

УДК 604.4:577.164.1:582.282.23(043.2)

ОТРИМАННЯ РИБОФЛАВІНУ МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАЦІЇ ГРИБІВ

Анастасія Римарчук

Національний авіаційний університет, Київ

Науковий керівник – Тетяна Андріанова, к.б.н., с.н.с., доц.

Ключові слова: продуценти, вітамін В2, дріжджі, біотехнологія, *Ermothecium ashbyi*

Рибофлавін (вітамін В2) є одним з найбільш широко розповсюджених вітамінів, що міститься у всіх тваринних та рослинних клітинах, відповідаючи у складі коферментів флавінів за окисно-відновні процеси в організмі. Добова норма цього вітаміну складно поновлюється при харчуванні, а його дефіцит призводить до арібофлавінозу, проблем травлення, зору і нервової системи, залізодефіцитної анемії, запаморочень, кутових стоматитів, хейлітів, дерматитів.

Найбільш дешевим методом синтезу рибофлавіну на сьогодні є мікробіологічна ферментація [1]. Актуальним завданням розвитку і удосконалення технології виробництва вітаміну В2, чутливого до ультрафіолету таутомера, є регулювання та збільшення біосинтетичної здатності організмів-продуцентів шляхом удосконалення умов культивування і використання ефективних джерел живлення. У біотехнологіях виробництва рибофлавіну використовують організми різних таксономічних груп – бактерії і гриби, як то *Bacillus subtilis*, *Atelosaccharomyces hudeloi*, *Candida boidinii*, *Ermothecium ashbyi*, *E. gossypii*, *Meyerozyma caribbica*, *M. guilliermondii*, *Ogataea polymorpha*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Yarrowia lipolytica* та ін. [1,2]. Серед аскомікот штами видів *Ermothecium gossypii* Kurtzman і *E. ashbyi* Guillerm є найбільш активними продуцентами, накопичуючи від 2480 до 6420 мг/л рибофлавіну у клітинах у вільному стані або у вигляді флавінаденіннуклеотиду [1].

Основним об'єктом дослідження є надпродуцент рибофлавіну *E. ashbyi*, що належить до класу *Saccharomycetes* порядку *Saccharomycetales* родини *Ermotheciaceae*. При культивуванні *in vitro* гриб утворює округлі, плоскі, матові колонії, 8-16 мм діам., яскраво жовтого кольору через перенасичення рибофлавіном [3]. Дослідження росту *E. ashbyi* здійснюють на агаризованих середовищах: глюкозо-пептонно-дріжджовому, соєвому, Чапека- Докса, картопляно-декстрозному і сусло-агарі. Метаболіти вивчають на рідких середовищах аналогічного складу у конічних колбах з 50 см³ субстрату за культивуванням при 28 °С, на качалці при 180 об/хв., 7 діб [4]. Накопичену біомасу визначають ваговим методом, відділяючи від культуральної рідини і висушуючи при 105 °С до сталої маси. Вміст рибофлавіну встановлюють спектрофотометрично за довжини хвилі 450 нм [4].

Накопичення рибофлавіну зберігає тенденцію до збільшення зі зростанням значень рН незалежно від складу середовища та досягає високих показників. Вміст рибофлавіну на глюкозо-пептонному середовищі з початковими значеннями рН 5,5 та 6,0 становив, відповідно, 5,1±0,24 та 5,4±0,20 мкг/см³ на 7 добу культивування. Проте найбільший вихід рибофлавіну спостерігається при початковому значенні рН 7,5 – це 45,7±1,8 мкг/см³, що у 8,9 разів більше, ніж при рН 5,5, та у 8,4 разів більше, ніж при рН 6,0 [3,4].

Різні джерела вуглецю та азоту є іншими важливими факторами впливу на рівень накопичення біомаси грибів та вітаміну В2. Для вивчення синтезу рибофлавіну використовують середовища, які у своєму складі в якості джерел вуглецю містять моно- та дисахариди (переважно глюкозу та сахарозу), мелясу, гідрол, а в якості джерел азоту – пептон, дріжджовий або кукурудзяний екстракти, соєве борошно [5]. При порівнянні [4] різних поживних середовищ найбільше накопичення рибофлавіну штамом гриба *E. ashbyi* спостерігається на субстратах із суслom – встановлено $77,0 \pm 2,65$ мкг/см³ рибофлавіну, що у 3,7 рази більше, ніж на глюкозо-пептонному середовищі ($20,51 \pm 0,8$ мкг/см³), та у 2,2 рази більше, ніж на соєвому ($34,93 \pm 1,75$ мкг/см³). Також досліджено, що значне накопичення біомаси гриба є на середовищі з мелясою, збагаченою дріжджовим екстрактом, – $14,19 \pm 0,4$ мкг/см³ [5].

Висновки

Спостерігається тенденція до збільшення синтезу рибофлавіну *in vitro* при культивуванні штаму над-продуценту *Eremothecium ashbyi* при зростанні рівня рН у поживному середовищі від рН 4,0 до 7,5 – тобто за нейтральних значень. Максимальне накопичення біомаси гриба відбувається при рН 5,5-6,0. Наявність додаткових джерел вуглецю та азоту сприятлива для накопичення рибофлавіну у клітинах *E. ashbyi*. Культивування на комплексних поживних середовищах показало, що найвищий біосинтез рибофлавіну спостерігався на середовищі із суслom, а утворення найбільша біомаса гриба була отримана на середовищі із меляси з додаванням дріжджового екстракту. Таким чином, подальші дослідження компонентів поживних середовищ можуть дати матеріал для оптимізації використання штамів виду *E. ashbyi*, а поглиблення аналізу і вивчення інших аскомікот-продуцентів рибофлавіну за аналогічними схемами дослідів може виявити нові штами над-продуценти.

Список використаних джерел:

1. Lim S.H. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis* and *Candida famata*: an overview / S.H. Lim, J.S. Choi, E.Y. Park // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2001. – Vol. 6, № 2. – P. 75-88.
2. Averianova L.A. Production of vitamin B2 (Riboflavin) by microorganisms: an overview / L.A. Averianova, L.A. Balabanova, O.M. Son, A.B. Podvolotskaya, L.A. Tekutyeva // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 71-23.
3. Pujari V. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* / V. Pujari, T. S. Chandra // *Bioprocess Engineering*. – 2000. – Vol. 23, № 3. – P. 303-307.
4. Поліщук В.Ю., Дуган О.М. Вплив умов культивування на біосинтетичну здатність *Eremothecium ashbyii* Guillierm // *Technology audit and production reserves*. – 2016. - №2/4 (28). – С. 35-41.
5. Kato T., Enoch Y. Park Riboflavin production by *Ashbya gossypii* // *Biotechnology Letters*. – 2011. – 34, 4. – P. 611-618.