

## Вплив умов отримання посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi*

В. Ю. Поліщук\*, О. М. Дуган

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

\*Corresponding author. E-mail: polischukvu@gmail.com

Paper received 21.06.17; Accepted for publication 28.06.17.

**Анотація.** Досліджено зміну біосинтетичної здатності аскоміцета *Eremothecium ashbyi* за двома показниками: накопичення рибофлавіну та біомаси. У зв'язку зі зниженням рівня біосинтезу вітаміну В<sub>2</sub> запропоновано використання ультрафіолетового опромінення міцелію для підвищення біосинтетичної здатності. Встановлено вік та кількість посівного матеріалу, що вноситься у ферментаційне середовище, які відповідають найбільшому накопиченню рибофлавіну та біомаси.

**Ключові слова:** рибофлавін, *Eremothecium ashbyi*, посівний матеріал, біомаса, вік інокуляту.

**Вступ.** *Eremothecium ashbyi*, виділений Guilliermond M.A. у 1935 році з коробочок бавовнику, на яких він паразитує, є одним з відомих продуцентів рибофлавіну, який використовується у промисловості для біотехнологічного отримання вітаміну В<sub>2</sub>. *E. ashbyi* здатен до понадсинтезу рибофлавіну, який є одним із найважливіших ростових факторів людини і тварин. Флавонопротеїни грають важливу роль у метаболізмі клітини. Активними групами більшості флавопротеїнів є нековалентно зв'язані флавінові кофактори – флавінмононуклеотид (ФМН) та флавінаденіндинуклеотид (ФАД). *E. ashbyi*, один з небагатьох продуцентів, здатен накопичувати до 30% ФАД від загальної кількості флавінів, що синтезуються. За допомогою *E. ashbyi* можна отримувати як кормовий рибофлавін, так і, при застосуванні певних методів виділення та очистки, рибофлавін медичного призначення.

**Короткий огляд публікацій за темою.** При здійсненні глибинного культивування стан інокуляту має велике значення для синтезу і накопичення біологічно-активних речовин. Зазвичай для засіву виробничого середовища при глибинному способі культивування посівний матеріал готують також глибинним способом. Етапи отримання посівної культури наступні: 1) оновлення вихідної культури на агаризованому середовищі; 2) вирощування культури на рідкому середовищі в колбах на калці; 3) культивування продуцента в інокуляторі. Посівна доза при засіві глибинною культурою зазвичай порівняно велика - від 1 до 25%. Для продуценту *E. ashbyi* у публікаціях наводяться суперечливі дані.

Так, у роботі [1] було показано, що для досягнення максимальної продуктивності *E. ashbyi* Guilliermond 1935 по рибофлавіну засів ферментаційного поживного середовища повинен проводитися свіжепророслими спорами гриба. У роботі [2] зазначається, що біосинтез рибофлавіну однаково протікає на ферментаційному середовищі, засіяному 1-3 добовою культурою продуценту. Рекомендована кількість посівного матеріалу, що вноситься у поживне середовище, становить 0,75 – 2% [3]. Проте сучасні автори у своїх дослідженнях використовують великі об'єми посівного матеріалу: найчастіше 5 [4] та 10 % [5]. Крім дослідження впливу якості посівного матеріалу на біосинтез рибофлавіну, досліджувався вплив стану посівного матеріалу на утворення компонентів ефірної олії, що продукується *E. ashbyi* [6].

**Мета.** Дослідити умови отримання посівного матеріалу *Eremothecium ashbyi* Guilliermond F-340 в активному стані, які б забезпечували найвищу біосинтетичну здатність штаму-продуценту.

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження був *Eremothecium ashbyi* Guilliermond F-340, отриманий з Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів (таксономічне положення відповідно до міжнародної бази систематики грибів SABI Bioscience та бази даних CBS Database of Fungal Names, даний гриб віднесений до *Eremotheciaceae*, *Saccharomycetales*, *Saccharomycetidae*, *Eremothecium*, *Saccharomycetes*, *Saccharomycotina*, *Ascomycota*, *Fungi* [7]).

Штам гриба зберігали при кімнатній температурі на скошеному агаризованому глюкозо-пептонно-дріжджовому (ГПД) середовищі складу (у %): глюкоза – 1,0; пептон – 0,3; дріжджовий екстракт – 0,5; агар – 2,0.

Глибинне культивування *E. ashbyi* на рідкому ГПД середовищі здійснювали при 28°C протягом 6 діб у конічних колбах з 50 мл середовища в умовах постійного перемішування на орбітальній качалці зі швидкістю 180 обертів/хв. Середовища у колбах інокулювались попередньо отриманою на рідкому ГПД середовищі культурою різного віку та у різній кількості.

Кількість біомаси визначали ваговим методом після її відділення від культуральної рідини фільтруванням та висушування до сталої маси при 105°C [8].

Вміст рибофлавіну у культуральній рідині визначали спектрофотометрично при  $\lambda = 450$  нм після попереднього гідролізу ФАД до ФМН протягом 12 годин у 10 % ТХО [8, 9].

Для дослідження впливу УФ-опромінення на синтез рибофлавіну вирощену на щільному поживному середовищі культуру *Eremothecium ashbyi* засівали в колби на 100 мл з рідким ГПД середовищем, культивували 3 доби на качалці при 180 об/хв при 28°C. Після чого культуральну рідину відцентрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. з наступним промиванням стерильною дистильованою водою, таким чином були отримані водні суспензії міцелію культури *Eremothecium ashbyi*.

Водна суспензія продуценту або культура продуценту у середовищі культивування по 3 см<sup>3</sup> розливалися у чашки Петрі. Суспензія розподіляється по дну чашки тонким шаром товщиною 0,1 мм. Чашки Петрі поміщали на відстані 25 см від джерела УФ-променів (лампа бактерицидна 15W Electrum G13 A-FG-0495) і знімали кришки в момент включення секундоміра. Через задані проміжки часу (1, 3, 5 хвилин) чашки закривали кришками і опромінену культуральну рідину і водну суспензію міцелію *Eremothecium ashbyi* засівали в колби на 250 см<sup>3</sup> з рідким ГПД середовищем у кількості 5% [8, 10].

**Результати та їх обговорення.** На першому етапі підготовки посівного матеріалу здійснюють оновлення

вихідної культури на агаризованих середовищах. Оскільки штам-продуцент є досить нестабільним при зберіганні, основною вимогою є розсів культури на щільні середовища, та відбір колоній, забарвлених у яскраво жовтий колір, які і використовуються для подальшого отримання посівного матеріалу.

Незважаючи на постійну підтримуючу селекцію при культивування штаму у лабораторних умовах протягом 3 років спостерігалось поступове значне зниження рівня накопичення рибофлавіну та відповідне збільшення рівня накопичення біомаси (рис. 1). Зниження кількості рибофлавіну при збільшенні кількості біомаси можна пояснити тісним зв'язком біосинтезу флавінів з обміном пуринів.

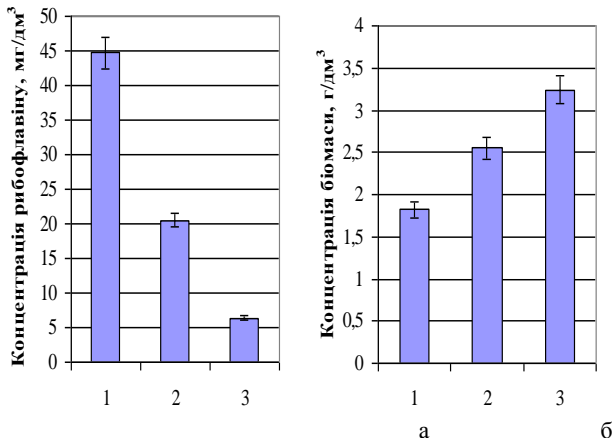


Рис. 1. Біосинтез рибофлавіну (а) та рівень накопичення біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340 протягом 3 років (достовірність відмінностей  $p < 0,05$ )

Значна втрата штамом здатності до синтезу рибофлавіну (більше ніж на 90%) призвела до необхідності пошуку способів підвищення рівня синтезу рибофлавіну штамом-продуцентом. З літературних джерел відомо, що понадсинтез рибофлавіну грибом *E. ashbyi* у природних умовах здійснюється як захисна реакція на дію сонячних ультрафіолетових променів. Тому нами було запропоновано здійснювати УФ-опромінення продуценту для підвищення синтезу рибофлавіну. Результати проведених досліджень наведені на рис. 2 та 3.

Опромінення культуральної рідини продуценту призводить до збільшення синтезу рибофлавіну на 72-74%, опромінення водної суспензії міцелію штаму-продуценту - до збільшення синтезу на 80%.

На накопичення біомаси УФ-опромінення впливу майже не здійснює, відмінності між показниками накопичення біомаси не є статистично значимими.

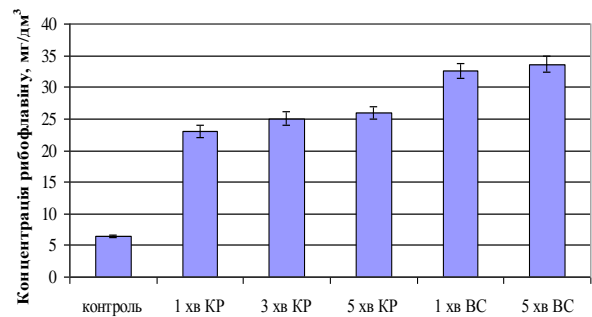


Рис. 2. Біосинтез рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 після УФ-опромінення (КР – культуральна рідина, ВС – водна суспензія міцелію) (достовірність відмінностей  $p < 0,05$ )

За результатами проведених досліджень запропоновано додати до технологічної схеми отримання рибофлавіну стадію ультрафіолетового опромінення посівного матеріалу для збільшення виходу рибофлавіну.

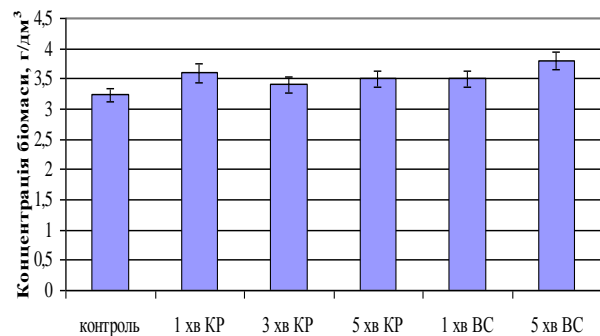


Рис. 3. Накопичення біомаси штамом *E. ashbyi* F-340 після УФ-опромінення

Результати ферментації, отримані при використанні посівного матеріалу різного віку, наведені в табл. 1. З наведених даних видно, що сприятливим для накопичення рибофлавіну виявилось вирощування посівного матеріалу протягом 3-4 діб. Мікроскопічний аналіз показав, що у цей момент міцелій гриба представлений гіфами, що сильно розрослися, з великим числом вакуолей та численними включеннями, що відповідає стаціонарній фазі росту культури. проте найбільша кількість біомаси отримується при засіві середовища інокулятом віком 6 діб.

Таблиця 1. Вплив періоду культивування посівного матеріалу на біосинтетичну активність продуценту рибофлавіну

Тривалість вирощування посівного матеріалу, діб	Концентрація рибофлавіну на 6 добу культивування, мг/дм³	Концентрація біомаси на 6 добу культивування, г/дм³
1	11±0,44	2,02±0,078
2	11,1±0,36	1,46±0,038
3	21,05±0,97	1,92±0,087
4	<b>21,73±0,43</b>	1,93±0,085
5	16,45±0,77	2,55±0,077
6	18,46±0,89	<b>2,68±0,111</b>

(достовірність відмінностей  $p < 0,05$ )

Найбільший рівень накопичення рибофлавіну був досягнутий у тих варіантах, де вносили в ферментаційне середовище посівний матеріал у кількості 1% від його об'єму (табл. 2), що співпадає з літературними даними про необхідність використання невеликого інокуляту, а от для накопичення великої кількості біомаси краще використовувати 5% посівного матеріалу.

**Таблиця 2.** Вплив кількості посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну

Кількість внесеного посівного матеріалу	Концентрація рибофлавіну на 6 добу культивування, мг/дм <sup>3</sup>	Концентрація біомаси на 6 добу культивування, г/дм <sup>3</sup>
1 %	<b>21,87±0,7</b>	1,92±0,079
5 %	18,46±0,57	<b>2,68±0,124</b>
10 %	17,74±0,97	1,91±0,078

(достовірність відмінностей  $p < 0,05$ )

**Висновки.** Встановлено, що для підтримки культури *Eremothecium ashbyi* в активному стані, на першому етапі підготовки посівного матеріалу, необхідно здійснювати підтримуючу селекцію, відбираючи для подальших досліджень найбільш пігментовані колонії продуценту.

З метою збільшення біосинтетичної здатності штаму-продуценту запропоновано здійснювати ультрафіолето-

ве опромінення міцелію гриба, що призводить до збільшення синтезу рибофлавіну на 70-80%.

Встановлено, що найбільшому виходу рибофлавіну сприяє використання посівного матеріалу у віці 3-4 діб та у кількості 1%.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Оптимальные условия для прорастания спор гриба *Eremothecium ashbyi*, продуцента рибофлавіна / Л.А. Минеева, С.М. Розенфельд, А.И. Степанов, В.Г. Жданов // Прикл. биохимия и микробиология. - 1973. - Т. 9, №2. - С. 219-223.
2. О сохранении *Eremothecium ashbyii* в активном состоянии / М.Г. Гольшева, Е.В. Гришанкова, В.Э. Успенская и др. // Микробиология. - 1965. - Т. 34, №4. - С. 661-665.
3. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология: Учеб. пособие. - М.: Изд-во МГУ, 1989. - 294с.
4. 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.
5. Improved riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* using glucose and yeast extract / Xin Cheng, Jia Zhou, Lin Huang, Kun-tai Li // African Journal of Biotechnology. - 2011. - 10, № 70. - P. 15777-15782.
6. Шпичка А.И. Биология микромицетов рода *Eremothecium*-продуцентов эфирного масла и рибофлавіна: Дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.06. - М., 2013. - 163с.
7. База даних CBS Database of Fungal Names [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://www.indexfungorum.org>
8. Методы экспериментальной микологии: Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. - К.: Наук. думка, 1982. - 562 с.
9. Экспериментальная витаминология: Справочное руководство / Под ред. Ю.М.Островского. - Минск: Наука и техника, 1979. - 552 с.
10. Pujari, Venugopal, Chandra T.S. Physio-morphological changes in a riboflavin producer *Eremothecium ashbyii* DT1 and UV mutants in submerged fermentation // Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2001. - 11 (4). - P. 552-557.

#### REFERENCES

1. Optimal conditions for sprouting spores of fungus *Eremothecium ashbyi*, producer of riboflavin / L.A. Mineeva, S.M. Rozenfeld, A.I. Stepanov, V.G. Zhdanov // Applied Biochemistry and Microbiology. - 1973. - V. 9, №2. - P. 219-223.
2. Development of conditions for preservation of *Eremothecium ashbyii* strain in active state and production of inoculate / M.G. Golisheva, E.V. Grishankova, V.E. Uspenskaja et al. // Microbiology. - 1965. - V. 34, №4. - P. 661-665.
3. Vorobeve L.I. Industrial Microbiology: schoolbook. - M.: MGU, 1989. - 294p.
4. Shpichka A.I. Biology of micromycetes of the genus *Eremothecium* - producers of essential oil and riboflavin: Thesis of candidate of biological sciences: 03.01.06. - M., 2013. - 163p.
5. CBS Database of Fungal Names, <http://www.indexfungorum.org>
6. Methods of Experimental Mycology: A Handbook / I.A. Dudka, S.P. Vasser, I.A. Ellanskaia et al. - K.: Nauk. dumka, 1982. - 562 c.
7. Experimental Vitaminology: A Reference Guide / ed. by M. Ostrovskoho. - Minsk: Nauka i tekhnika, 1979. - 552 c.

#### Influence of reception conditions of seed material on biosynthetic capacity of riboflavin producer *Eremothecium ashbyi*

V. Polishchuk, O. Dugan

**Abstract.** There was observed a change in the biosynthetic capacity of Ascomycetes *Eremothecium ashbyi* two parameters: accumulation of riboflavin and biomass. Due to the decrease in the level of biosynthesis of vitamin B<sub>2</sub>, there was proposed the use of ultraviolet irradiation of mycelium to increase biosynthetic capacity. There were defined the age and number of seed material, which was imputed into the fermentation environment. These established parameters are related into the largest level of riboflavin and biomass accumulation.

**Keywords:** riboflavin, *Eremothecium ashbyi*, seed material, biomass, inoculum age.

#### Влияние условий получения посевного материала на биосинтетическую способность продуцента рибофлавіна *Eremothecium ashbyi*

В. Ю. Полищук, А. М. Дуган

**Аннотация.** Исследовано изменение биосинтетической способности аскомицета *Eremothecium ashbyi* по двум показателям: накопление рибофлавіна и биомассы. В связи со снижением уровня биосинтеза витамина В<sub>2</sub> предложено использование ультрафиолетового облучения мицелия для повышения биосинтетической способности. Установлен возраст и количество посевного материала, вносимого в ферментационную среду, соответствующие наибольшему накоплению рибофлавіна и биомассы.

**Ключевые слова:** рибофлавін, *Eremothecium ashbyi*, посевной материал, биомасса, возраст инокулята.