УДК 663.16+579.222.3

В.Ю. Поліщук, М.І. Маланюк, О.Я. Карпенко*, О.М. Дуган
Національний технічний університет України "КПІ",
кафедра промислової біотехнології
*Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ МІЦЕЛІЮ *EREMOTHECIUM ASHBYI* GUILL

© Поліщук В.Ю., Маланюк М.І., Карпенко О.Я., Дуган О.М., 2012

Досліджено вплив температури на ріст та збереження життєдіяльності міцелію аскоміцету *Eremothecium ashbyi F340*, який є перспективним об'єктом для отримання рибофлавіну біотехнологічним методом. Встановлено нижню та верхню граничні температури культивування, які дорівнюють відповідно 4 та 38°С. Встановлено час, протягом якого міцелій *E.ashbyi* зберігає свою життєдіяльність за дії температур, вищих за верхню граничну температуру. Досліджено умови для зберігання культури в активному стані.

Ключові слова: аскоміцет, *Eremothecium ashbyi*, рибофлавін, культивування, температура, зберігання.

It was investigated the temperature influence on a growth and preservation of mycelium vital activity of ray fungus *Eremothecium ashbyi F340*, which is perspective object for receipt of riboflavin by biotechnological method. The cultivation temperature maximum and minimum were established and equal accordingly 4 and 38˚С. It was established the time of preservation of vital activity of *E. ashbyi* under impact of higher than maximum temperature. It was investigated the conditions of storage of the culture in active statement.

Keywords: ascomycetes, *Eremothecium ashbyi*, riboflavin, cultivation, temperature, storage.

Вступ

Рибофлавін є одним з найважливіших ростових факторів людини і тварин. Достатня забезпеченість продуктів харчування вітаміном B_2 є важливою передумовою росту тварин та птахів. Дефіцит рибофлавіну призводить до низки захворювань. Протягом тривалого часу рибофлавін синтезують хімічним шляхом, але останнім часом спостерігається заміщення хімічного синтезу вітаміну B_2 біотехнологічним.

Як біооб'єкти для біотехнологічного виробництва рибофлавіну сьогодні широко використовують організми різних таксономічних груп, переважно дріжджі та міцеліальні гриби. Серед флавіногенних дріжджів це *Candida famata* [1, 2, 3] (використовується американською біотехнологічною фірмою Archer Daniels Midland) та *Pichia guilliermondii* [4]. Серед міцеліальних грибів широко використовуються *Eremothecium gossypii* (синонім *Ashbya gossypii*) (німецька фірма BASF) [1, 2] та *Eremothecium ashbyi* [5, 6]. Також застосовують генно-інженерні штами бактерії *Bacillus subtilis* [1, 2, 7].

Одним з перспективних об'єктів для отримання рибофлавіну біотехнологічним шляхом є *Eremothecium ashbyi*, який належить до групи грибів, що є паразитами рослин. Він розвиваються на соєвих бобах та переважно на коробочках бавовнику, викликаючи пошкодження, що називаються «стигматомікозами» [8, 9]. Інфекцію поширюють комахи – через зроблені ними проколи гриби потрапляють у рослину. Вперше *E.ashbyi* виявив у 1935 році M.A. Guilliermond, який показав здатність цього гриба до суперсинтезу рибофлавіну. Також цей гриб вирізняється своєю здатністю до синтезу флавінаденіндинуклеотиду. ФАД становить до 30 % від загальної кількості флавінів у культурі *E.ashbyi* [10].

Ще однією особливістю *E.ashbyi* є його здатність до синтезу ефірної олії, яка містить гераніол, який застосовується в парфумерній промисловості. В ефірній олії, що синтезується, також

ідентифікуються β-фенілетанол, нерол, цитронерол, нераль та гераніаль, що свідчить про схожість з ефірною олією з квітів троянди [11–13]. Це дає змогу розглядати цей гриб ще й як нетрадиційне джерело отримання натуральних ароматичних речовин.

E.ashbyi належить до аскоміцетів, що не утворюють плодових тіл, мають дихотомічний розгалужений міцелій яскраво-жовтого кольору, який складається з багатоядерних клітин. Колір міцелію обумовлений присутністю рибофлавіну, який накопичується в такій кількості, що випадає у вигляді кристалів в вакуолях. На міцелії інтеркалярно (вставочно по ходу гіфи) утворюються подовжені багатоспорові спорангії, які містять веретеноподібні спори.

Проте цей гриб має значний недолік – він нестабільний під час зберігання та культивування. На твердих середовищах при кімнатній, низькій температурі і навіть в процесі ліофілізації він легко втрачає свою здатність до суперсинтезу рибофлавіну.

Мета роботи

Практичне втілення біотехнології отримання рибофлавіну потребує розширення фундаментальних знань про біологічні властивості продуцента. Температурні межі, максимум та оптимум росту є вагомими фізіологічними характеристиками культури, які мають велике значення для реалізації процесу культивування. Тому метою дослідження було встановлення впливу температури на життєздатність міцелію *E.ashbyi F340*.

Матеріали та методи

Об’єктом дослідження був *Eremothecium ashbyi Guilliermond 1935*, отриманий із Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів (таксономічне положення: царство *Fungi*, відділ *Ascomycota*, клас *Hemiascomycetes*, порядок *Saccharomycetales*, родина *Spermophthoraceae* [14, 15]). За сучасними даними, відповідно до міжнародної бази систематики грибів CABI Bioscience та бази даних CBS Database of Fungal Names, цей гриб віднесений до *Eremotheciaceae, Saccharomycetales, Saccharomycetidae, Saccharomycetes, Saccharomycotina, Ascomycota, Fungi* [16].

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

Для перевірки життєздатності культури за різних температур та встановлення верхньої граничної температури штам інкубували в чашках Петрі з ГПС при таких значеннях температури: 4, 20, 35, 36, 37, 38, 39, 45°С. Після третьої доби інкубації враховувалась наявність чи відсутність росту культури. За відсутності росту за досліджуваної температури надалі інкубація відбувалася за температури 28°С для перевірки збереження життєздатності.

Культивування в рідкому поживному глюкозо-пептонному середовищі здійснювали при 28ºС протягом 7 діб у конічних колбах з 50 мл середовища на качалці зі швидкістю 150 об/хв. Для виявлення температури, за якої посівний матеріал зберігає життєдіяльність, колби з *E.ashbyi* розташовувалися у термостаті при, 35, 36, 37, 39, 45 та 60°С та витримувалися там протягом 1, 3, 4, 6 та 24 годин. Також посівний матеріал піддавався заморожуванню при -20°С. Для перевірки життєздатності витримані культури висівалися газоном в чашки Петрі з агаризованим ГПС та культивувалися при 28°С. Ріст культури враховувався на 3 та 6 добу культивування.

З метою дослідження впливу температури на зберігання активності культури, *E.ashbyi* зберігався при температурі 4 та 20°С у пробірках в агаризованих глюкозо-пептонному і соєвому середовищах та в рідкому ГПС протягом місяця. Частину пробірок з ГПС зберігали під шаром вазелінового масла. Через місяць культура висівалася у колби ємністю 100 мл з 50 мл рідкого ГПС, культивування здійснювалося на качалці протягом 7 діб при 28°С та 150 об/хв. Досліджувався рівень накопичення біомаси та рибофлавіну у двох послідовних пасажах.

Кількість біомаси визначали ваговим методом після її відділення від культуральної рідини та висушування до сталої маси при 105ºС. Вміст рибофлавіну визначався спектрофотометрично при λ = 450 нм після попереднього кип’ятіння культуральної рідини з біомасою протягом 30 хв і гідролізу ФАД до ФМН протягом 12 год у 10 % ТХО [17, 18].

Результати та їх обговорення

Під час зберігання та культивування штаму-продуценту температура є одним з найважливіших факторів, від яких залежить біосинтетична здатність культури. Верхня і нижня граничні температури інкубації для культур грибів – це температури, за яких ріст міцелію не спостерігається, але зберігається його життєздатність і при перенесенні міцелію в сприятливіші температурні умови його ріст відновлюється.

При дослідженні росту та життєздатності штаму *E. ashbyi* при температурах 4°С, 20°С, 28°С (контроль), 37°С, 45°С на агаризованому ГПС показано відсутність росту культури при температурі 4°С і нижче та при 39°С і вище (табл. 1). При 28°С на 3 добу інкубації спостерігається ріст культури – з'являються жовті колонії округлої форми, незначне забарвлення субстрату у жовтий колір. При 20, 36 та 37°С на 3 добу інкубації спостерігаються дрібні білі колонії. Для дослідних зразків, що інкубувалися при 4°С, спостерігається відновлення життєдіяльності культури при перенесенні міцелію в сприятливі умови (підвищення температури інкубації до 28°С). А от для дослідних зразків, що інкубувалися при 39°С, відновлення життєдіяльності не відбувається.

Таблиця 2

Життєздатність міцелію при різних температурах інкубації.

Температура інкубації, °С	Наявність росту на 3 добу	Відновлення росту при 28°С
4	–	+++
20	+	+++
28	++	+++
35	++	+++
36	++	+++
37	+	+++
38	+	++
39	–	–
45	–	–

Примітка:
– відсутність росту;
+ незначний ріст, колонії дрібні білого кольору;
++ гарний ріст, колонії блідо-жовті, незначна пігментація середовища у жовтий колір навколо колоній;
+++ інтенсивний ріст, колонії яскраво жовтого кольору, середовище забарвлене у жовтий колір.

Отже, значення нижньої граничної температури для *E.ashbyi* становить 4°С. Верхня гранична температура дорівнює 38°С. Треба зазначити, що при цій температурі ще спостерігається незначний ріст гриба, а вже при 39°С ріст міцелію не спостерігається та відновлення росту не відбувається.

Відомо, що відсутність росту при високих температурах може бути зумовлена руйнуванням діяльності ферментів, зниженням коефіцієнта дихання, посиленням гідролітичних процесів у клітинах, отруєнням протоплазми шкідливими продуктами розпаду, зокрема аміаком [19].

При дослідженні впливу температур на посівний матеріал *E.ashbyi*, отриманий глибинним способом, встановлено, що культура не витримує заморожування при -20°С з подальшим розморожуванням та тривале нагрівання до 45°С (табл. 2). Експериментальні данні, отримані при 28, 35 та 37°С, повністю збігаються з даними попередніх дослідів.

Цікаво було дослідити, як вплинуть на виживання посівного матеріалу температури, які знаходяться вище верхньої граничної температури росту. Встановлено, що при нагріванні посівного матеріалу до 39°С та витримуванні за цієї температури протягом 1–6 годин та при нагріванні до 45°С протягом 1–3 годин та подальшому посіві на агаризоване ГПС життєдіяльність культури зберігається. За тривалішого витримування культури при високих температурах життєдіяльність культури зменшується, а за витримування протягом 24 годин культура повністю втрачає життєздатність.

Наступним етапом дослідження було встановлення впливу температури на збереження культури *E.ashbyi* в активному стані, який оцінювали за рівнем накопичення рибофлавіну та біомаси при пересіві з середовищ, на яких культура зберігалася, на рідке глюкозо-пептонне середовище. Отримані результати стосовно рівня накопичення рибофлавіну та біомаси наведено на рис. 1 та 2.

Таблиця 2

Виживання культури *E.ashbyi* після витримування посівного матеріалу за різних температур

Температура прогрівання, °С	Час витримування, год	Наявність росту на 3 добу	Наявність росту на 6 добу
-20	24	–	–
28 (контроль)	24	++	+++
35	24	++	+++
37	24	+	+++
39	1	++	+++
	3	+	+++
	4	+	++
	6	+	++
	24	–	–
45	1	++	+++
	3	+	+++
	4	–	+
	6	–	+
	24	–	–

Примітка:
– відсутність росту;
+ незначний ріст, колонії дрібні білого кольору;
++ гарний ріст, колонії блідо-жовті;
+++ інтенсивний ріст, колонії яскраво жовтого кольору, середовище забарвлене у жовтий колір.

З результатів попередніх досліджень відомо, що культура *E.ashbyi* при регулярних пересівах здатна накопичувати до 40–45 мкг/см^3 рибофлавіну [20]. Встановлено, що найкращими умовами для збереження штаму в активному стані є збереження під шаром вазелінового масла, причому температура мала дуже незначний вплив. За цих умов рівень накопичення рибофлавіну залишається стабільним і становить 42 та 45 мкг/см^3 при 20°С та 5°С відповідно. Також спостерігається значне накопичення біомаси.

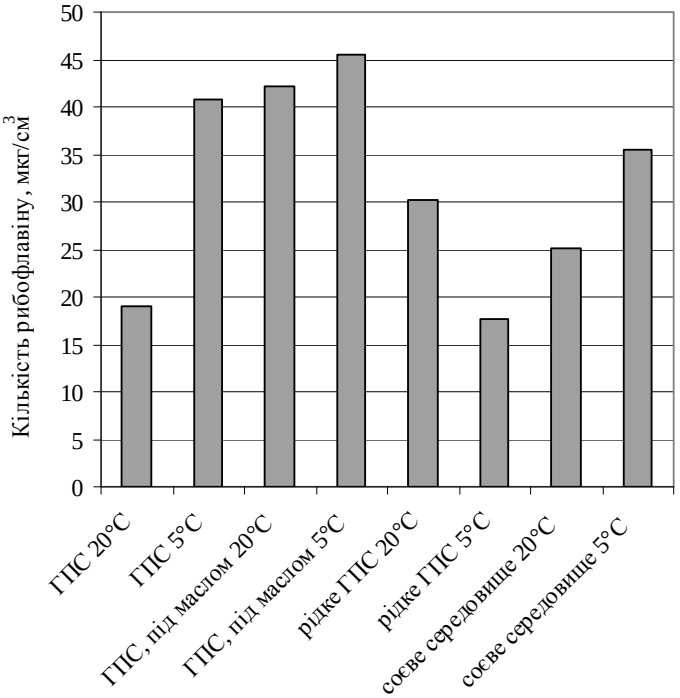

Рис. 1. Накопичення рибофлавіну штамом E.ashbyi F340, що зберігався протягом місяця за різних умов та на різних поживних середовищах

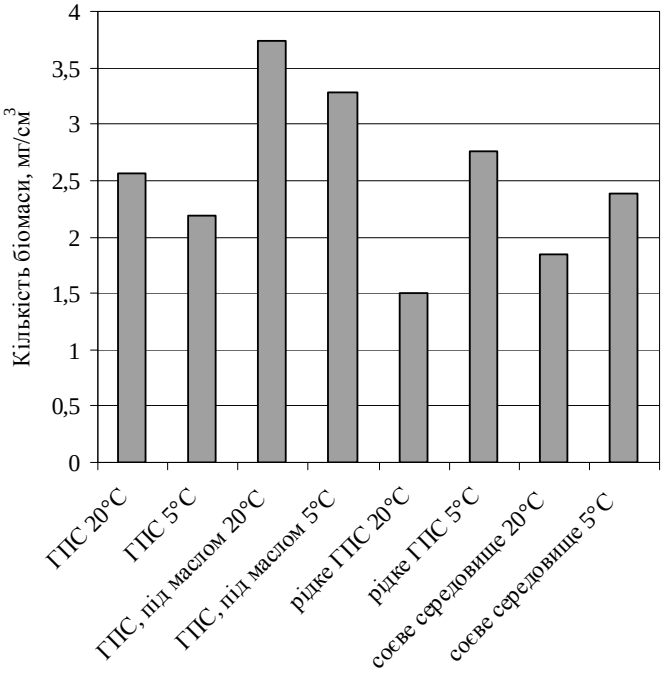

Рис. 2. Накопичення біомаси штамом E.ashbyi F340, що зберігався протягом місяця за різних умов та на різних поживних середовищах

Рівень накопичення рибофлавіну на агаризованих середовищах (ГПС та соєвому) вищий у разі зберігання культури при 5°С, а от при 20°С краще рибофлавін накопичується у разі зберігання культури на рідкому поживному середовищі.

Цікаво було встановити, чи буде спостерігатися така сама тенденція при наступному (другому) пасажі культури. У колби з рідким ГПС було внесено 5 % посівного матеріалу, яким слугувала культура першого пасажу. Отримані результати значно відрізняються від попередніх. Рівень накопичення рибофлавіну практично вирівнявся і становив від 11 до 18 мкг/см^3, що на 58–74 % нижче звичайного рівня. Проте значно зріс рівень накопичення біомаси – в середньому на 20–30 %. Зниження кількості рибофлавіну із збільшенням кількості біомаси пояснюється тісним зв'язком біосинтезу флавінів з обміном пуринів [21]. Активізація ростових процесів, пов'язаних з підсиленням синтезу нуклеїнових кислот, призводить до послаблення флавіногенезу. Можливо, для стабільного рівня накопичення рибофлавіну не вистачило проміжного етапу вирощування культури *E.ashbyi* на агаризованому поживному середовищі, як це описано у [22].

Висновки

Досліджено вплив температури на життєдіяльність міцелію аскоміцету *Eremothecium ashbyi F340*, що є суперпродуцентом рибофлавіну.

Встановлено, що нижня гранична температура для *E.ashbyi* становить 4°С. Верхня гранична температура дорівнює 38°С – за цієї температури ще спостерігається незначний ріст гриба, а вже при 39°С росту міцелію не спостерігається та відновлення росту при 28°С не відбувається.

Встановлено, що культура *E.ashbyi* зберігає свою життєздатність за нагрівання до 39°С та витримування за цієї температури протягом 6 годин, а за температури 45°С культура зберігає життєдіяльність протягом 3 годин.

Показано, що найбільш підходящими умовами для зберігання культури *E.ashbyi* в активному стані є зберігання під шаром вазелінового масла у холодильнику чи за кімнатної температури. Короткотривале зберігання краще здійснювати у холодильнику в агаризованому глюкозо-пептонному середовищі.

1. Stahmann K.P., Revuelta J.L., Seulberger H. Three biotechnical processes using Ashbya gossypii, Candida famata, or Bacillus subtilis compete with chemical riboflavin production // Appl. Microbiol. and

Biotechnol. – 2000. – Vol. 53, № 5 – P. 509–516. 2. Lim S.H., Choi J.S., Park E.Y. Microbial Production of Riboflavin Using Riboflavin Overproducers, Ashbya gossypii, Bacillus subtilis, and Candida famata: An Overview // Biotechnol. Bioprocess Eng. – 2001. – Vol. 6. – P. 75–88. 3. Дмитрук К.В., Ячишин В.Ю., Вороновський А.Я., Федорович Д.В., Сибірний А.А. Конструювання надпродуцентів рибофлавіну (вітаміну В2) дріжджів Candida famata // Наука та інновації. – 2009. – Т. 5. – № 6. – С. 70–74. 4. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М. Сверхсинтез флавинов у дрожжей.// Укр. биохим. журнал. – 1985. – Т. 57. № 4. – С. 98–112. 5. 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. – Vol. 82. – P. 219–224. 6. 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. – Vol. 47, № 3. – P. 226–230. 7. Qiu-Li Wu, Tao Chen, Yu Gan, Xun Chen and Xue-Ming Zhao Optimization of riboflavin production by recombinant Bacillus subtilis RH44 using statistical designs // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Vol. 76, № 4. – P. 783-794. 8. Shigemitsu Kimura, Susumu Tokumaru and Kazuhiko Kuge Eremothecium ashbyi causes soybean yeast-spot and is associated with stink bug, Riptortus clavatus // Journal of General Plant Pathology. – 2008. – Vol. 74, № 4. – P. 275–280. 9. Shigemitsu Kimura, Susumu Tokumaru and Kazuhiko Kuge Eremothecium coryli and E. ashbyi cause yeast spot of azuki bean // Journal of General Plant Pathology. – 2009. – Vol. 75. – P. 322–324. 10. Поморцева Н.В. Перспективы получения витаминов и коферментов с помощью микроорганизмов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 1986. – № 8. – С. 965–974. 11. Бугорский П.С., Родов В.С., Носов А.М. Состав эфирного масла мицелиального гриба Eremothecium ashbyi // Химия природных соединений. – 1986. – №6. – С. 790–791. 12. Миронов В.А., Цибульская М.И., Янотовский М.Ц. Образование монотерпенов аскоміцетом Eremotecium ashbyii // Прикладная биохимия и микробиология. – 1982. – Т. 18, № 3. – С. 343-345. 13. Семенова Е.Ф., Шпичка А.И., Моисеева И.Я. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические особенности видов рода Eremotecium S.F.Ashby et W.Nowell // Фундаментальные исследования. – 2011. – №6. – С. 210–214. 14. 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. – CABI Bioscience, 2001. – 624 p. 15. 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. 16. База даних CBS Database of Fungal Names. – http://www.indexfungorum.org 17. Экспериментальная витаминология: Справочное руководство / Под ред. Ю.М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. – 552 с. 18. 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. 19. Краткий справочник по физиологии растений / А.М. Гродзинский, Д.М. Гродзинский. – К.: Наук. думка, 1973. – 592 с. 20. Поліщук В.Ю., Маланюк М.І., Дуган О.М. Морфолого-культуральні і біосинтетичні властивості Eremotecium ashbyii Guill // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2011. – № 3. – С.74–78. 21. Миронов В.А., Цибульская М.И., Либер Л.И. Влияние фосфата на рост гриба Eremotecium ashbyii и біосинтез флавинов // Микробиологическая промышленность. – 1970. – № 1. – С.33–35. 22. Голышева М.Г., Гришакова Е.В., Успенская В.Э. и др. О сохранении Eremothecium ashbyii в активном состоянии // Микробиология. – 1965. – Т. 34, № 4. – С. 661–665.