

УДК 577.164. 12

Решетило Л. І.,

lidare@ukr.net, ORCID ID: 0000-0003-1229-634X, Researcher ID: G-9509-2019,

к.т.н., доц., професор кафедри товарознавства, технологій і управління якістю харчових продуктів, Львівський торговельно-економічний університет, м. Львів

МІКРООРГАНІЗМИ ЯК ПРОДУЦЕНТИ РИБОФЛАВІНУ

Анотація. У статті досліджується значення та властивості рибофлавіну, можливості використання мікроорганізмів у його виробництві та збільшення синтезу. Рибофлавін входить у склад важливих окислювально-відновлюваних ферментів в якості коферментів (органічних сполук небілкової природи, необхідних для каталізації багатьох ферментів). З усіх вітамінів групи В рибофлавін вважається найбільш дефіцитним для організму і повинен регулярно поповнюватися ним ззовні. Добова доза для людини складає в середньому 1,3-1,8 мг. У зв'язку з потребами медицини, фармацевтичної промисловості, сільського господарства, тваринництва і птахівництва актуальним є пошук шляхів синтезу рибофлавіну з високим його виходом. Сьогодні найдешевшим вважається спосіб виробництва рибофлавіну мікробіологічним способом. За останні десятиліття проводилися роботи дослідження генетичних механізмів регуляції біосинтезу рибофлавіну. В цьому напрямі ведуться дослідження, спрямовані на створення більш ефективних технологій виробництва рибофлавіну, пошук мікроорганізмів-продуцентів, які би забезпечували високий вихід вітаміну. Розкрито результати дослідження одержаних мутантів дріжджів резистентних до дії 8-азагуаніну, який є аналогом гуаніну, та можливості їх використання для одержання вітаміну.

Ключові слова: рибофлавін, вітаміни, мікроорганізми, штами, мутанти, дріжджі, продуценти, синтез, харчові продукти.

Reshetylo L. I.,

lidare@ukr.net, ORCID ID: 0000-0003-1229-634X, Researcher ID: G-9509-2019,

Ph.D., Associate Professor, Professor of the Department of Commodity Studies, Technologies and Food Quality Management, Lviv University of Trade and Economics, Lviv

MICROORGANISMS AS THE PRODUCERS OF RIBOFLAVIN

Abstract. The article investigates the importance and properties of riboflavin, the possibility of using microorganisms in its production and increasing synthesis. Riboflavin is a part of important redox enzymes as coenzymes (organic compounds of a non-protein nature, required for the catalysis of many ferments). Of all the B group vitamins, riboflavin is considered to be the most deficient in the body and should be regularly replenished from the outside. The daily dose for humans is on average 1.3-1.8 mg. In view of the needs of medicine, the pharmaceutical industry, agriculture, animal husbandry and poultry farming, it is important to find ways of high-yield synthesizing of riboflavin. Today, the cheapest method of riboflavin production is the microbiological method. In recent decades, research has been conducted on the genetic mechanisms of riboflavin biosynthesis regulation. In this area, studies are being conducted to create more efficient riboflavin production technologies, to search for microorganisms-producers that ensure high level of vitamin output. The results of the study of the obtained mutants of yeast resistant to the action of 8-azaguanine, which is a guanine analogue, and the possibility of using them for the production of vitamin are disclosed.

Key words: riboflavin, vitamins, microorganisms, strains, mutants, yeast, producers, synthesis, food products.

JEL Classification: C99, O31

DOI: <https://doi.org/10.36477/2522-1221-2020-23-15>

Постановка проблеми. Рибофлавін – $C_{17}H_{20}N_4O_6$ (лактофлавін, вітамін B_2) є одним із найбільш розповсюджених водорозчинних вітамінів, необхідних для нормальної життєдіяльності організму. Він відноситься до флавінів, в основі будови яких лежить гетероциклічна система. Молекула його складається з рибози (гідрокарбонат) і жовтого природного пігменту флавіну. Рибофлавін

функціонує у двох коензимних формах, які являють собою фосфорні ефіри: флавінмононуклеотид (ФМН) та флавінаденіндинуклеотид (ФАД).

Рибофлавін входить у склад важливих окислювально-відновлюваних ферментів в якості коферментів (органічних сполук небілкової природи, необхідних для каталізації багатьох ферментів). Флавінові ферменти беруть активну участь в

окисленні жирних кислот, високотоксичних альдегідів, розщеплюють в організмі чужорідні D-ізомери, які утворюються в результаті життєдіяльності бактерій, беруть участь у синтезі коферментних форм піридоксину (вітаміну B₆) в організмі, прискорюючи перетворення на його активну форму, здатні підтримувати у відновленому стані глутатіон та гемоглобін. Рибофлавін впливає на клітинне дихання, вуглеводний, білковий і жировий обмін, функцію зору (процеси обміну у рогівці та сітчатці ока), печінки, серцево-судинної і нервової системи, бере участь в утворенні антитіл, еритроцитів, регуляції репродуктивної функції людини.

З усіх вітамінів групи В рибофлавін вважається найбільш дефіцитним для організму і повинен регулярно поповнюватися ним ззовні. Добова доза для людини складає в середньому 1,3-1,8 мг. Нестача його може бути причиною периферичної невропатії кінцівок (відчуття поколювання, холоду, болю), стоматиту (запалення слизової оболонки порожнини рота з утворенням тріщинок в кутах губ), себорейного дерматиту, гласиту (набряк і почервоніння язика), погіршення зору (біль в очах, катаракта, кон'юнктивіт, кератит, світлобоязнь), порушення функції центральної нервової системи (депресія, істерія, іпохондрія), затримки росту у дітей. Спостерігається при шлунково-кишкових розладах, цирозі печінки, хронічному стресі, алкоголізмі, може виникнути при опіках, травмах, хворобах серця, запаленні щитовидної залози, діабеті, туберкульозі, хірургічних операціях.

Рибофлавін застосовують у медицині для профілактики і лікування захворювань, пов'язаних з його нестачею.

У зв'язку з тим, що не завжди є можливість забезпечити надходження в організм рибофлавіну за рахунок натуральних харчових продуктів, використовують харчову добавку E-101, яка сприяє наданню жовтого забарвлення та вітамінізації окремих харчових продуктів: молочних, зерноборошняних, кондитерських, харчових концентратів, сухих швидкорозчинних напоїв, майонезу, дієтичного та дитячого харчування, а також преміксів – гомогенних вітамінізованих сумішей.

Добавка E 101 вважається безпечною, корисною, дозволеною для використання у харчових продуктах і поділяється на: E 101i – чистий рибофлавін, E 101ii – моонатрієва сіль рибофлавін 5-фосфат та E 101iii – рибофлавін, отриманий з *Bacillus subtilis*. Слід зазначити, що натрієва рибофлавін 5-фосфат краще розчиняється у воді.

Рибофлавін використовують при виробництві бульйонних кубиків, супів швидкого приготування, адже він надає цим продуктам характерний “бульйонний” відтінок.

Рибофлавін має молекулярну масу 376,37 г/моль, він термостабільний і практично не руйнується в процесі звичайного приготування їжі, плавиться за температури 282°C. Однак стерилізація продуктів опроміненням або обробка їх оксидом етилену може привести до руйнування вітаміну.

Під впливом ультрафіолетового опромінювання рибофлавін переходить у неактивні форми, втрачаючи корисні властивості. Найбільш згубними є ультрафіолетові промені довжиною 440 нм. Рибофлавін добре розчиняється у соляній кислоті, нерозчинний у жирах і розчинниках жирів, легко руйнується у нейтральних і лужних середовищах, досить слабо розчиняється у воді (0,11 мг/мл при 27,5°C), нормальному бутиловому, аміловому і етиловому (0,0045 при 27,5°C) спирті, помірно розчиняється у мурашиній і льодяній оцтовій кислоті.

У зв'язку з потребами медицини, фармацевтичної промисловості, сільського господарства, тваринництва і птахівництва актуальним є пошук шляхів синтезу рибофлавіну з високим його виходом.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Сьогодні найдешевшим вважається спосіб виробництва рибофлавіну мікробіологічним способом. За останні десятиліття проводилися роботи дослідження генетичних механізмів регуляції біосинтезу рибофлавіну. В одержаних мутантах дріжджів з пошкодженим механізмом регуляції біосинтезу гуанілової кислоти у клітинах мікроорганізмів створюється надлишок гуанілових сполук, які використовуються для біосинтезу рибофлавіну. Київським політехнічним інститутом імені Ігоря Сікорського проводяться роботи по розробці технології рибофлавіну з використанням штаму-продуцента *Eremothecium ashbyii*. Запропоновано методи збільшення біосинтетичної здатності штаму-продуцента за допомогою підтримуючої селекції та ультрафіолетового опромінення міцелію гриба.

Сучасні дослідження спрямовані на підвищення виробництва рибофлавіну та розробку кращих поживних середовищ.

Постановка завдання. Метою роботи було охарактеризувати значення та властивості рибофлавіну, можливості використання мікроорганізмів у його виробництві та збільшення синтезу.

Виклад основного матеріалу дослідження. З усієї групи вітамінів В рибофлавін вважається незамінним компонентом їжі і найбільш дефіцитним. Для нормального функціонування організму рибофлавін повинен регулярно поступати ззовні в необхідній кількості, адже він не може накопичуватися, а при надлишку виводиться.

Продуцентом рибофлавіну є більша частина вищих рослин, бактерії, дріжджі, гриби. Тварини не здатні до самостійного синтезу рибофлавіну, і потреба у ньому задовольняється мікрофлорою шлунково-кишкового тракту та їжею.

Найбільше рибофлавіну поступає в організм людини з такими продуктами, як печінка, нирки, молоко та молочні продукти, м'ясо, риба, яйця, зелені овочі. З продуктів тваринного походження рибофлавін засвоюється краще, ніж з рослинних джерел. У коров'ячому, овечому, козиному молоці близько 90% вітаміну знаходиться у вільній формі, в більшості інших продуктів він зв'язаний з білками.

Штучно рибофлавін був отриманий у 1935 році. Сьогодні його отримують хімічним способом з 3,4 – диметиланіліну і рибози, мікробіологічним методом – шляхом повного мікробного синтезу і комбінованим хіміко-біотехнологічним методом, який включає мікробний синтез рибози, отриманої шляхом мікробної ферментації з використанням штампів-мутантів по транскеталазі бактерій роду *Bacillus*.

Найбільш перспективним і найдешевшим вважають мікробіологічний спосіб виробництва рибофлавіну. Перевагами цього способу виробництва є доступна сировина, порівняно нескладна апаратура, одноетапний технологічний процес, відсутність шкідливих викидів в атмосферу.

Синтез рибофлавіну спостерігається у різних груп мікроорганізмів. Значні його кількості можуть утворювати деякі дріжджі, міцеліальні гриби, актиноміцети, мікобактерії, ацетобутилові бактерії, азотобактер.

Рибофлавін нагромаджується у клітинах мікроорганізмів у вільному стані або у виді флавінаде-ніннуклеотиду.

Дані, які характеризують синтез рибофлавіну окремими мікроорганізмами, наведено у табл. 1.

Продуцентами рибофлавіну є також бактерії *Brevibacterium ammnigenes*, *Micrococcus glutamaticus*, дріжджі *Candida guilliermondii*, плісеневі гриби *Aspergillus niger* та ін.

Мікроорганізми, які продукують рибофлавін, поділяють на три групи:

- сильні (гриби *Eremothecium ashbyii gossipii*);
- помірні (дріжджі *Pichia guilliermondii*, *Candida flaveri*);
- слабкі (бактерії *Clostridium acetobytylicum*).

У промисловому виробництві рибофлавіну мікробіологічним і рентабельним методом є використання в якості його продуцента мікроскопічних грибів *Eremothecium ashbyii*. Так, якщо з однієї тонни моркви можна отримати 1 г вітаміну, з однієї тонни печінки тріски – 6 г, то з однієї тонни поживного середовища за допомогою грибів *Eremothecium ashbyii* – 25 кг.

Eremothecium ashbyii вирощують на поживних середовищах, де переважно джерелом вуглецю є глюкоза, сахароза, крохмаль, пшенична мука, джерелом азоту – рибна, кукурудзяна, соєва мука, боби, молочна сироватка, казеїн. У склад середовища входить також карбонат кальцію, хлорид натрію, гідрофосфат калію. Попередниками утворення рибофлавіну є піримідинові та пуринові основи (аденін, гуанін, ксантин, мочева кислота), які можуть бути використані для інтенсифікації його біосинтезу. Високий вихід вітаміну у *Eremothecium ashbyii* корелює з азотом пуринів та іншими азотистими джерелами, кількість яких повинна бути достатньою. Найкращим стимулятором вважається ксантин. Розвиток гриба поліпшує також додавання у середовище ненасичених жирних кислот, біотину, тіаміну, інозиту, ростових речовин зародків пшениці, картопляного соку, дріжджового автолізу. Слід зазначити, що поряд з рибофлавіном спостерігається і підвищення накопичення ФАД.

Методами генетичної інженерії було створено промислові високопродуктивні рекомбіновані штамми бактерій *Bacillus subtilis*, здатні до синтезу рибофлавіну. Слід зазначити, що природні штамми *Bacillus subtilis* не виділяють вітамін у зовнішнє середовище і синтезують його тільки у кількості, необхідній для підтримання власної життєдіяльності.

Для потреб тваринництва і птахівництва можна отримувати кормовий рибофлавін як відхід при виробництві ацетону з використанням ацетобутилових бактерій (*Clostridium acetobytylicum*)

На сучасному етапі розвитку науки вирішення проблем підвищеного синтезу рибофлавіну неможливе без детального вивчення механізмів регуляції його біосинтезу.

В Україні науковцями отримано генно-інженерний штам дріжджів з високою активністю рибофлавінкінази.

Відомо, що, використовуючи регуляторні мутанти мікроорганізмів, резистентні до дії аналогів, можна впливати на синтез окремих речовин у клітині, в тому числі і рибофлавіну.

Таблиця 1

Мікроорганізми, які синтезують рибофлавін

№ зп	Назви мікроорганізмів	Вихід рибофлавіну, мг/%
1	<i>Ashbyi gossipii</i>	6420
2	<i>Eremothecium ashbyii</i>	2480-6000
3	<i>Candida membrani faciens</i> subsp. <i>Flavinogenie</i> W 14-3	2200
4	<i>Bacillus subtillis</i> 62/p MX 30 rib0186	1240
5	<i>Candida flaveri</i>	567
6	<i>Bacillus subtillis</i> 24Al/p Mx 45	500
7	<i>Mycocandida riboflavina</i>	200
8	<i>Clostridium acetobytylicum</i>	97
9	<i>Mycobakterium smegmatis</i>	58

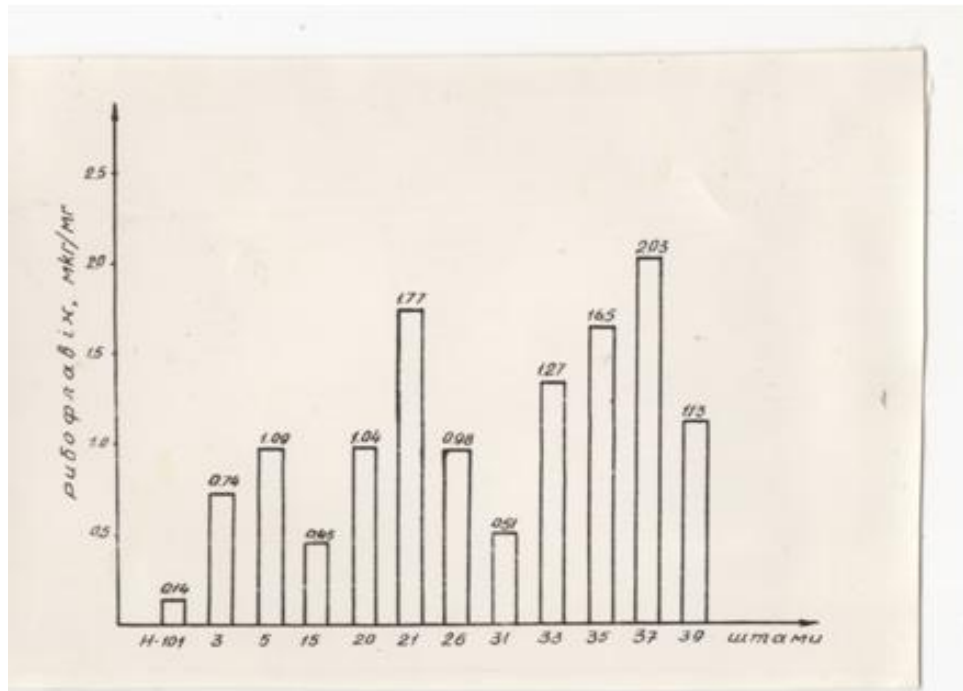


Рис. 1. Біосинтез рибофлавіну мутантами дріжджів *Candida guilliermondii* з блокованою гуаніндезаміназою, резистентних до 8-азагуаніну

Вважають, що попередниками ізоалаксазинової частини молекули вітаміну B₂ є гуанінові нуклеотиди, у зв'язку з чим являє інтерес вивчення механізмів регуляції процесів, які забезпечують клітину гуаніловими сполуками.

Нами як аналог гуаніну був використаний 8-азагуанін. Вихідною культурою для одержання мутантів, резистентних до дії 8-азагуаніну, був штам дріжджів *Candida guilliermondii* H-101 з блокованою гуаніндезаміназою. Мутагеном служили ультрафіолетові промені. Для виділення мутантів використовували метод відбитків.

При мікроскопуванні препаратів у поляризованому світлі вихідної культури дріжджів *Candida guilliermondii* і мутантів, резистентних до дії 8-азагуаніну штамів, вирощених на середовищі Беркгольда з гуаніном, було знайдено кристали цього пурину у вакуулярному апараті. Це підтверджує те, що мутанти, резистентні до дії 8-азагуаніну, не здатні дезамінувати гуанін та його аналоги. Це свідчить про те, що вони зберегли блок гуаніндезамінази.

Флавіногенну активність штамів дріжджів, резистентних до дії 8-азагуаніну, досліджували на середовищі Беркгольда з високим вмістом заліза. Всі мутанти, резистентні до дії 8-азагуаніну, синтезували у 3-14 рази більше рибофлавіну, ніж вихідна культура (рис. 1).

Про підвищений синтез рибофлавіну мутантами свідчить наявність кристалів рибофлавіну у культурах деяких штамів дріжджів, вирощених на агаризованому середовищі.

Висновки і перспективи подальших досліджень у даному напрямі. З усіх вітамінів групи В рибофлавін вважається найбільш дефіцитним для

організму і повинен регулярно поповнюватися ним ззовні. Рибофлавін широко використовується у виробництві харчових продуктів для їх вітамінізації у вигляді харчової добавки, для збагачення кормів у тваринництві і птахівництві, медицині, фармацевтичній промисловості. Сьогодні актуальними є питання збільшення його виробництва. Найбільш перспективним вважається виробництво рибофлавіну мікробіологічним способом. В цьому напрямі ведуться дослідження, спрямовані на створення більш ефективних технологій його виробництва, пошук мікроорганізмів-продуцентів, які би забезпечували високий вихід вітаміну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази / [О. П. Ішук, В. Ю. Яцишин, К. А. Дмитрук та ін.] // Український біохімічний журнал. – 2006, т. 78, № 5. – С. 63-64.
2. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Производство биологически активных веществ / Ю. М. Краснопольский, Н. В. Клещов. – Х. : НТУ “ХПИ”, 2013. – 304 с.
3. Нековаль І. В. Фармакологія / І. В. Нековаль, Т. В. Казанюк. – К. : ВСВ “Медицина”, 2011. – 520 с.
4. Поліщук В. Ю. Рибофлавін – виробництво і застосування. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : http://prombiotech.kpi.ua/materials/Polishchuk/Publication/ryboflavin_i_zastosuvannia.pdf.
5. Поліщук В. Ю. Вплив ультрафіолетового опромінення на біосинтетичну здатність гриба *Eremothecium ashbyi* / Поліщук В. Ю., Дуган О. М.

// Біотехнологія XXI століття : матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016 р.) [Електронне видання]. – К. : НТУУ “КПІ”, 2016.

6. Поліщук В. Ю. Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукується *Eremothecium ashbyi* Guill [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/23301/1/Polishchuk_diss.PDF.

7. Рибофлавін [Електронний ресурс]. – Режим доступу: uk.dobavka.m.net/additives/e-101.

REFERENCES

1. Henno-inzhenerne konstruiuvannya shtamiv flavinohennykh drizhdzhiv *Candida famata* z vysokoju aktyvnistiu ryboflavinkinazy, O. P. Ischuk, V. Yu. Yatsyshyn, K. A. Dmytruk ta in. (2006), *Ukrains'kyj biokhimichnyj zhurnal*, t. 78, № 5, s. 63-64.

2. Krasnopol'skyj, Yu. M. and Kleschov, N. V. (2013), *Farmatsevticheskaia byotekhnolohyia. Proyzvodstvo byolohychesky aktyvnykh veschestv*, NTU “KhPY”, Kh., 304 s.

3. Nekoval', I. V. and Kazaniuk, T. V. (2011), *Farmakolohiia*, VSV “Medytsyna”, K., 520 s.

4. Polischuk, V. Yu. Ryboflavin – vyrobnytstvo i zastosuvannia, available at : http://prombiotech.kpi.ua/materials/Polishchuk/Publication/ryboflavin_i_zastosuvannia.pdf.

5. Polischuk, V. Yu. and Duhan, O. M. (2016), *Vplyv ul'trafiolietovoho oprominennia na biosyntetychnu zdatnist' hryba Eremothecium ashbyi*, *Biotekhnolohiia KhKhl stolittia : materialy Kh Vseukrains'koi naukovo-praktychnoi konferentsii, prysviachenoj 135-j richnytsi vid dnia narodzhennia Oleksandra Flemma (22 kvitnia 2016 r.)* [Elektronne vydannia], NTUU “KPI”, K..

6. Polischuk, V. Yu. Rozrobka tekhnolohii vyrobnytstva ryboflavinu i efirnoi olii, scho produkuiet'sia *Eremothecium ashbyi* Guill, available at: https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/23301/1/Polishchuk_diss.PDF.

7. Ryboflavin, available at: uk.dobavka.m.net/additives/e-101.

Стаття надійшла до редакції 22 січня 2020 р.