

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ КУЛЬТИВУВАННЯ *E. ASHBYI* ТА *A. GOSSYPII* ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ

Лазарець П.С., Поліщук В.Ю.

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», pavlo.ls.0307@gmail.com

Вступ. Рибофлавін – є одним із найрозповсюдженіших вітамінів, що необхідні для життєдіяльності організму. Значення рибофлавіну для живого організму полягає у тому, що він входить до складу коферментів, що беруть участь в окисно-відновних реакціях та функціонують у ланцюзі переносу електронів в мітохондріях під час реакцій дегідрування. Рибофлавін широко застосовується у медицині, фармацевтичній промисловості, сільському господарстві, тваринництві і птахівництві [1]. Спеціальні добавки рибофлавіну мають стимулюючу дію на птахів: при його нестачі можлива затримка у рості, знижується імунітет. Наразі для біосинтезу рибофлавіну застосовують такі мікроорганізми, як *E. ashbyi*, *A. gossypii*, *C. famata* та генетично модифіковані штами таких мікроорганізмів як *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes* та *Candida* spp., застосовуючи інженерні стратегії метаболізму. Метою нашої роботи є дослідження особливостей процесу культивування *Eremothecium ashbyi* та *Ashbya gossypii* для обрання кращого продуценту [1,2].

Матеріали та методи. При підготовці даного літературного огляду були використані наукові публікації, звіти, статті в періодичних наукових журналах та інші літературні джерела, що стосуються таких продуцентів рибофлавіну як *Eremothecium ashbyi* та *Ashbya gossypii*.

Результати та обговорення. Останніми роками проведена чимала кількість досліджень з метою пошуків надпродуцентів рибофлавіну грибами роду *Eremothecium*. За допомогою різних генно-інженерних методів були отримані мутанти, що характеризуються підвищеною продуктивністю до біосинтезу рибофлавіну. Наприклад, продуктивність штаму *Ashbya gossypii* ZP4 при культивуванні на середовищі з рапсовою олією збільшується втричі а штам *Ashbya gossypii* ATCC 10895-32, що отриманий за допомогою УФ-випромінювання на середовищі з соєвою олією синтезує на 42% рибофлавіну більше [3].

Eremothecium ashbyi та *Ashbya gossypii* представляють інтерес, обумовлений їх здатністю продукувати промислово важливі біологічно активні сполуки [4]. *E. ashbyi* і *A. gossypii* є природними суперпродуцентами рибофлавіну завдяки їх властивості пригнічувати дію іонів заліза, що інгібують у інших мікроорганізмів біосинтетичні шляхи утворення вітаміну [3]. Крім отримання рибофлавіну за допомогою грибів роду *Eremothecium* можна біотехнологічним способом отримувати ефірну олію з ароматом троянди. Синтез ефірної олії може досягати 175 мг на 1 л культуральної рідини. Рівень ефірної олії, яку здатен накопичити в 1 л культуральної рідини даний продуцент можна порівняти з вмістом ефірної олії в 500 г квіток троянд. За ароматом та властивостями вони ідентичні. Також *E. ashbyi* здатен гіперпродукувати флавінаденіндинуклеотид (ФАД), на відміну від *A. gossypii* [2].

Також проведено багато досліджень з метою вивчення культуральних та фізіолого-біохімічних особливостей даних продуцентів. Динаміка накопичення біомаси *E. ashbyi* при культивуванні в рідкому поживному середовищі підпорядковується відомим закономірностям для простих періодичних культур: до 36 год зростання йде експоненціально і досягає 2,0 г сухої біомаси на 1 л культуральної рідини, потім спостерігається уповільнення швидкості, ріст сповільнюється, що характерне при переході до стаціонарної фази та до кінця ферментації - початку автолізу культури. При цьому змінюється рН: окислення культуральної рідини в період активного росту до 5,5 і збільшення рН до 6,2 в стаціонарну фазу і фазу лізису [4].

Біосинтез рибофлавіну залежить від джерел карбону та азоту у поживному середовищі. Зазвичай, *E. ashbyi* культивується у середовищах, що містить у своєму складі глюкозу або сахарозу, мелясу, гідрол, а в якості джерел азоту – пептон, соєве борошно, дріжджовий або кукурудзяний екстракти. Можна використовувати дешеві відходи в якості джерел азоту, наприклад, макуху з насіння арахісу та кунжуту [5]. *E. ashbyi* при культивуванні на агаровому середовищі, що містить 4% солоду та 0,5% дріжджового екстракту, при температурі 20-22 °С утворює бліді колонії діаметром 5 мм, що поступово набувають яскраво-жовтого кольору за рахунок виділення рибофлавіну [5].

Недолік культури *E. ashbyi* - її нестабільність. При зберіганні на твердих середовищах при кімнатній або низькій температурі і навіть в процесі ліофілізації грибок легко втрачає здатність до надсинтезу рибофлавіну. Для збереження штаму *E. ashbyi* в активному стані протягом тривалого часу (8-10 місяців) рекомендується проводити систематичне розсівання на тверді поживні середовища і відбирати найбільш інтенсивно забарвлені в помаранчевий колір колонії. Проведене дослідження по вивченню впливу температурних режимів на ріст і розвиток *E. ashbyi* і *A. gossypii* показало, що досліджувані мікроміцети здатні до зростання в діапазоні 20–35°C, температурний оптимум становить 26–28°C [6].

Оптимум рН при культивуванні *E. ashbyi* та *A. gossypii* знаходиться в межах 5,5 - 6,5, а найбільша кількість утвореної біомаси спостерігається при рН 6.0. Варто зазначити, що при культивуванні обох мікроорганізмів після ферментації спостерігається зміна рН, особливо при вирощуванні на глюкозо-пептонному середовищі. За відношенням до кисню обидва продуценти є аеробами в умовах глибинного і поверхневого культивування. У разі відсутності кисню у середовищі дані продуценти не будуть синтезувати рибофлавін. Для досягнення більшого рівня синтезу рибофлавіну *E. ashbyi* засів поживного середовища у ферментері має проводитися спорами, які щойно проросли [6].

В якості поживного середовища можна застосовувати 1–3% розчин меляси, гідролу або глюкози, 3–8% розчин кукурудзяного екстракту або дріжджового автолізу, з додаванням N, P₂O₅, K, Mg, Zn. Для отримання кормового рибофлавіну доцільно застосовували середовище, яке складається з олії, соєвого борошна, кукурудзяного екстракту, крейди та бурякового або яблучного порошку. пептону, Біосинтез рибофлавіну підвищується при додаванні ненасичених жирних кислот, а насичені жирні кислоти уповільнюють

біосинтез рибофлавіну. Культивування *E. ashbyi* стимулюється додаванням вітамінів групи В. Піримідинові та пуринові основи є попередниками при біосинтезі рибофлавіну і також можуть бути використані для стимуляції його біосинтезу. Міцеліальний гриб *E.ashbyi* здійснює надсинтез не лише рибофлавіну, але й ФАД. Особливо активно синтезується ФАД при додаванні у поживне середовище мальтози [7].

Висновки. Таким чином, оптимальним продуцентом рибофлавіну доцільно обрати *Eremothecium ashbyi*. Крім надсинтезу рибофлавіну *E. ashbyi* здійснює синтез ФАД та ефірної олії. Це дає можливість виробляти ефірну олію в якості додаткового цільового продукту. Даний продуцент не несе з собою ризику передачі генів стійкості до антибіотиків, а отже є цікавим та перспективним об'єктом для використання при виробництві рибофлавіну, що вимагає встановлення особливостей синтезу продукту та можливостей його регуляції.

Список використаної літератури:

1. L. A. Averianova, L. A. Balabanova, O. M. Son, A. B. Podvolotskaya, and L. A. Tekutyeva, "Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, Nov. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.570828.
2. S. K. Schwechheimer, E. Y. Park, J. L. Revuelta, J. Becker, and C. Wittmann, "Biotechnology of riboflavin," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 5, pp. 2107–2119, Mar. 2016, doi: 10.1007/s00253-015-7256-z.
3. Pujari V. Physio-morphological changes in a riboflavin producer *Eremothecium ashbyii* DT1 and UV mutants in submerged fermentation / V. Pujari, T. S. Chandra // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – V. 11. – №4. – P. 552–557.
4. V. Pujari and T. S. Chandra, "Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyii*," *Bioprocess Eng.*, vol. 23, no. 3, pp. 303–307, 2000, doi: 10.1007/PL00009127.
5. A. E. Kalingan and C. M. Liao, "Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* NRRL 1363," *Bioresour. Technol.*, vol. 82, no. 3, pp. 219–224, 2002, doi: 10.1016/S0960-8524(01)00194-8.
6. Гусев М. В., Мінева Л. А. Мікробіологія: підручник для студентів біологічних спеціальностей закладів вищої освіти / за заг. ред. М. В. Гусєва, Москва. 2003. С. 351–365.
7. X. Cheng, J. Zhou, L. Huang, and K. tai Li, "Improved riboflavin production by *eremothecium ashbyii* using glucose and yeast extract," *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 70, pp. 15777–15782, 2011, doi: 10.5897/AJB11.986.
8. Lim, S.H., Choi, J.S. & Park, E.Y. (2001). Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: An overview. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6, 75–88 <https://doi.org/10.1007/BF02931951>