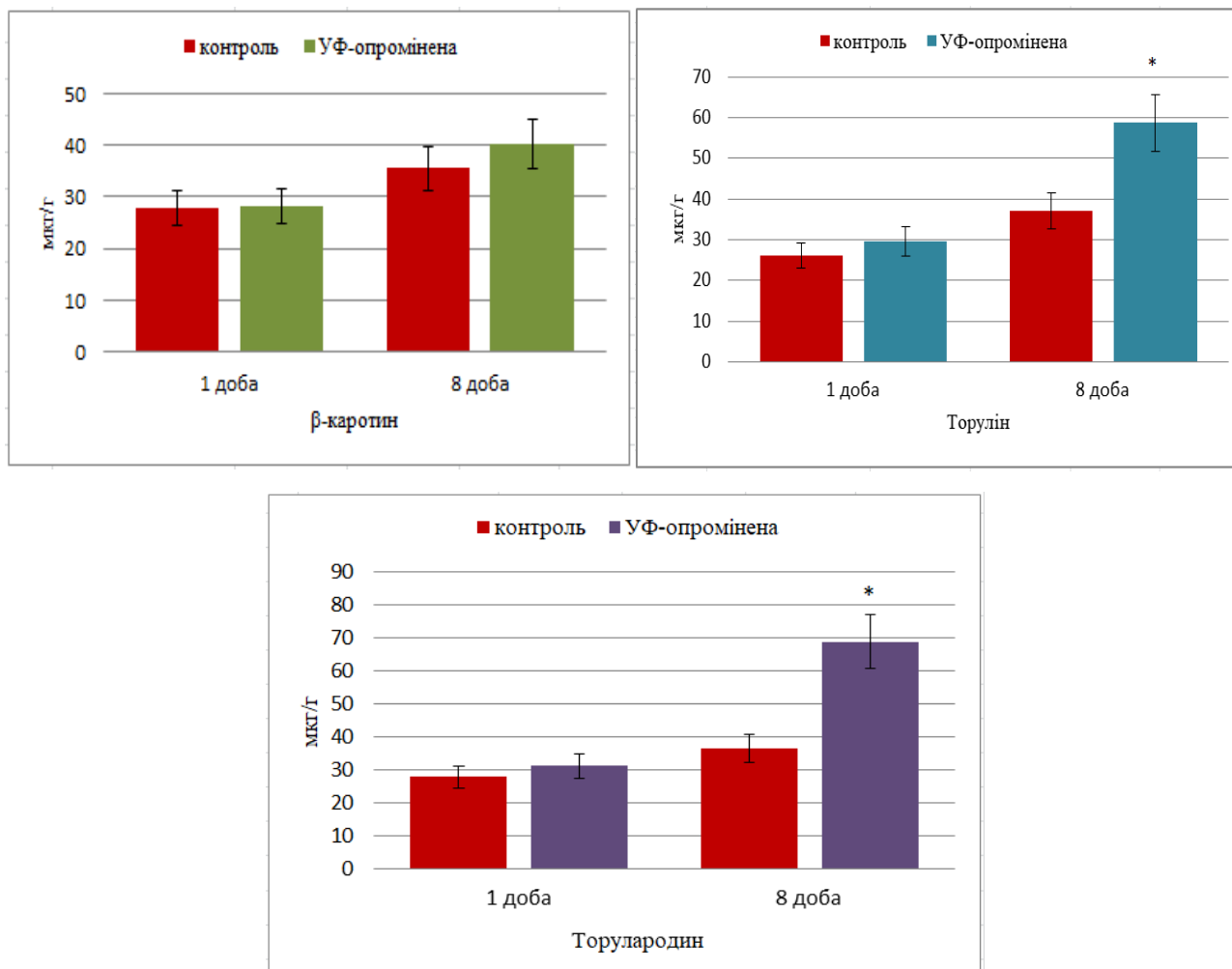


Рис. 3.1. Вміст каротиноїдів в біомасі нативної та УФ-опроміненої культури *Rhodotorula minuta* одразу після опромінення та на 8 добу культивування

Примітка: * - достовірна різниця вмісту пігменту у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

Торулародин, як показано в роботі [16], має більший потенціал до пригнічення пероксидного окиснення ліпідів і гасіння синглетного кисню, ніж β-каротин. Таким чином торулародин відіграє ключову роль у підтриманні мембранної стабільності за умов оксидативного стресу. Крім того, високий рівень каротиноїдів характерний для стаціонарної фази росту дріжджів. Таким чином, спостережуване підвищення синтезу торуліну та

торулародину після опромінення вказує на активацію захисних механізмів, що підтверджує важливу біологічну функцію каротиноїдів як компонентів антиоксидантної системи клітин [8].

Біоінкапсуляція дафній УФ-опроміненою культурою *R. minuta*, для яких нами встановлено підвищений вміст каротиноїдів, може привести до насичення даними метаболітами живого корму.

У ході наступного етапу дослідження було здійснено кількісне визначення вмісту каротиноїдів у гомогенатах *Daphnia magna* на 8-й та 16-й день після інкапсуляції контрольними та УФ-опроміненими штамми дріжджів *Rhodotorula minuta* (рис. 3.2).

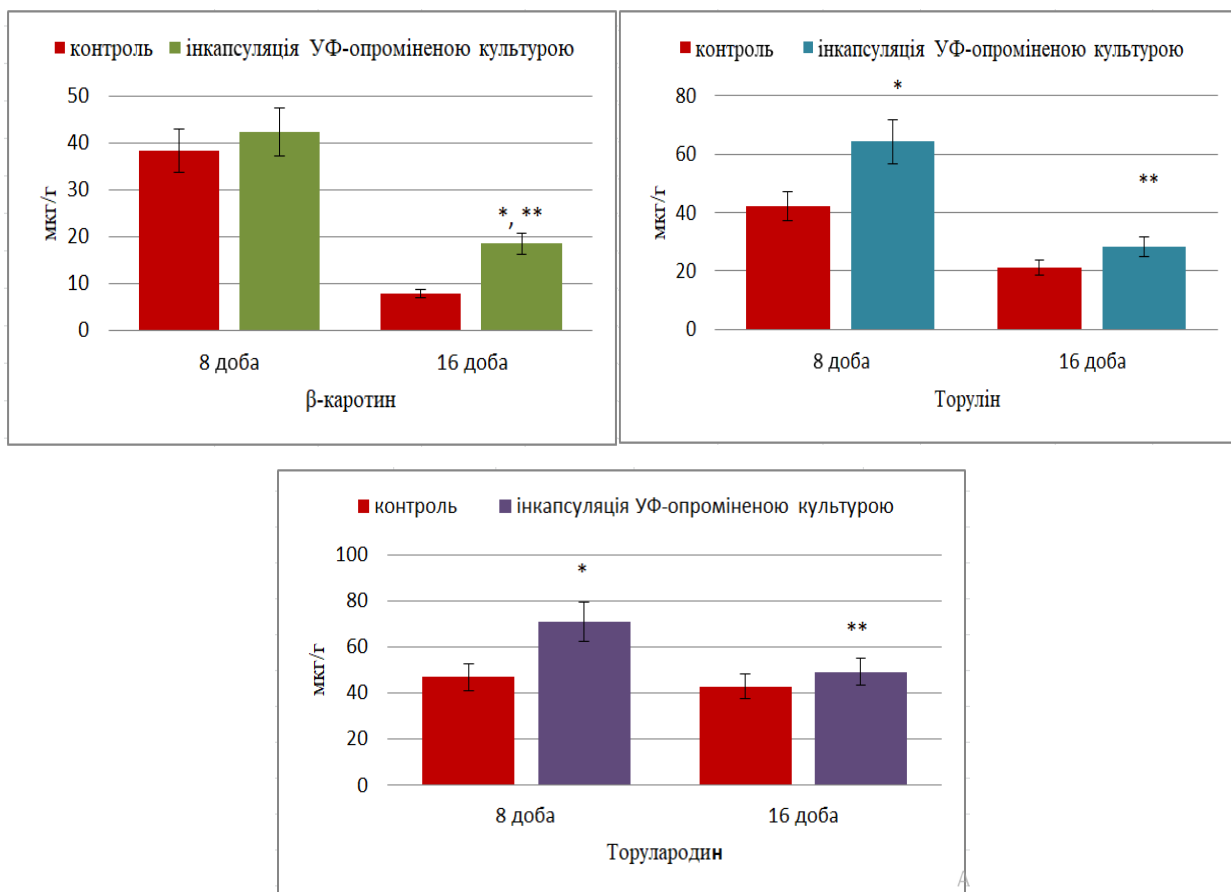


Рис. 3.2 Вміст каротиноїдів в особинах *Daphnia magna* після процедури біоінкапсуляції УФ-опроміненої та контрольної культури *Rhodotorula minuta*

Примітка: * - достовірна різниця вмісту пігменту у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$);

** - достовірна різниця між дослідними пробами на різний день експерименту ($p \leq 0,05$).

Такий підхід дозволив оцінити динаміку накопичення пігментів у трофічному ланцюзі та простежити потенційний вплив мутагенезу на ефективність біоінкапсуляції. У межах дослідження встановлено, що вміст пігментів - β -каротину, торуліну та торулародину – у гомогенатах *D. magna* після біоінкапсуляції суттєво варіював в залежності від тривалості насиченням зоопланктону суспензією.

На восьму добу годування, зафіксовано достовірне підвищення концентрації всіх трьох пігментів у групі, що отримувала УФ-мутантний штам. Вміст торуліну та торулародину зростав більш ніж на 50%, що вказує на ефективну передачу антиоксидантного потенціалу дріжджів з кормом у тіло зоопланктону. Цей ефект можна пояснити підвищеною експресією ферментів мевалонатного шляху у дріжджів під впливом мутагенного стресу, що підтверджується даними літературних джерел [8, 16].

На шістнадцяту добу експерименту зареєстровано тенденцію до зниження вмісту всіх каротиноїдів в обох групах. Ми припускаємо, що це пов'язано з активним включенням цих сполук в метаболізм. Особливо виразним було зменшення вмісту β -каротину — понад 50% в опромінених і понад 75% у контрольних пробах, що ймовірно може свідчити про його окиснення або конверсію в ретиноїдні похідні.

Зниження вмісту торуліну та торулародину на 56% і 30% відповідно у групі опромінених дріжджів ймовірно пов'язане з участю цих сполук у нейтралізації пероксильних радикалів та інших активних форм кисню, що формуються у відповідь на індукований оксидативний стрес. Дані досліджень автора Моліне та його колег вказують, що накопичення торулародину корелює зі зростанням стійкості клітин до УФ-опромінення, а їх подальше зниження, яке було зареєстроване в нашому аналізі, свідчить про їхню функціональну участь у стрес-індукованому метаболізмі [35].

3.2. Динаміка кількості *Daphnia magna* впродовж інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів

Rhodotorula minuta

У сучасних технологіях вирощування гідробіонтів метод біоінкапсуляції розглядається як високоефективний інструмент збагачення живих кормів цільовими мікробними добавками з підвищеною біологічною активністю. У цьому контексті дріжджі *Rhodotorula minuta* привертають особливу увагу як перспективний продуцент каротиноїдних сполук, зокрема β -каротину, торуліну та торулародину. Одним із критеріїв ефективності біоінкапсуляції виступає оцінка динаміки чисельності *Daphnia magna* як модельного об'єкта зоопланктону, що демонструє високий рівень чутливості до якісного складу кормового середовища.

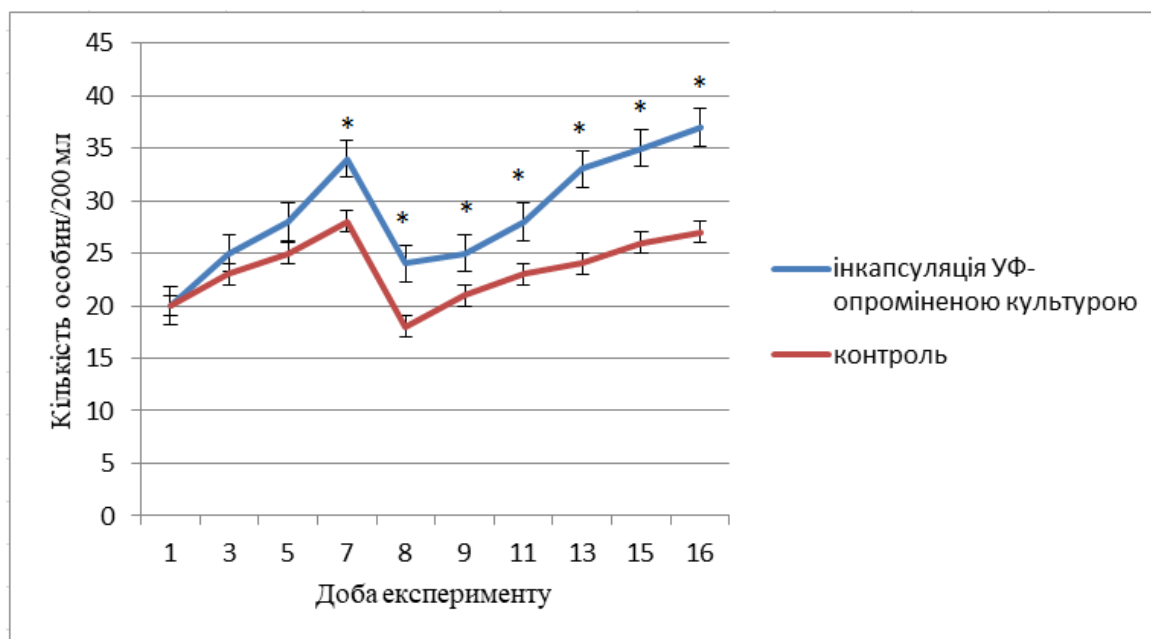


Рис. 3.3. Динаміка кількості особин *Daphnia magna* впродовж інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta*

Примітка: * - достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

У межах дослідження динаміки чисельності *Daphnia magna* за умов інкапсуляції культурами контрольних та ультрафіолетово-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta* ми зафіксували, що застосування опромінених дріжджів сприяє підвищенню репродуктивної активності дафній. Зокрема, на 16-ту добу чисельність особин у групі з біоінкапсульованими опроміненими дріжджами статистично перевищувала контрольну на 37% (рис. 3.3).

Припускаємо, що отримані результати можуть бути зумовлені підвищеним вмістом каротиноїдів та інших біологічно активних сполук у дріжджах після УФ-опромінення, які позитивно впливають на фізіологічний стан та репродуктивну здатність зоопланктону. Встановлені припущення корелюють з літературними даними, де використання каротинсинтезуючих дріжджів призводило до накопичення каротиноїдів в організмі *Daphnia magna* та підвищення їх виживаності [36].

3.3. Аналіз рівня оксидативної модифікації білків *Daphnia magna* за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta*

Визначення вмісту карбонільованих похідних білків у гомогенатах *Daphnia magna* здійснювали з метою кількісної оцінки ступеня оксидативної модифікації білкових макромолекул, що виникає під впливом надлишку активних форм кисню. Карбонільні групи є стабільними кінцевими продуктами незворотного окиснення білків і проявляють себе як надійні біомаркери хронічного оксидативного стресу. Вимірювання показника ОМБ у даному дослідженні дозволяє оцінити ефективність захисної дії каротиноїдів, які надходять в ході вигодовування УФ-опроміненим кормом, на білкові компоненти клітин *Daphnia magna* [23].

В ході дослідження встановили, що на восьму добу вигодовування значення ОМБ у групі, що споживала УФ-опромінену культуру, перевищували контрольні показники майже на 56% (рис. 3.4.). Така тенденція зберігалась і на 16 добу, де вміст карбонільованих білків у дослідній групі був на 58% вищим.

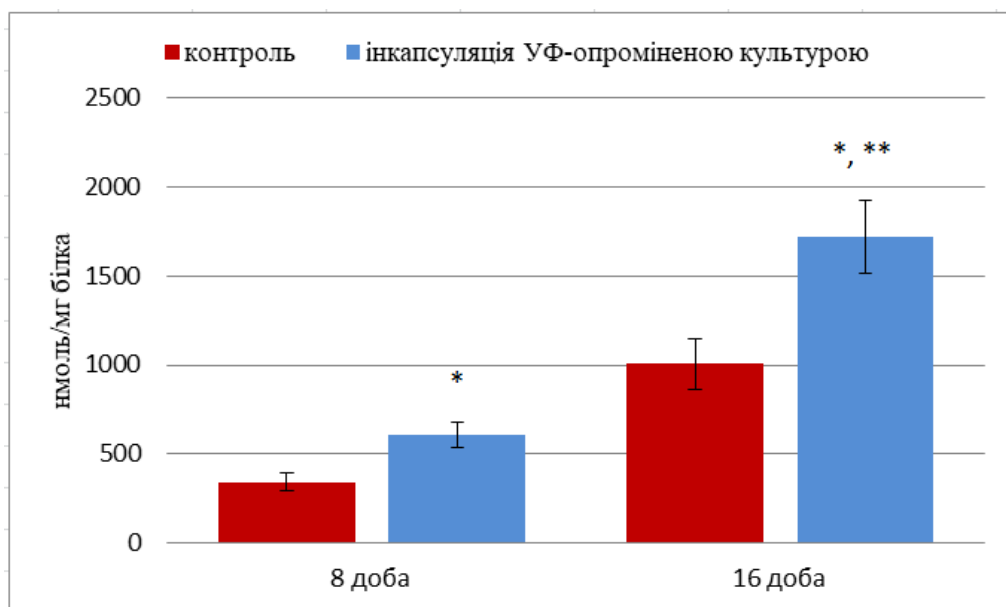


Рисунок 3.4 Рівень окисної модифікації білків в гомогенатах *Daphnia magna* після інкапсуляції УФ-опроміненою та контрольною культурами дріжджів *Rhodotorula minuta* на 8-му та 16-ту добу

Примітка: * - достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$);

** - достовірна різниця між показниками після інкапсуляції УФ-опроміненою культурою на різних етапах експерименту ($p \leq 0,05$).

Оскільки накопичення ОМБ є результатом незворотних оксидативних ушкоджень білків, спричинених АФК, можемо стверджувати, що отримані дані вказують на те, що використання опромінених дріжджів, збагачених антиоксидантами, ймовірно активізувало у дафнії процеси детоксикації АФК. Наше аргументування можемо підкріпити літературними даними, які доводять, що білки, як одна з головних мішеней оксидативного стресу,

можуть зазнавати модифікацій навіть при помірній активації метаболічних процесів [37].

3.4. Рівень накопичення ТБК-активних продуктів *Daphnia magna* за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta*

Визначення тіобарбітуровоокисотно-активних продуктів (ТБКАП) у гомогенатах *Daphnia magna* є високоспецифічним методом оцінки ступеня інтенсифікації пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжує розвиток оксидативного стресу. Накопичення МДА корелює з порушенням структурно-функціональної цілісності клітинних мембран, індукованим надлишковим утворенням активних форм кисню .

У даному дослідженні визначення ТБКАП дозволило оцінити рівень оксидативного навантаження в організмі дафній, інкапсульованих із дріжджами *Rhodotorula minuta*, та встановити ефективність каротиноїд-залежного антиоксидантного захисту (вторинний маркер).

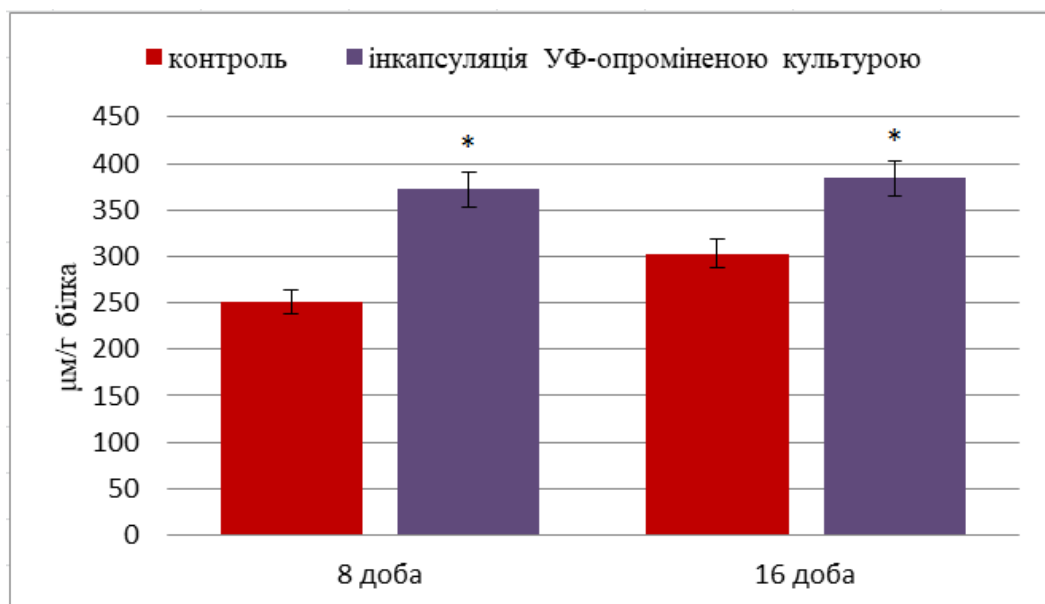


Рис. 3.5 Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенатах *Daphnia magna* після інкапсуляції УФ-опроміненою та контрольною культурами дріжджів *Rhodotorula minuta* на 8-му та 16-ту добу

Пимітка: * - достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

Відповідно до отриманих результатів кількісного визначення ТБК-активних продуктів у гомогенатах *Daphnia magna*, які інкапсулювалися з УФ-опроміненою біомасою дріжджів *Rhodotorula minuta*, зафіксували статистично достовірне підвищення рівня маркера ліпопероксидації вже на 8-му добу експерименту (рис. 3.5). Це може свідчити про довготривалий процес оксидативного ушкодження поліненасичених жирних кислот у складі клітинних мембран зоопланктону.

На 16 добу спостерігали, що показник ТБКАП у групі, що отримувала опромінені дріжджі, зростав порівняно з контролем, що, як ми припускаємо, свідчить про посилення процесів ПОЛ. Це ймовірно було зумовлено кумулятивним ефектом активних форм кисню та поступовим виснаженням ендогенних систем антиоксидантного захисту, що характерно для тривалої експозиції [24, 38].

3.5. Супероксиддисмутазна активність *Daphnia magna* за умов інкапсуляції культурами контрольних та УФ-опромінених дріжджів *Rhodotorula minuta*

Активність супероксиддисмутази (СОД) є ключовим індикатором функціонального стану антиоксидантної системи клітини, зокрема в умовах оксидативного стресу. Цей фермент каталізує дисмутацію супероксидного аніон-радикалу $O_2^{\cdot-}$ до менш реакційноздатного пероксиду водню H_2O_2 і молекулярного кисню O_2 , запобігаючи пероксидному ушкодженню ліпідів, білків і нуклеїнових кислот. У межах цього дослідження визначення

активності СОД у гомогенатах *Daphnia magna* проводилось з метою кількісної оцінки компенсаторної відповіді клітин на утворення активних форм кисню, що є наслідком тривалого споживання дріжджової біомаси *Rhodotorula minuta*, опроміненої ультрафіолетовими променями.

Визначення цього показника є доцільним для встановлення рівня ендогенної антиоксидантної активності та ефективності захисних механізмів, що реалізуються в організмі *Daphnia magna* за умов впливу екзогенних антиоксидантів каротиноїдної природи та супутнього оксидативного навантаження.

У ході проведення дослідження встановили підвищення активності супероксиддисмутази у гомогенатах *Daphnia magna*, які протягом 16 діб інкапсулювали УФ-опроміненою біомасою дріжджів *Rhodotorula minuta*. Зокрема, на 8 добу ферментативна активність СОД у дослідній групі перевищувала контрольні значення на 47%, а на 16 добу — на 54% (рис. 3.6).

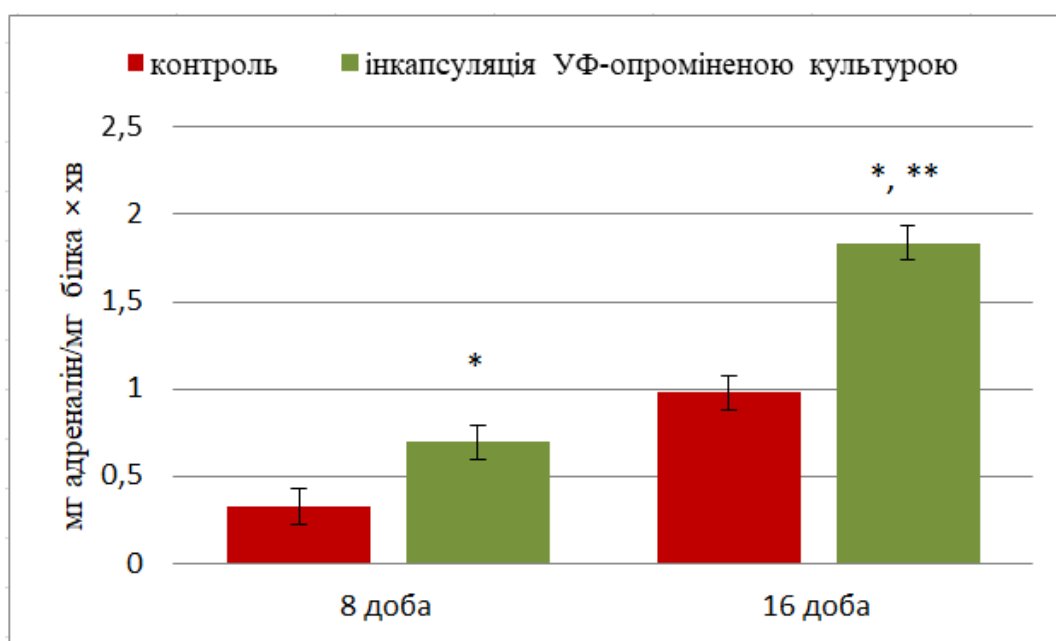


Рис. 3.6. Активність супероксиддисмутази (СОД) у гомогенатах *Daphnia magna* після інкапсуляції УФ-опроміненою та контрольною культурами дріжджів *Rhodotorula minuta* на 8-му та 16-ту добу інкапсуляції

Примітка: * - достовірна різниця у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$);

** - достовірна різниця між показниками після інкапсуляції УФ-опроміненою культурою на різних етапах експерименту.

Така динаміка ймовірно вказує на активацію ендогенної ферментної системи антиоксидантного захисту дафній у відповідь на підвищене надходження активних форм кисню, що могло бути зумовлено як екзогенними умовами інкубації, так і ефектами каротиноїдного навантаження.

Ми припускаємо, що зростання активності цього ферменту в гомогенатах дафній у дослідній групі свідчить про формування антиоксидантної відповіді організму в умовах оксидативного навантаження, ймовірно спричиненого модифікованим кормом. Отримані припущення можемо підкріпити даними з літературних джерел, в ході яких досліджували активацію СОД у безхребетних як частину системної відповіді на екзогенні прооксиданти та АФК [39, 40].

ВИСНОВКИ

1. УФ-опромінення індукує підвищення рівня торуліну й торулародину у біомасі *R. minuta* на 8 добу культивування.

2. Інкапсуляція *D. magna* УФ-опроміненою культурою *R. minuta* приводить до достовірного підвищення концентрації досліджуваних каротиноїдів впродовж експерименту. Встановлено збільшення чисельності інкапсульованої *D. magna* на 37% порівняно з контролем на 16-у добу вигодовування.

3. Вміст карбонільних похідних та ТБК-активних продуктів в гомогенатах *D. magna*, що отримували УФ-опромінену культуру, вищий у порівнянні з контролем протягом усього терміну експерименту.

4. Рівень активності супероксиддисмутази у гомогенатах *D. magna*, які протягом 16 діб інкапсулювали УФ-опроміненою біомасою дріжджів *R. minuta*, удвічі перевищує значення, встановлені для контрольної групи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Recent Trends in Live Feeds for Marine Larviculture: A Mini Review / Y.-J. Pan et al. *Frontiers in Marine Science*. 2022. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.864165>
2. Challenges and prospects of using live feed substitutes for larval fish / S. Melaku et al. *Fisheries and Aquatic Sciences*. 2024. Vol. 27, no. 8. P. 475–487. URL: <https://doi.org/10.47853/fas.2024.e45>
3. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts / D. Libkind et al. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. Vol. 3, no. 3. P. 281–286. URL: <https://doi.org/10.1039/b310608j>
4. Kordiak, J., Bielec, F., Jabłoński, S., & Pastuszek-Lewandoska, D. (2022). Role of Beta-Carotene in Lung Cancer Primary Chemoprevention: A Systematic Review with Meta-Analysis and Meta-Regression. *Nutrients*, 14(7), 1361. <https://doi.org/10.3390/nu14071361>
5. Сімонова, М. (2010). Каротиноїди: будова, властивості та біологічна дія. *Біологічні студії*, 4(2), 159–170.
6. . Li, Z., Li, C., Cheng, P., & Yu, G. (2022). *Rhodotorula mucilaginosa*-alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 8(11), e11505. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505>
7. 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>
8. Ochoa-Viñals, N., Alonso-Estrada, D., Pacios-Michelena, S., García-Cruz, A., Ramos-González, R., Faife-Pérez, E., Michelena-Álvarez, L. G., Martínez-Hernández, J. L., & Iliná, A. (2024). Current Advances in Carotenoid Production by *Rhodotorula* sp. *Fermentation*, 10(4), 190. <https://doi.org/10.3390/fermentation10040190>

9. Biosynthetic Pathway of Carotenoids in Rhodotorula and Strategies for Enhanced Their Production / W. Tang et al. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 29, no. 4. P. 507–517. URL: <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>
10. Li, J., Guo, Y., Cheng, Y., Pi, F., Yao, W., Xie, Y., & Qian, H. (2019). Determination of the Molecular Mechanism of Torularhodin against Hepatic Oxidative Damage by Transcriptome Analysis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 7417263. <https://doi.org/10.1155/2019/7417263>
11. Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: "new" fungal carotenoids for industry?. *Microbial cell factories*, 17(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>
12. Kot, A. M., Błażej, S., Kieliszek, M., Gientka, I., & Bryś, J. (2019). Simultaneous Production of Lipids and Carotenoids by the Red Yeast Rhodotorula from Waste Glycerol Fraction and Potato Wastewater. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189(2), 589–607. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03023-z>
13. Cutzu, R., Coi, A., Rosso, F., Bardi, L., Ciani, M., Budroni, M., Zara, G., Zara, S., & Mannazzu, I. (2013). From crude glycerol to carotenoids by using a Rhodotorula glutinis mutant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 1009–1017. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1264-x>
14. Optimization of pigment production by Rhodotorula minuta URM 5197 and Rhodotorula mucilaginosa URM 7409 using yellow passion fruit peel (Passiflora edulis) / T. M. Silva et al. *Research, Society and Development*. 2021. Vol. 10, no. 17. P. e152101724311. URL: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i17.24311>
15. Reutilization of residual glycerin for the produce β -carotene by Rhodotorula minuta / S. R. S. da Silva та ін. *Biotechnology Letters*. 2020. T. 42, № 3. C. 437–443. URL: <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02790-8>
16. Sakaki, H., Nakanishi, T., Tada, A., Miki, W., & Komemushi, S. (2001). Activation of torularhodin production by Rhodotorula glutinis using weak white

- light irradiation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(3), 294–297.
<https://doi.org/10.1263/jbb.92.294>
17. 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>
18. Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466–488.
<https://doi.org/10.3390/nu6020466>
19. Ito F., Sono Y., Ito T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants*. 2019. Vol. 8, no. 3. P. 72. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox8030072>
20. Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2005. Vol. 15, no. 4. P. 316–328. URL: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
21. Moliné, M., Flores, M. R., Libkind, D., del Carmen Diéguez, M., Farías, M. E., & van Broock, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(8), 1145. <https://doi.org/10.1039/c0pp00009d>
22. Arslansoy, N., & Fidan, O. (2024). Carotenoids and Their Antioxidant Power. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.1006082
23. Cheban, L., Khudiyi, O., Prusińska, M., Duda, A., Khuda, L., Wiszniewski, G., Kushniryk, O., & Kapusta, A. (2020). Survival, proximate composition, and proteolytic activity of *Artemia salina* bioencapsulated with different algal monocultures. *Fisheries & Aquatic Life*, 28(4), 205–215.
<https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0025>

- 24.. Khudyi, O., Kushniryk, O., Khuda, L., & Marchenko, M. (2018). Differences in Nutritional Value and Amino Acid Composition of *Moina macrocopa* (Straus) Using Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula glutinis* as Fodder Substrates. *International Letters of Natural Sciences*, 68, 27–34. <https://doi.org/10.56431/p-9lbt9i>
- 25.. Gorzelnik, S. A., Zhu, X., Angelidaki, I., Koski, M., & Valverde-Pérez, B. (2023). *Daphnia magna* as biological harvesters for green microalgae grown on recirculated aquaculture system effluents. *Science of The Total Environment*, 162247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162247>
- 26.Ebert, D. (2022). *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>
- 27.Vasina, L., Kraievskaa, I., Khudyi, O., Khuda, L., & Cheban, L. (2020). Application of an association of yeast and lactic acid bacteria to bioencapsulate carotenoids in *Daphnia magna* (Straus, 1820). *Fisheries & Aquatic Life*, 28(4), 225–233. <https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0027>
- 28.O'Hara, R. (2012, October 12). Cell counting with a hemocytometer: Easy as 1, 2, 3. *Bitesize Bio*. <https://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>
- 29.Lowry O., Rosebrough N., Farr A., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–75.
- 30.. Wehr, N. B., & Levine, R. L. (2012b). Quantification of Protein Carbonylation. *Y Methods in Molecular Biology* (c. 265–281). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_18
- 31.Segin, T. B., Hnatush, S. O., & Gorishniy, M. B. (2015b). The processes of lipid peroxidation in the cells of *Chlorobium limicola* IMV K-8 under the influence of copper (II) sulphate. *Biosystems Diversity*, 24(1), 72–77. <https://doi.org/10.15421/011608>
- 32.Reitznerová, A., Šuleková, M., Nagy, J., Marcinčák, S., Semjon, B., Čertík, M., & Klempová, T. (2017). Lipid Peroxidation Process in Meat and Meat

Products: A Comparison Study of Malondialdehyde Determination between Modified 2-Thiobarbituric Acid Spectrophotometric Method and Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(11), 1988. <https://doi.org/10.3390/molecules22111988>

33.. Volkov, V., Lobanov, A., Voronkov, M., Baygildiev, T., Misin, V., & Tsivileva, O. (2023). Kinetics and Mechanism of Epinephrine Autoxidation in the Presence of Plant Superoxide Inhibitors: A New Look at the Methodology of Using a Model System in Biological and Chemical Research. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 12(8), 1530. <https://doi.org/10.3390/antiox12081530>

34. Руденко, В. М. (2012). *Математична статистика*. Центр учбової літератури.

35.. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin / M. Moliné et al. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2010. Vol. 9, no. 8. P. 1145. URL: <https://doi.org/10.1039/c0pp00009d>

36.. Khuda, L., & Khudyi, O. (2024). ANALYSIS OF DAPHNIA MAGNA SURVIVAL CURVES UNDER CONDITIONS OF ENCAPSULATION BY RHODOTORULA MINUTA BIOMASS. *Biologichni systemy*, 16(1), 53–57. <https://doi.org/10.31861/biosystems2024.01.053>

37. Oxidative stress: fundamentals and advances in quantification techniques / H. K. Krishnamurthy et al. *Frontiers in Chemistry*. 2024. Vol. 12. URL: <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1470458>

38. Tsikas, D., Tsikas, S. A., Mikuteit, M., & Ückert, S. (2023). Circulating and Urinary Concentrations of Malondialdehyde in Aging Humans in Health and Disease: Review and Discussion. *Biomedicines*, 11(10), 2744. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102744>

39. Environmental Pollutants and Oxidative Stress in Terrestrial and Aquatic Organisms: Examination of the Total Picture and Implications for Human Health /

G. O. Anetor et al. *Frontiers in Physiology*. 2022. Vol. 13. URL:
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.931386>

40. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. 2020. Vol. 94, no. 3. P. 651–715. URL:
<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

ДОДАТКИ

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, вимкнених 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 легкозаймисті 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.

Публікації за результатами дослідження