

УДК 579.222.3+577.164.12

В.Ю. Поліщук, М.І. Маланюк, О.М. Дуган

**МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ І БІОСИНТЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
EREMOTHECIUM ASHBYI GUILL.**

This paper considers the morphological and cultural properties of ascomycetes *Eremothecium ashbyi* F-340, a producer of riboflavin in various nutrient mediums. We also demonstrate the accretion of fungal biomass, the level of its riboflavin accumulation and the consumption of carbohydrates of nutrient mediums. Through experiments conducted, we determine that using the medium which contains wort in its composition is the most reasonable. Moreover, the riboflavin level in this medium is 2,8 times higher than in other mediums.

Вступ

Рибофлавін синтезується більшою частиною вищих рослин і багатьма мікроорганізмами, включаючи бактерії, дріжджі та гриби. Тварини не здатні до самостійного синтезу рибофлавіну, і їхня потреба в ньому задовольняється мікрофлорою шлунково-кишкового тракту та їжею.

Рибофлавін, або вітамін В₂, є попередником флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) – кофакторів для широкого кола ферментів метаболізму, має комерційну цінність як домішка в харчовій промисловості. Кілька видів флавіногенних мікроорганізмів застосовуються в промисловості для виробництва рибофлавіну за допомогою ферментації.

Мікроорганізми-продуценти рибофлавіну поділяються на 3 групи:

- слабкі (*Clostridium acetobutylicum*);
- помірні (дріжджі *Pichia guilliermondii* і *Candida flareri*);
- сильні суперпродуценти (*Eremothecium ashbyi*, *Ashbya gossypii*).

Промислове виробництво рибофлавіну здійснюється трьома способами: хімічним, мікробіологічним і змішаним синтезом. Останній включає мікробний синтез рибози з подальшою хімічною модифікацією її в рибофлавін. Рибофлавін виробляється різної якості: більш очищений, призначений для харчування та медичних цілей, і менш очищений, призначений для ринку кормів для тварин. Для фармацевтичних рецептур рибофлавін синтезують хімічно, в той час як кормові концентрати для птахів і домашньої худоби отримують ферментаційно, використовуючи *Eremothecium ashbyi* або *Ashbya gossypii*. Проте додаткові етапи виділення та очистки дають можливість з рибофлавіну, отриманого ферментаційно, одержати препарат медичної якості [1].

E. ashbyi – це аскоміцет, який не утворює плодових тіл, його аски розміщені безпосередньо

на міцелії, і він формує справжній розгалужений міцелій. Хоча *E. ashbyi* належить до фітопатогенних грибів, які інфікують коробочки бавовника, соєві боби та ряд інших рослин, і призводить до великих втрат врожаю у всьому світі [2], він є одним із важливих суперпродуцентів рибофлавіну.

Міцеліальний гриб *E. ashbyi* здійснює суперсинтез не лише рибофлавіну, але й ФАД. Особливо активно синтезується ФАД при додаванні у середовище культивування мальтози [3, 4]. Проте цей гриб має недолік – він нестабільний при зберіганні. На щільних середовищах при кімнатній та зниженій температурах і навіть у процесі ліофілізації він легко втрачає свою здатність до суперсинтезу рибофлавіну [5].

E. ashbyi культивується на середовищах, які у своєму складі як джерело вуглецю містять моно- і дисахариди, мелясу, гідрол або неохмелене пивне сусло, а як джерело азоту – пептон, дріжджовий екстракт, або автолізат, картопляний екстракт, соєве борошно. Як стимулятори флавіногенезу застосовуються додаткові компоненти, наприклад недорогі органічні відходи – м'ясний екстракт, кров'яне і рибне борошно [1, 6, 7].

У працях [8–10] показано здатність *E. ashbyi* синтезувати ефірну олію, яка містить у своєму складі β-фенілетанол (12,7–27,7 %) і монотерпенові спирти – гераніол (69,5–84,5 %), нерол і ліналоол. Встановлено, що ароматичні та антимікробні властивості ефірних олій, синтезованих *E. ashbyi* та отриманих з пелюсток троянди, практично не відрізняються [9]. Це дає змогу розглядати даний гриб як нетрадиційне джерело отримання натуральних ароматичних речовин.

Постановка задачі

Метою дослідження є вивчення морфологічних і культуральних особливостей штаму *Eremothecium ashbyi* F340 та його здатності на-

копичувати рибофлавін на різних поживних середовищах.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження був штам *Eremothecium ashbyi* F340, отриманий із Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів (таксономічне положення: царство *Fungi*, відділ *Ascomycota*, клас *Hemiascomycetes*, порядок *Saccharomycetales*, родина *Spermothoraceae* [11, 12]).

Штам гриба зберігався при кімнатній температурі на скошеному агаризованому глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) складу: дріжджовий екстракт – 0,5 %; пептон – 0,3; глюкоза – 1,0; агар – 2,0 %.

З метою дослідження росту на щільних середовищах *E. ashbyi* культивувався на агаризованих ГПС, соєвому середовищі, середовищі Чапека–Докса, картопляно-декстрозному середовищі (КДА) та сусло-агарі.

Культивування на рідких середовищах здійснювалося при 28 °С протягом семи діб у конічних колбах з 50 мл рідкого поживного середовища на качалці зі швидкістю 180 об/хв. Для цього використовувалися глюкозо-пептонне середовище (ГПС), середовище Чапека–Докса [13], соєве середовище [10], середовище Городкової та сусло (330 мл неохмеленого пивного сусла на 1 л води). Посівний матеріал отримувался на ГПС і вносився у кількості 5 %.

Кількість біомаси визначалася ваговим методом після її відділення від культуральної рідини та висушування до сталої маси при 105 °С. Вміст рибофлавіну визначався спектрофотометрично при $\lambda = 450$ нм після попереднього кип'ятіння культуральної рідини з біомасою протягом 30 хв і гідролізу ФАД до ФМН протягом 12 год у 10 % ТХО [14]. Визначення редуруючих речовин на початку та в кінці культивування здійснювалося фериціанідним методом (метод Хагедорна–Іенсена) [15]. Морфологія культури *E. ashbyi* вивчалась під мікроскопом ULAB® XY-B2.

Результати і їх обговорення

На агаризованих середовищах КДА, ГПС та сусло-агарі *E. ashbyi* F340 утворює пласкі, матові колонії яскраво-жовтого кольору, на соєвому середовищі – жовтогарячі, які легко (як плівка) знімаються з агару (рис. 1).

Форма колоній округла діаметром 8–16 мм, поверхня великих колоній радіально покреслена,

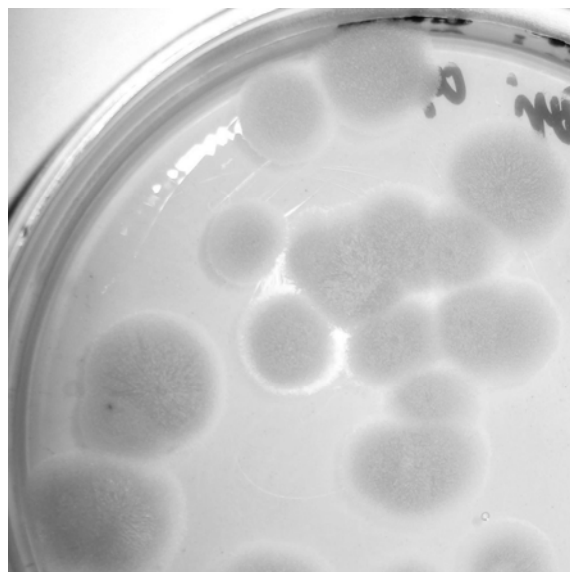


Рис. 1. Колонії *E. ashbyi* F340 на сусло-агарі

краї колоній бахромчасті. З третього дня культивування спостерігається забарвлення субстрату в яскраво-жовтий колір. На 5-ту добу культивування стає забарвленим все середовище у чашці Петрі. Зрідка на чашках Петрі з'являлися колонії білого кольору. Найчастіше (до 30 % колоній білого кольору) це траплялося при відновленні музейної культури і майже не траплялося при регулярних пересівах культури та чергуванні рідких та агаризованих поживних середовищ. Це збігається з літературними даними [16, 17] про нестабільність даної культури при зберіганні.

Лише на середовищі Чапека–Докса спостерігався незначний ріст колоній, які не мали жовтого забарвлення, середовище також не забарвлювалось. Колонії мали ниткоподібну форму та невеликий діаметр – 2–3 мм.

При культивуванні *E. ashbyi* F340 на рідких поживних середовищах встановлено, що культура на всіх середовищах росте у вигляді ниткоподібних структур у товщі поживного середовища, при цьому культуральна рідина залишається прозорою та інтенсивно забарвлюється у жовтий колір. Жовто-зелена флюоресценція в ультрафіолетовому світлі свідчить про накопичення рибофлавіну.

Морфологічні дослідження штаму *E. ashbyi* F340 на різних поживних середовищах виявили його відмінні ознаки (рис. 2). Дихотомічний розгалужений міцелій складається з багатоядерних клітин. На середовищі Городкової, суслі та ГПС майже половина міцелію має жовте забарвлення внаслідок накопичення у вакуолях рибофлавіну.

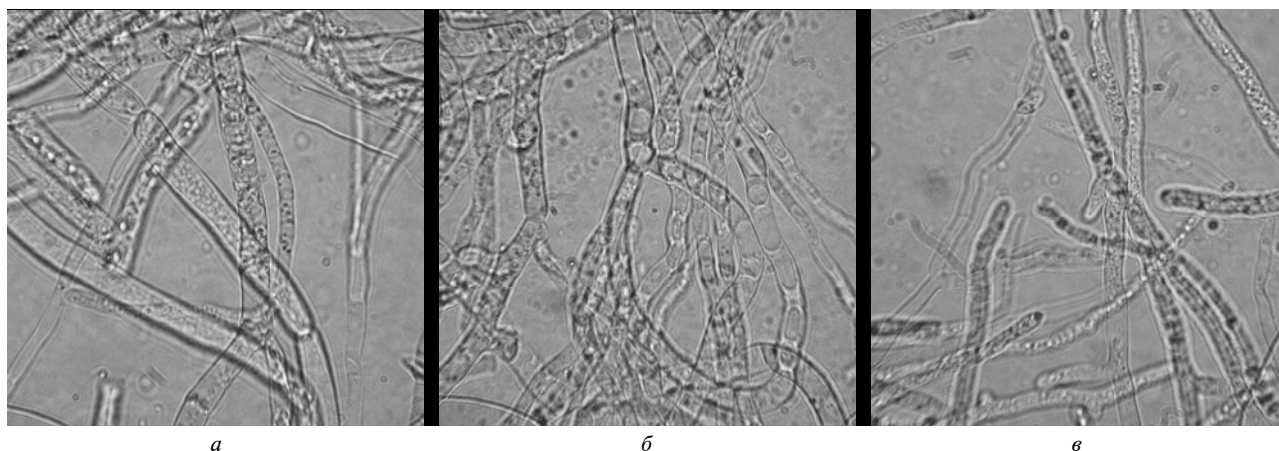


Рис. 2. Морфологічні особливості міцелію *E. ashbyi* F340 на різних середовищах культивування: а – середовище Городкової; б – ГПС; в – середовище Чапека–Докса, $\times 1000$

Міцелій представлений переважно аскогенними гіфами, безпосередньо на ньому утворюються продовгуваті багатоспорові спорангії. Міцелій на середовищі Чапека–Докса не забарвлений, представлений вегетативними гіфами і не має спорангіїв. Крім того, міцелій на глюкозо-пептонному середовищі особливо відрізняється своєю підвищеною вакуолізацією. Подібне явище описане в праці [18].

Слід зауважити, що під час культивування на агаризованих середовищах та при глибинному культивуванні культуральна рідина мала інтенсивний стійкий приємний запах, який нагадував запах ефірної олії троянди, за рахунок виділення ефірних олій, що збігається з літературними даними [8–10].

При дослідженні рівня накопичення біомаси *E. ashbyi* F340 на різних поживних середовищах (рис. 3), що найчастіше пропонуються для даного гриба в літературі, встановлено, що на середовищі Чапека–Докса спостерігається лише дуже незначний ріст.

Приріст біомаси становить $0,375 \text{ мг/см}^3$ культуральної рідини, а кількість накопиченого у середовищі рибофлавіну – $5,28 \text{ мкг/см}^3$ культуральної рідини (рис. 4). Такий незначний ріст, напевно, пов'язаний з тим, що використане середовище є синтетичним і не містить достатньої кількості ростових факторів.

Кількість рибофлавіну, отриманого на соєвому та глюкозо-пептонному середовищах, становить $29,75$ і $39,54 \text{ мкг/см}^3$ культуральної рідини відповідно (рис. 4).

Найкращий результат було отримано на середовищі, що містило у своєму складі сусло. В таких умовах грибом синтезовано рибофла-

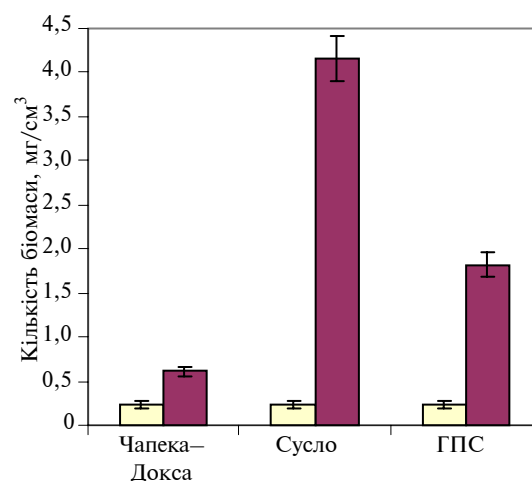


Рис. 3. Накопичення біомаси штамом *E. ashbyi* F340 на різних поживних середовищах: □ – на початку культивування; ■ – в кінці культивування

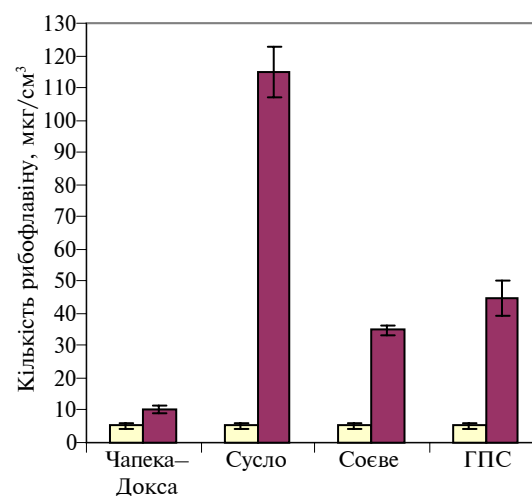


Рис. 4. Накопичення рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F340 на різних поживних середовищах: □ – на початку культивування; ■ – в кінці культивування

віну $109,62 \text{ мкг/см}^3$ культуральної рідини, що у 2,8 разу більше, ніж на ГПС та соєвому середовищі. Приріст біомаси на цьому середовищі становить $3,9 \text{ мг/см}^3$ культуральної рідини, що у 2,5 разу більше, ніж на ГПС.

Основним вуглеводним компонентом суслу є мальтоза, а вона, як відомо [4], стимулює накопичення культурою *E. ashbyi* у середовищі ФАД. Крім того, сусло у своєму складі містить багато цінних ростових факторів, які позитивно впливали на біосинтетичну здатність гриба.

Також досліджувалась повнота споживання вуглеводних компонентів поживних середовищ (рис. 5).

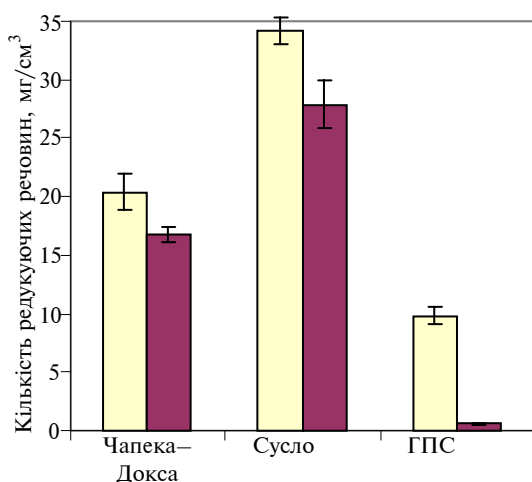


Рис. 5. Споживання вуглеводів середовища штамом *E. ashbyi* F340: □ – на початку культивування; ■ – в кінці культивування

Найбільш повно споживалися редуруючі вуглеводи глюкозо-пептонного середовища. На середовищі, яке містило сусло, хоч і було найбільше вуглеводів, проте вони були використані лише на 18 %.

Для визначення виходу біомаси з одиниці субстрату розраховано економічний коефіцієнт, який для гриба на середовищі Чапека–Докса становить 0,1; на середовищі ГПС – 0,17; на суслі – 0,62. Отже, найбільш економічно вигідним є вирощування *E. ashbyi* на середовищі, яке містить неохмелене пивне сусло.

Висновки

Досліджено морфологічні та культуральні особливості штаму *Eremothecium ashbyi* F340. Гриб створює пігментовані жовті і жовтогарячі колонії з високою здатністю до біосинтезу рибофлавіну та білі колонії – з низькою. На різних поживних середовищах штам має морфологічні відмінності.

Дослідженнями рівня накопичення рибофлавіну та біомаси аскоміцетом *Eremothecium ashbyi* F340 на різних поживних середовищах встановлено, що на середовищі, яке містить сусло, кількість рибофлавіну у 2,8 разу, а біомаси – у 2,5 разу більша, ніж на інших досліджених середовищах.

У подальшому даний штам буде досліджуватись з метою отримання рибофлавіну та, можливо, ефірної олії.

1. Kalingan A.E., Chung-Min Liao. Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Eremothecium ashbyi* NRRL 1363 // *Bioresource Technology*. – 2002. – **82**. – P. 219–224.
2. Shigemitsu Kimura, Susumu Tokumaru, Kazuhiko Kuge. *Eremothecium ashbyi* causes soybean yeast-spot and is associated with stink bug, *Riptortus clavatus* // *J. of General Plant Pathology*. – 2008. – **74**, N 4. – P. 275–280.
3. Поморцева Н.В. Перспективы получения витаминов и коферментов с помощью микроорганизмов (обзор) // *Химико-фармацевтический журнал*. – 1986. – № 8. – С. 965–974.
4. Яцишин В.Ю., Федорович Д.В., Сибирный А.А. Микробный синтез флавиновых нуклеотидов (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2009. – **45**, № 2. – С. 133–142.
5. Воробьева Л.И. Микробиологический синтез витаминов. – М.: Изд-во МГУ, 1982. – 168 с.
6. Pujari V., Chandra T.S. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyi* // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2000. – **23**, N 3. – P. 303–307.
7. Kalingan A.E., Krishnan M.R.V. Application of agro-industrial by-products for riboflavin production by *Eremothecium ashbyi* NRRL 1363 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1997. – **47**, N 3. – P. 226–230.
8. Бугорский П.С., Родов В.С., Носов А.М. Состав эфирного масла мицелиального гриба *Eremothecium ashbyi* // *Химия природных соединений*. – 1986. – № 6. – С. 790–791.

9. Семенова Е.Ф. Биосинтетическая активность и анти-микробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill. // Известия высших учеб. заведений. Поволжский регион. Мед. науки. – 2007. – № 4. – С. 45–50.
10. Бугорский П.С., Семенова Е.Ф., Родов В.С. Влияние ионов водорода, калия и натрия на продуктивность гриба *Eremothecium ashbyi* // Микробиологический журнал. – 1990. – 52, № 3. – С. 44–47.
11. Ainsworth J., Bisby's H. Dictionary of the Fungi / Ed. by P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David and J.A. Stalpers. – 9th ed. – SABI Bioscience, 2001. – 624 p.
12. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов: Учеб. пособие. – М.: Товарищество науч. изданий КМК, 2005. – 220 с.
13. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. центр "Академия", 2005. – 608 с.
14. Экспериментальная витаминология: Справ. руководство / Под ред. Ю.М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. – 552 с.
15. Фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1990. – XI изд., вып. 2. – 385с.
16. Гольщикова М.Г., Гришакова Е.В., Успенская В.Э. и др. О сохранении *Eremothecium ashbyii* в активном состоянии // Микробиология. – 1965. – 34, № 4. – С. 661–665.
17. Polichenco M. Influencia de diversos factores sobre *Eremothecium ashbyi* // Mycopathologia. – 1966. – 30, N 3-4. – P. 323-336.
18. Marlis Krneta-Jordi. Cytologische und physiologische Untersuchungen an *Eremothecium ashbyii* Guill. // Archives of Microbiology. – 1962. – 43, N 1. – P. 76–108.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
14 лютого 2011 року