

УДК 579.222.3+663.16

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

ДИНАМІКА РОСТУ І НАКОПИЧЕННЯ РИБОФЛАВІНУ АСКОМІЦЕТОМ *EREMOTHECIUM ASHBYI* GUILLIER.

The aim of the scientific research was to study the cultural and biochemical characteristics of *Eremothecium ashbyi*, primarily due to the dynamics of accumulation of riboflavin. The growth rates and the accumulation dynamics of riboflavin in the culture liquid and mycelium of ray fungus *Eremothecium ashbyi* F340, which is perspective object for receipt of riboflavin by biotechnological method were investigated. Examining the culture *E. ashbyi* F340 on the glucose-pepton medium a significant difference between the term of accumulation of riboflavin in the culture liquid (riboflavin content was determined spectrophotometrically at 450 nm) and the biomass of fungus (previously conducted release of riboflavin) were revealed. The growth mechanisms of the producer, which obey certain laws for periodic cultures: the culture passes the logarithmic phase of growth, the stationary growth phase and the die-away phase were investigated. It is established that the intensive growth of culture is caused by the pH descent of culture liquid, but the intensive accumulation of riboflavin is related to the pH ascent. Initially riboflavin accumulates into mycelium cells and only after reaching the constant level it begins to segregate in culture liquid.

Keywords: ascomycetes, *Eremothecium ashbyi*, riboflavin, cultivation, growth rates.

Вступ

Рибофлавін (вітамін В₂) є одним із найбільш поширених вітамінів. Він функціонує у двох коензимних формах, що являють собою його фосфорні ефіри: флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД), які є кофакторами для широкого кола ферментів метаболізму. Рибофлавін міститься в усіх тваринних і рослинних клітинах, але лише деякі продукти є багатими його джерелами. Вітамін В₂ синтезують більша частина вищих рослин і багато мікроорганізмів, включаючи бактерії, дріжджі та гриби. Тварини не здатні до самостійного синтезу рибофлавіну, і їх потреба в ньому задовольняється мікрофлорою шлунково-кишкового тракту та їжею. Дефіцит рибофлавіну призводить до цілої низки захворювань.

Відомо три способи промислового виробництва рибофлавіну: хімічним синтезом, мікробіологічним синтезом і змішаним синтезом, який включає мікробний синтез рибози з подальшою хімічною модифікацією її в рибофлавін. Найбільш широко застосовується хімічний синтез, проте останнім часом спостерігається витіснення хімічного синтезу вітаміну В₂ мікробіологічним через значну дешевизну.

Відомі біотехнологічні підприємства як продуценти для виробництва рибофлавіну широко використовують організми різних таксономічних груп, в основному дріжджі та міцеліальні гриби. Серед флавіногенних дріжджів застосовують *Candida famata* [1–3] і *Pichia guilliermondii* [4]. Серед міцеліальних грибів широко

використовують *Eremothecium gossypii* (синонім *Ashbya gossypii*) [1, 2] і *Eremothecium ashbyi* [5, 6], які проявляють здатність до суперсинтезу рибофлавіну. Також застосовують бактеріальні штами *Bacillus subtilis*, отримані генноінженерним способом [1, 2, 7].

Eremothecium ashbyi є одним із перспективних об'єктів для отримання рибофлавіну біотехнологічним методом. Він належить до групи грибів, що є паразитами рослин, розвивається на соєвих бобах, цитрусових і, переважно, на коробочках бавовнику та призводить до втрат урожаю у всьому світі [8, 9]. Інфекція розповсюджується комахами: через зроблені ними проколи гриби потрапляють у рослину.

У 1935 р. М.А. Гільєрмонд уперше виділив і описав гриб-паразит коробочок бавовнику, що утворював жовтий пігмент флавінової природи. Паразит був ідентифікований як *E. ashbyi*, та була показана здатність цього гриба до суперсинтезу рибофлавіну. Також він вирізняється своєю здатністю до синтезу ФАД. ФАД становить до 30% від загальної кількості флавінів у культурі *E. ashbyi* [10].

E. ashbyi належить до аскоміцетів, що не утворюють плодові тіла, має справжній дихотомічний розгалужений міцелій яскраво-жовтого кольору, який складається з багатоядерних клітин. Колір міцелію обумовлений наявністю рибофлавіну, який накопичується в такій кількості, що випадає у вигляді кристалів у вакуолях. На міцелії інтеркалярно (вставками по ходу гіфи) утворюються подовжені багатоспорові спорангії, які містять веретеноподібні спори [11–13].

Проте суттєвим недоліком цього гриба є те, що він нестабільний під час зберігання та культивування. На твердих середовищах за кімнатної, низької температури і навіть у процесі ліофілізації він легко втрачає свою здатність до суперсинтезу рибофлавіну [14]. Для підтримки *E. ashbyi* в активному стані необхідна постійна підтримуюча селекція, яка здійснюється систематичним пересівом на різні тверді поживні середовища з відбором інтенсивно забарвлених жовтих і жовтогарячих колоній.

E. ashbyi культивується на середовищах, які у своєму складі як джерела вуглецю містять моно- та дисахариди (переважно глюкозу та сахарозу), мелясу, гідрол або неохмелене пивне сусло, а як джерела азоту – пептон, дріжджовий екстракт або автолізат, кукурудзяний екстракт, соєве борошно. Для збільшення виходу рибофлавіну застосовують різноманітні підходи. Як джерело азоту запропоновано використовувати деякі недорогі відходи, які не є їстівними – це макуха кунжутного й арахісового насіння після відділення олії [5, 15, 16]. Як стимулятори флавіногенезу застосовують додаткові компоненти, наприклад недорогі органічні відходи – м'ясний екстракт, кров'яне та рибне борошно [5, 6, 15, 16]. Для визначення оптимального рівня поживних компонентів середовища використані статистичні методи, які дають можливість збільшити вихід рибофлавіну під час його виробництва [16].

Постановка задачі

Практичне втілення біотехнології отримання рибофлавіну потребує розширення фундаментальних знань про біологічні властивості продуцента. Як відомо, частина рибофлавіну, який синтезується продуцентом *E. ashbyi*, накопичується у вакуолях гриба у вигляді кристалів, а частина виділяється в культуральну рідину, тому важливо встановити співвідношення накопичення внутрішньоклітинного та позаклітинного рибофлавіну в процесі культивування, динаміку росту продуценту та рівня накопичення рибофлавіну. Отже, метою роботи є дослідження рівня накопичення біомаси та рибофлавіну аскоміцетом *E. ashbyi* F340 в умовах глибинного культивування.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження був *Eremothecium ashbyi* *Guilliermond* F340, отриманий із Всеро-

сійської колекції промислових мікроорганізмів (таксономічне положення: царство *Fungi*, відділ *Ascomycota*, клас *Hemiascomycetes*, порядок *Saccharomycetales*, родина *Spermophthoraceae* [17, 18]). За сучасними даними, відповідно до міжнародної бази систематики грибів *SABI Bioscience* та бази даних *CBS Database of Fungal Names*, цей гриб віднесений до *Eremotheciaceae*, *Saccharomycetales*, *Saccharomycetidae*, *Saccharomycetes*, *Saccharomycotina*, *Ascomycota*, *Fungi* [19].

Штам гриба зберігали за кімнатної температури на скошеному агаризованому глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) складу (%): дріжджовий екстракт – 0,5; пептон – 0,3; глюкоза – 1,0; агар – 2,0, та на соєвому середовищі складу (%): соєве борошно – 4,0, сахароза – 1,0, агар – 2,0.

Глибинне культивування *E. ashbyi* на рідкому поживному глюкозо-пептонному середовищі здійснювали при 28 °C протягом 7 діб у конічних колбах з 50 мл середовища в умовах постійного перемішування на орбітальній качалці зі швидкістю 150 об./хв. Середовища у колбах інокулювались попередньо отриманою глибинною культурою в кількості 5 %. Проби культуральної рідини відбирали кожну добу та досліджували зміну рН, рівень накопичення біомаси і рибофлавіну в культуральній рідині (позаклітинний рибофлавін) та у висушеній біомасі (внутрішньоклітинний рибофлавін).

Кількість біомаси визначали ваговим методом після її відділення від культуральної рідини фільтруванням та висушуванням до сталої маси при 105 °C [20].

Вміст рибофлавіну в культуральній рідині визначали спектрофотометрично при $\lambda = 450$ нм після попереднього гідролізу ФАД до ФМН протягом 12 год у 10 % ТХО [21, 22].

Для визначення кількості внутрішньоклітинного рибофлавіну висушений міцелій разом із фільтрувальним папером подрібнювали на невеликі шматки та поміщали в колби з 0,02 N HCl, автоклаували при 121 °C протягом 20 хв і потім центрифугували при 3000 об./хв. Вміст рибофлавіну визначали, як описано вище [23].

Результати і їх обговорення

Однією з найважливіших характеристик культури є динаміка накопичення біомаси та певних цільових метаболітів. Для культури *E. ashbyi* це динаміка накопичення рибофлавіну в культуральній рідині. Отримані результати подані на рис. 1.

Динаміка накопичення біомаси культурою *E. ashbyi* під час культивування в рідкому живильному середовищі підкоряється відомим закономірностям для періодичних культур: штам розвивається експоненціально (логарифмічна фаза росту) до 2-ї доби та досягає 1,8 г сухої біомаси на 1 л культуральної рідини, протягом наступної доби спостерігається уповільнення швидкості росту, яке характерне для переходу до стаціонарної фази росту. Максимальне накопичення біомаси становить 2,19 г на 1 л культуральної рідини, і після 5-ї доби культивування починається фаза відмирання – початок автолізу культури.

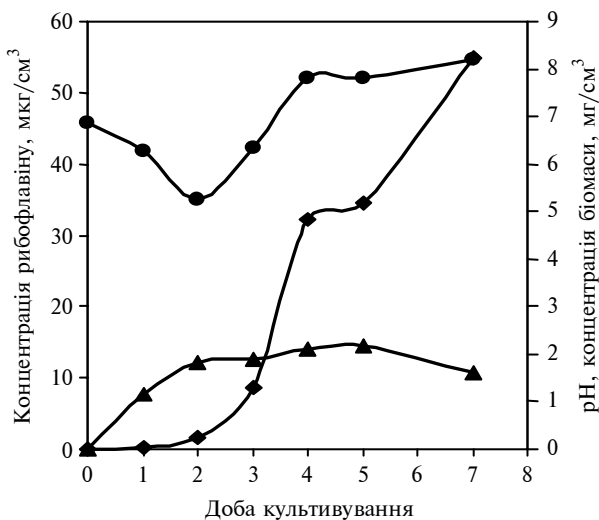


Рис. 1. Динаміка росту і накопичення рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F340 та зміна рН культуральної рідини в процесі культивування: ◆ – рибофлавін, ▲ – біомаса, ● – рН

У період інтенсивного росту спостерігається закислення культуральної рідини з початкового рН 6,86 до рН 5,24. Під час переходу в стаціонарну фазу росту та під час цієї фази рН збільшується до 7,8. У фазі автолізу рН ще трохи збільшується до 8,1.

Синтез і накопичення рибофлавіну починається у фазі стаціонарного росту з 2-ї доби культивування та інтенсивно збільшується до 32–34 мкг/см³. Це накопичення рибофлавіну корелює зі збільшенням рН культуральної рідини. Накопичення рибофлавіну припиняється із зупинкою зміни рН. На 4-5-ту добу культивування збільшення кількості рибофлавіну майже не спостерігається. Подальше накопичення рибофлавіну в культуральній рідині пов'язане з переходом культури у фазу автолізу. Кількість рибофлавіну в культуральній

рідині різко збільшується на 36 % і досягає 55 мкг/см³. Отримані дані підтверджуються даними інших авторів [11, 13].

При дослідженні динаміки накопичення рибофлавіну важливою є не тільки кількість рибофлавіну, що міститься в культуральній рідині, а й та кількість рибофлавіну, що залишається в клітинах міцелію продуцента. Результати дослідження подані на рис. 2.

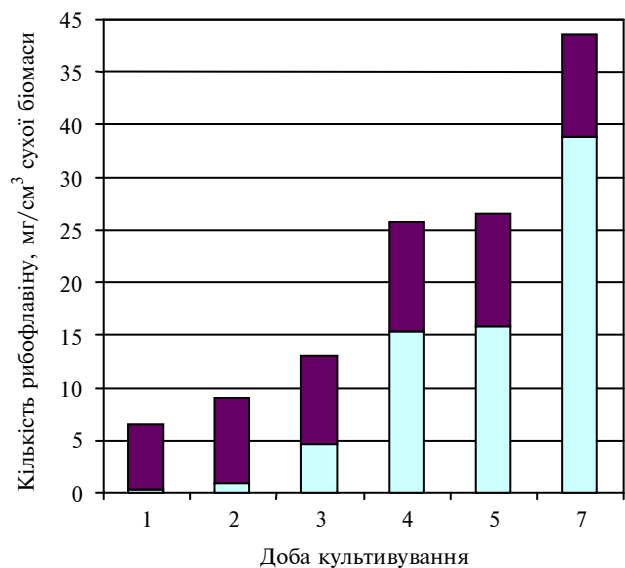


Рис. 2. Динаміка накопичення рибофлавіну штамом *E. Ashbyi* F340: ■ – кількість рибофлавіну в біомасі, □ – кількість рибофлавіну в культуральній рідині

В експоненціальній фазі росту рибофлавін починає накопичуватися в біомасі і протягом перших двох діб майже не виділяється в культуральну рідину. Рівень накопичення рибофлавіну становить 6,3–8,1 мг/г сухої біомаси. Надалі рівень рибофлавіну в міцелії збільшується до 10,4–10,7 мг/г сухої біомаси і залишається на такому рівні до кінця культивування, майже не змінюючись навіть у фазі відмирання. Динаміка накопичення рибофлавіну в культуральній рідині в перерахунку на висушену біомасу не відрізняється від даних, наведених на рис. 1. У стаціонарній фазі рівень накопичення рибофлавіну становить 15,4–15,8 мг/г сухої біомаси. На 7-му добу культивування, коли культура перебуває у фазі автолізу, кількість рибофлавіну збільшується на 53 % і становить 33,8 мг/г сухої біомаси.

Сумарний рівень накопичення рибофлавіну одночасно в культуральній рідині та в міцелії у стаціонарній фазі росту становить 25,8–26,6 мг/г сухої біомаси, а у фазі відмирання на

39 % більше: 43,6 мг/г сухої біомаси. Проте характерною особливістю вирощування штаму *E. ashbyi* F340 є накопичення певного рівня рибофлавіну в міцелії культури, який залишається на незмінному рівні протягом усього процесу культивування.

Висновки

При дослідженні динаміки росту штаму *E. ashbyi* F340 у глибинній культурі встановлено, що динаміка накопичення біомаси підкоряється відомим закономірностям для періодичних культур. Фаза експоненціального росту триває протягом 2 діб, потім спостерігається уповільнення росту та перехід культури у стаціонарну фазу росту, яка триває до 5-ї доби культивування, після чого культура переходить у фазу відмирання або автолізу.

Список літератури

1. K.P. Stahmann et al., "Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 53, no. 5, pp. 509–516, 2000.
2. S.H. Lim et al., "Microbial Production of Riboflavin Using Riboflavin Overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famata*: An Overview", *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 6, pp. 75–88, 2001.
3. Конструювання надпродуцентів рибофлавіну (вітаміну B2) дріжджів *Candida famata* / К.В. Дмитрук, В.Ю. Ячишин, А.Я. Вороновський та ін. // Наука та інновації. – 2009. – 5, № 6. – С. 70–74.
4. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М. Сверхсинтез флавинов у дрожжей // Укр. биохим. журнал. – 1985. – 57, № 4. – С. 98–112.
5. A.E. Kalingan and L. Chung-Min, "Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Eremothecium ashbyi* NRRL 1363", *Bioresource Technol.*, vol. 82, pp. 219–224, 2002.
6. A.E. Kalingan and M.R.V. Krishnan, "Application of agro-industrial by-products for riboflavin production by *Eremothecium ashbyi* NRRL 1363", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 47, no. 3, pp. 226–230, 1997.
7. Wu Qiu-Li et al., "Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs", *Ibid.*, vol. 76, no. 4, pp. 783–794, 2007.
8. Shigemitsu Kimura et al., "*Eremothecium ashbyi* causes soybean yeast-spot and is associated with stink bug, *Riptortus clavatus*", *J. General Plant Pathology*, vol. 74, no. 4, pp. 275–280, 2008.
9. Shigemitsu Kimura et al., "*Eremothecium coryli* and *E. ashbyi* cause yeast spot of azuki bean," *Ibid.*, vol. 75, pp. 322–324, 2009.
10. Поморцева Н.В. Перспективы получения витаминов и коферментов с помощью микроорганизмов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 1986. – № 8. – С. 965–974.
11. Семенова Е.Ф. Биосинтетическая активность и антимикробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill. // Известия высших учеб. заведений. Поволжский регион. Мед. науки. – 2007. – № 4. – С. 45–50.
12. Поліщук В.Ю., Маланюк М.І., Дуган О.М. Морфолого-культуральні і біосинтетичні властивості *Eremothecium ashbyii* Guill // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2011. – № 3. – С. 74–78.
13. Семенова Е.Ф., Шпичка А.И., Мусеева И.Я. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические особенности видов рода *Eremothecium* S.F. Ashby et W. Nowell // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 6. – С. 210–214.
14. О сохранении *Eremothecium ashbyii* в активном состоянии / М.Г. Гольшева, Е.В. Гришаква, В.Э. Успенская и др. // Микробиология. – 1965. – 34, № 4. – С. 661–665.
15. A.E. Kalingan, "The kinetics of riboflavin secretion by *Eremothecium ashbyii* nrrl 1363", *Bioproc. Biosyst. Eng.*, vol. 18, no. 6, pp. 445–449, 1998.
16. V. Pujari and T.S. Chandra, "Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyi*", *Ibid.*, vol. 23, no. 3, pp. 303–307, 2000.

17. *J. Ainsworth and H. Bisby's, Dictionary of the Fungi*, P.M. Kirk et al., Eds., 9th ed., CABI Bioscience, 2001, 624 p.
18. *Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов: Учеб. пособие.* – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 220 с.
19. *База даних CBS Database of Fungal Names [Електронний ресурс].* – Режим доступу: <http://www.indexfungorum.org>.
20. *Методы экспериментальной микологии: Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др.* – К.: Наук. думка, 1982. – 562 с.
21. *Экспериментальная витаминология: Справ. руководство / Под ред. Ю.М. Островского.* – Минск: Наука и техника, 1979. – 552 с.
22. *Шпичка А.И., Семенова Е.Ф., Кузнецова А.В.* К вопросу определения рибофлавина в биотехнологическом сырье // *Современные проблемы науки и образования.* – 2011. – № 1. – С. 30–32.
23. *V. Pujari and T.S. Chandra*, “Physio-morphological changes in a riboflavin producer *Eremotecium ashbyii* DT1 and UV mutants in submerged fermentation,” *J. Microbiol. Biotechnol*, vol. 11, no. 4, pp. 552–557, 2001.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
4 березня 2014 року