

# БІОСИНТЕТИЧНА ЗДАТНІСТЬ *EREMOTHECIUM ASHBYI* ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА ВІДХОДАХ ОЛІЙНО-ЖИРОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ

Лазарець П.С., Поліщук В.Ю.

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

## Abstract

The article is devoted to the study of biosynthetic properties when cultivated on oil and fat industry wastes. The meal and cake were used as cheap raw materials for the cultivation of *Eremothecium ashbyi*. The ability of the producer to synthesize riboflavin on these wastes of the oil and fat industry was analyzed.

**Keywords:** *Eremothecium ashbyi*, biosynthesis, riboflavin, cultivation.

**Вступ.** Значення рибофлавіну для живого організму полягає в його участі у реакціях дегідрування, де він входить до складу флавінових коферментів [1]. Синтез рибофлавіну спостерігається у різних груп мікроорганізмів. Значні його кількості можуть утворювати деякі дріжджі, міцеліальні гриби, актиноміцети, мікобактерії, ацетобутилові бактерії. Один з найбільш відомих продуцентів - *Eremothecium ashbyi* є аскоміцетом, здатним до надсинтезу рибофлавіну кормового і медичного призначення [2]. Надсинтез вітаміну В<sub>2</sub> може бути стимульований додаванням специфічних компонентів поживного середовища, зокрема використовують жмих кунжутного і арахісового насіння [3], що є відходами олійної промисловості. Для збільшення виходу рибофлавіну планується використовувати ці відходи олійно-жирової промисловості. Метою нашої роботи є дослідження здатності *Eremothecium ashbyi* до синтезу рибофлавіну при культивуванні на середовищах з відходами олійно-жирової промисловості, типовими для України.

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження був штам *Eremothecium ashbyi* Guilliermond F-340. Музейна культура зберігалася при кімнатній температурі у пробірках на середовищі складу (%): глюкоза – 1,0; пептон – 0,3; дріжджовий екстракт – 0,5; агар – 2,0. Для відновлення музейної культури проводився пересів на чашки Петрі з середовищем такого ж складу та відбувалося культивування протягом 7 днів у термостаті при 28°C.

Для отримання посівного матеріалу в колби місткістю 250 см<sup>3</sup> вносилося 50 см<sup>3</sup> середовища складу (%): глюкоза – 1,0; пептон – 0,3; дріжджовий екстракт – 0,5. На глюкозо-пептонно-дріжджовому середовищі культивування відбувалося 7 днів при 28°C при постійному перемішуванні 180 об/хв на орбітальних качалках. Глибинне культивування проводилося за таких же умов на ГПД-середовищі з додаванням різних концентрацій макухи і шроту. Посівний матеріал додавався у кількості 1%.

Визначення складу шроту і макухи, що використовували у дослідженні, проводилося на Фур'є-спектрометрі Bruker Tango-R, що призначений для вимірювання оптичних спектрів відображення в інфрачервоному діапазоні для кількісного і якісного аналізу спектрів відображення твердих тіл і порошків.

Визначення концентрації рибофлавіну після закінчення культивування проводилося спектрофотометрично [4]. Культуральну рідину відфільтровували, відбирали 1 мл фільтрату, додавали до нього 1 мл трихлороцтової кислоти та інкубували 12 годин у термостаті. Після закінчення інкубування зразки центрифугували протягом 5-7 хвилин при 3000 об/хв і до отриманого розчину додавали по краплях насичений розчин перманганату калію до фіолетового забарвлення, що не зникає. Надлишок перманганату нейтралізували додаванням кількох крапель 3% перекису водню до повного зникнення фіолетового кольору, після чого розчин доводили до 5 мл. Визначення оптичної густини досліджуваних зразків проводили при довжині хвилі 450 нм в кюветі 1 см. Вміст рибофлавіну визначали за калібрувальним графіком. Для визначення кількості рибофлавіну у сухому залишку культуральної рідини, висушений фільтр подрібнювали, поміщали у колби з 0,02н HCl і автоклаували при 121°C протягом 20 хвилин. Аналіз вмісту рибофлавіну проводили, як зазначено вище [5]. Отримані результати перераховували у відповідності до розведення.

**Результати та обговорення.** Результати аналізу макухи і шроту, що використовували у дослідженнях наведено у таблиці 1. Вміст жирів у макусі значно вищий ніж у шроті, що пов'язано зі способом виділення олії із сировини. Також, в залежності від культури відрізняється і якісний склад зразків, зокрема жирнокислотний склад. Зокрема залишкова олія у зразках з ріпаку містить лише 7% насичених жирних кислот, 61% мононенасичених жирних кислот і 32% поліненасичених жирних кислот. Зразки з сої містять близько 16% насичених жирних кислот, 24% мононенасичених жирних кислот і 60% поліненасичених жирних кислот. Зразки з соняшника містять 12% насичених жирних кислот, 22% мононенасичених жирних кислот та 66% поліненасичених жирних кислот [6].

**Таблиця 1. Результати аналізу шроту і макухи**

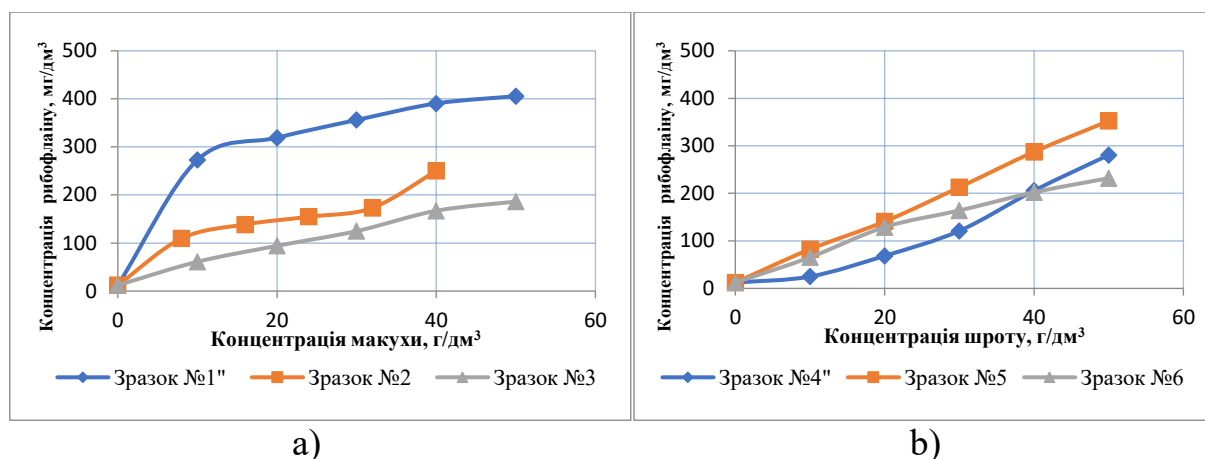
Номер зразка	Опис зразка	Характеристики, що визначалися				
		Вологість,%	Вміст жирів,%	Вміст протеїну,%	Вміст клітковини,%	Вміст золи,%
1	Соняшникова макуха з облущеного насіння	8,5	21,9	40,8	7	-
2	Соняшникова макуха з необлущеного насіння	5,48	9,47	30,63	19,01	6,78
3	Соева макуха	6,67	8,39	43,76	9,37	6,54
4	Соняшниковий шрот з облущеного насіння	6,4	1,01	51,2	6,6	5
5	Соняшниковий шрот з необлущеного насіння	8,06	0,25	33,32	19,19	7,31
6	Ріпаковий шрот	9,14	1,77	34,68	12,06	7,14

Результати проведення глибинного культивування з додаванням різних концентрацій шроту і макухи наведені у таблиці 2. Графіки залежності рівня

накопичення рибофлавіну від концентрації доданої макухи або шроту зображено на рисунках 1a,1b відповідно. В процесі культивування культуральна рідина набувала яскраво-жовтого кольору, який ставав інтенсивнішим зі збільшенням концентрації доданої макухи або шроту. Культуральна рідина під ультрафіолетовим випромінювання давала зелену флуоресценцію, що підтверджувало накопичення рибофлавіну у ній. При культивуванні на деяких зразках шроту і макухи культуральна рідина набувала темно-зеленого забарвлення. Це можна пояснити наявністю у шроті і макусі хлорогенової кислоти, що окислюється з утворенням продуктів темного кольору.

**Таблиця 2. Результати культивування *E.ashbyi* на ГПД-середовищі з додаванням різних концентрацій макухи і шроту**

Концентрація макухи/шроту у поживному середовищі, г/дм <sup>3</sup>	Загальна концентрація рибофлавіну у культуральній рідині після культивування, мг/дм <sup>3</sup>					
	Зразок №1	Зразок №2	Зразок №3	Зразок №4	Зразок №5	Зразок №6
0	12,14	12,14	12,14	12,14	12,14	12,14
10 (8 для зразка №2)	272,76	109,35	60,92	24,88	82,34	65,35
20 (16 для зразка №2)	319,14	138,64	94,12	68,53	140,67	129
30 (24 для зразка №2)	355,99	154,66	124,8	121,04	212,82	163,94
40 (32 для зразка №2)	390,42	173,13	167,1	205,8	287,31	202,16
50 (40 для зразка №2)	405,34	250,54	186,07	280,62	352,31	231,88



**Рис. 1. Залежність концентрації рибофлавіну від концентрації макухи (а), шроту (б) в середовищі.**

На середовищах з додаванням відходів олійно-жирової промисловості значно підвищується рівень накопичення рибофлавіну у порівнянні зі звичайним ГПД-середовищем. Судячи з результатів високі рівні синтезу рибофлавіну можна досягти на середовищах з додаванням макухи і шроту також, де рівень жирів значно менший. Додавання до ГПД-середовища соняшникової макухи з облущеного насіння (зразок №1), соняшникової макухи з необлущеного насіння (зразок №2) та соєвої макухи (зразок №3) у максимальній концентрації 50 г/дм<sup>3</sup>

збільшує рівень накопичення рибофлавіну у 33, 20, 15 разів відповідно ніж на звичайному ГПД середовищі. Рівень синтезу рибофлавіну завжди зростає зі збільшенням концентрації доданої макухи/шроту у поживне середовище. Додавання навіть 10 г/дм<sup>3</sup> макухи збільшує рівень накопичення рибофлавіну в 22, 9, 5 разів для зразків №1, №2, №3 відповідно. При концентраціях 40 і 50 г/дм<sup>3</sup> на середовищі з додаванням макухи, рівень біосинтезу зростає не настільки великими темпами, ймовірно досягаючи максимуму. Додавання соняшникового шроту з облущеного насіння (зразок №4), соняшникового шроту з необлущеного насіння (зразок №5), ріпакового шроту (зразок №6) у концентрації 50 г/дм<sup>3</sup> збільшує рівень накопичення рибофлавіну у 23, 29, 18 разів відповідно. При культивуванні на соєвій макусі та ріпаковому шроті були отримані менші значення рибофлавіну ніж при культивуванні на макусі і шроті із соняшника. Це можна пояснити різним якісним складом жирних кислот і впливом тих чи інших жирних кислот на стимулювання біосинтезу рибофлавіну. Залежність концентрації рибофлавіну від концентрації доданого шроту виглядає більш лінійною, оскільки рівень жирів у середовищі там значно менший. Рівень біосинтезу рибофлавіну зростає зі збільшенням жирів та у поживному середовищі.

**Висновки.** Таким чином, було встановлено, що зі збільшенням концентрації макухи/шроту в поживному середовищі збільшується рівень синтезу рибофлавіну. Це означає, що олія, що наявна там чинить вплив на рівень накопичення рибофлавіну, в сукупності з впливом інших факторів, зокрема рівня протеїну у поживному середовищі. Оскільки, досягти високого рівня синтезу рибофлавіну можна і на шроті, оптимальним варіантом з економічної точки зору буде проводити культивування саме на ньому.

### **Список використаної літератури:**

1. Ionita G., Matei I. Application of Riboflavin Photochemical Properties in Hydrogel Synthesis. *Biophysical Chemistry – Advance Applications*. 2020. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.88855> (date of access: 01.05.2024).
2. Abbas C. A., Sibirny A. A. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011. Vol. 75, №2. P. 321–360. URL: <https://doi.org/10.1128/membr.00030-10> (date of access: 01.05.2024).
3. Kalingan A. E., Liao C.-M. Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* NRRL 1363. *Bioresource Technology*. 2002. Vol. 82, no. 3. P. 219–224. URL: [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00194-8](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00194-8) (date of access: 01.05.2024).
4. Экспериментальная витаминология (справочное руководство) / Под ред. Ю. М. Островского. – Минск: «Наука и техника», 1979. – 552 с.
5. 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. URL: <http://doi.org/10.1007/PL00009127> (date of access: 01.05.2024).
6. Kumar A. Vegetable Oil: Nutritional and Industrial Perspective / A. Kumar, A. Sharma, K. Upadhyaya // *Curr. Genomics*. – 2016. – Vol. 17, N. 3. – P. 230–240. URL: <https://doi.org/10.2174/1389202917666160202220107> (date of access: 01.05.2024).