

Решетило Л. І.,
к.т.н., доц., доцент кафедри товарознавства і технологій виробництва харчових продуктів,
Львівський торговельно-економічний університет, м. Львів

Лебединець В. Т.,
к.т.н., доц., доцент кафедри товарознавства і технологій виробництва харчових продуктів,
Львівський торговельно-економічний університет, м. Львів

МОЖЛИВОСТІ НАГРОМАДЖЕННЯ РИБОФЛАВІНУ МУТАНТАМИ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA QUILLERMONDII*

Анотація. На сучасному етапі вирішення проблеми підвищеного синтезу вітамінів, в тому числі і рибофлавіну, неможливе без детального вивчення механізмів регуляції їх біосинтезу. В роботі висвітлено можливості одержання мутантів, резистентних до дії 8-азагуаніну, та дослідження їх флавіногенної активності. Встановлено, що отримані мутанти не здатні дезамінувати гуанін та його аналоги, тобто вони зберегли блок гуаніндезамінази. Застосовуючи мутанти з порушеною регуляцією ІМФ-дегідрогенази, досліджено, що збільшення фонду гуанілових сполук в клітині сприяє нагромадженню значної кількості рибофлавіну під час вироцування дріжджів на середовищі з великим вмістом заліза. Дослідження мутантів, резистентних до дії 8-азагуаніну, підтверджують гіпотезу про природу пуринового попередника рибофлавіну та відкривають перспективу використання регуляторних мутантів для одержання високоактивних продуцентів вітаміну.

Ключові слова: дріжджі, синтез вітамінів, рибофлавін, мутанти, гуанін.

Reshetylo L. I.,
Ph.D., Associate Professor, Associate Professor of the Department of Commodity Research and Technologies of Food Production, Lviv University of Trade and Economics, Lviv

Lebedynets V. T.,
Ph.D., Associate Professor, Associate Professor of the Department of Commodity Research and Technologies of Food Production, Lviv University of Trade and Economics, Lviv

THE POSSIBILITIES OF AGGLOMERATION OF RIBOFLAVIN BY THE MUTANTS OF *CANDIDA QUILLERMONDII* YEAST

Abstract. At present stage the resolution of problem of increased synthesis of vitamins, including riboflavin, is impossible without a detailed study of the mechanisms of regulation of their biosynthesis. The article highlights the possibility of obtaining mutants resistant to the action of 8-azaguanine and the study of their flavinogenic activity. It was found, that obtained mutants are not able to desaminate guanine and its analogues, i.e. they retained the block of guanindesaminase. Using mutants with impaired regulation of IMF-dehydrogenase, it was investigated that increasing the fund of guanylic compounds in the cell contributes to the accumulation of large amounts of riboflavin while growing yeast in the environment with a high iron content. The study of mutants resistant to the action of 8-azaguanine supports the hypothesis about the nature of purine predecessor of riboflavin and open the perspective of using regulatory mutants to obtain highly active vitamin producers.

Keywords: yeast, synthesis of vitamins, riboflavin, mutants, guanine.

Постановка проблеми. У зв'язку з потребами народного господарства і медицини сьогодні значна увага приділяється виробництву високоактивних біологічних речовин. З точки зору цих завдань важливим є виробництво вітамінів, зокрема рибофлавіну. Рибофлавін та його коферментні форми з широко застосовуються як харчові (вітамінізація) і кормові добавки (премікси, комбікорми), компоненти вітамінних комплексів та інших форм. На сучасному етапі вирішення проблеми підвищеного синтезу

вітамінів неможливо без детального вивчення механізмів регуляції біосинтезу цих сполук.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Дослідженню механізму флавіногенезу присвячені роботи Хіннея, Шавловського, Сибірського, Диканської, Кшемінської, Логвиненко, Бахера, Лінгенса та ін.

Вивчення природи пуринового попередника рибофлавіну свідчить про те, що, можливо, з гуанілових нуклеотидів будуються ізоалаксазинова частина

молекули рибофлавіну. В цьому аспекті цікавим є вивчення механізму регуляції процесів, які забезпечують клітину гуаніловими сполуками. Вважають, що перспективним є одержання мутантів з пошкодженими механізмами регуляції біосинтезу гуанілової кислоти. Можна припустити, що у клітинах мутантів створюється надлишок гуанілових сполук, які використовуються для біосинтезу рибофлавіну. Такими мутантами можуть бути штами мікроорганізмів, стійкі до дії природних репресорів.

Постановка завдання. Метою роботи було одержання мутантів, резистентних до дії аналога гуаніну – 8-азагуаніну та дослідження їх флавіногенної активності.

Виклад основного матеріалу дослідження. Відомо, що регуляторні мутанти можна одержати, використовуючи селекцію, за допомогою аналогів метаболітів. Це так звані резистентні до дії аналогів мутанти. В нашій роботі таким аналогом гуаніну був використаний 8-азагуанін.

Вихідною культурою для одержання мутантів, резистентних до дії 8-азагуаніну, були штами дріжджів *Candida quilliermondii* з блокованою гуанін-дезаміназою. На відміну від прототрофної культури штам Н-101 не використовував гуанін як єдине джерело азоту. Аналог гуаніну 8-азагуанін значно пригнічував ріст мутанта Н-101. Для вирощування дріжджів *Candida quilliermondii* використовували середовище Беркхольдера, простерилізоване в автоклаві протягом 15 хвилин за тиску 0,5 атм. Його засівали суспензією дводобової культури дріжджів, вирощеної на суцільно-агарі. Дріжджі культивували на круговій качалці із швидкістю 200 об./хв в 50 мл колбах Ерленмейера, які містили 10 мл середовища. Вирощування дріжджів проводили за температури 29 °С.

Для виділення мутантів використовували метод відбитків. З культури дріжджів *Candida quilliermondii* готували суспензію у фізіологічному розчині, яка містила 10^6 клітин у 1 мл. Клітини опромінювали ультрафіолетовою лампою БУФ-15 з довжиною хвилі 254 нм протягом семи хвилин і висівали у пробірці з середовищем Беркхольдера, в яке додавали 8-азагуанін з розрахунку 40 мг/л. Як контроль використовували середовище без цього пурину. Дріжджі інкубували чотири дні на апараті для інкубування тканин. Для наступних досліджень відбирали пробірки з дріжджами, в яких ріст був однаковий з контролем, і висівали на чашки Петрі з агаризованим середовищем Беркхольдера з розрахунку 100-150 колоній на одну чашку. Інкубацію дріжджів проводили в термостаті за температури 29 °С. Через три доби робили відбитки на мінімальне середовище, в якому гуанін був єдиним джерелом азоту. Було досліджено 8450 колоній. Колонії дріжджів, які не росли на мінімальному середовищі, були відсіяні на суцільно-агар як шукані мутанти. В досліді нами були використані також аналогічні мутанти, одержані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету. Частота появи мутантів становила 0,07% за 2-3-відсоткового виживання клітин після опромінення ультрафіолетовими променями. Щоб перевірити, чи зберегли морфологічні зміни

одержані нами мутанти дріжджів, було досліджено форму клітин живих препаратів фазовоконтрастним мікроскопуванням на мікроскопі МБІ-6. Препарати готували з культур штамів дріжджів, які виростили на агаризованому суслі. Виявилось, що стійкі до дії 8-азагуаніну мутанти дріжджів зберегли морфологічні зміни, характерні для вихідної культури дріжджів *Candida quilliermondii* Н-101 і між собою майже не відрізнялися (рис. 1).



Рис. 1. Клітини мутантів дріжджів *C. Quilliermondii*, резистентні до дії 8-азагуаніну

Під час мікроскопування, у поляризованому світлі вихідної культури дріжджів Н-101 *Candida quilliermondii*, вирощеної на середовищі Беркхольдера з гуаніном, було знайдено кристали цього пурину у вакуольному апараті клітин. Встановлено, що і у резистентних до дії 8-азагуаніну штамів дріжджів спостерігається аналогічне явище. Це ще раз підтвердило, що мутанти, резистентні до дії 8-азагуаніну, не здатні дезамінувати гуанін та його аналоги, тобто вони зберегли блок гуанін-дезамінази.

Флавіногенну активність штамів дріжджів *Candida quilliermondii*, резистентних до дії 8-азагуаніну, перевіряли на середовищі Беркхольдера з високим вмістом заліза (0,2 мг/л). Біомасу визначали турбодинамічним методом на фотокалориметрі ФЕК-М в кюветі ємністю три мл при зеленому світлофільтрі. Рибофлавін визначали флуориметричним та спектрофотометричним методами. Флуоресценція зразків, що містили рибофлавін, замірялась на флуориметрі ЕФ-3. Спектрофотометрично рибофлавін визначали на спектрофотометрі СФ-4 А при довжині хвилі 445 нм. Для очищення культуральної рідини використовували властивість вугілля зв'язувати вітаміни, коферменти та похідні нуклеїнових кислот з наступним вимиванням останніх певними системами розчинників.

**Нагромадження біомаси та рибофлавіну мутантами дріжджів
Candida quilliermondii, резистентних до дії 8-азагуаніну**

Штам	Біомаса, мг/мл	Рибофлавін, мкг/мг сухих клітин
Н - 101	4,09 ± 0,18	0,149 ± 0,00
1	1,95 ± 0,34	0,370 ± 0,09
2	1,60 ± 0,20	0,367 ± 0,04
3	1,53 ± 0,04	0,740 ± 0,08
4	1,97 ± 0,18	0,712 ± 0,04
5	1,73 ± 0,03	1,091 ± 0,09
6	1,94 ± 0,05	0,661 ± 0,09
7	1,87 ± 0,07	0,762 ± 0,04
9	1,87 ± 0,21	0,728 ± 0,07
11	0,85 ± 0,19	0,399 ± 0,04
14	2,18 ± 0,12	0,405 ± 0,03
15	2,53 ± 0,11	0,452 ± 0,04
16	2,19 ± 0,08	0,473 ± 0,05
17	1,72 ± 0,04	0,640 ± 0,06
18	2,28 ± 0,06	1,077 ± 0,08
19	1,65 ± 0,06	1,037 ± 0,12
20	2,21 ± 0,05	1,049 ± 0,13
21	2,00 ± 0,17	1,770 ± 0,10
23	1,95 ± 0,24	0,635 ± 0,05
24	1,91 ± 0,06	0,394 ± 0,03
25	2,11 ± 0,19	0,649 ± 0,03
26	1,93 ± 0,20	0,986 ± 0,09
27	2,24 ± 0,06	0,526 ± 0,03
29	2,71 ± 0,09	1,031 ± 0,06
30	2,00 ± 0,19	0,436 ± 0,05
31	2,52 ± 0,06	0,516 ± 0,19
33	1,76 ± 0,06	1,276 ± 0,16
34	1,56 ± 0,10	0,331 ± 0,13
35	1,97 ± 0,03	1,652 ± 0,18
37	1,96 ± 0,10	2,039 ± 0,23
38	2,58 ± 0,07	1,453 ± 0,72
39	2,14 ± 0,09	1,134 ± 0,114
43	1,99 ± 0,10	0,660 ± 0,09

Дані про нагромадження біомаси та синтез рибофлавіну мутантами дріжджів *Candida quilliermondii*, резистентних до 8-азагуаніну, представлені в табл. 1.

Порівнянню з вихідною культурою дріжджів Н-101, біомаса одержаних мутантів була значно менша. Штам Н-101 нагромаджував до 4 мг сухої ваги в 1 мл середовища, а мутанти, резистентні до дії 8-азагуаніну, – від 0,85 до 2,70 мг/мл. Майже всі мутанти резистентні до дії 8-азагуаніну, синтезували в 3-14 разів більше рибофлавіну, ніж вихідна культура Н-101. Найбільш активним продуцентом рибофлавіну виявився штам №37, який синтезував до 2,039 мкг вітаміну на 1 мг сухих речовин. Про підвищений синтез рибофлавіну мутантами свідчить наявність кристалів рибофлавіну в культурах деяких штамів, вирощених на агаризованому середовищі (рис. 2).

Виходячи з того, що одержані мутанти можливо мають пошкоджені механізми регуляції біосинтезу ІМФ – дегідрогенази (першого ферменту на шляху утворення гуанілової кислоти), можна припустити, що

надлишки гуанілових сполук можуть нагромаджуватись в культуральній рідині на клітинах досліджуваних мутантів. У зв'язку з цим, досліджувався вміст УФ-абсорбуючих речовин у культуральній рідині та у водних екстрактах клітин штамів, що синтезували більше 1 мкг рибофлавіну на 1 мг сухих речовин.

З чотирьох добових культур мутантів, вирощених на середовищі Беркхольдера, відділяли клітини від культуральної рідини центрифугуванням пр. 6000 об./хв протягом 15 хвилин. Осад промивали дистильованою водою і заливали клітини певним об'ємом гарячої дистильованої води. Екстракцію пуринів з клітин проводили на киплячій водяній бані протягом 20 хвилин. Нагромадження УФ-абсорбуючих речовин у культуральній рідині та водних екстрактах клітин оцінювали за оптичною густиною, виміряною при 260 нм та рН 2,0. Для ідентифікації УФ-абсорбуючих речовин спектри поглинання культуральної рідини мутантів дріжджів вимірювали за оптичною густиною на спектрофотометрі СФ-4 А в

межах 220-440 нм при рН 2,0 із 12,0. Для з'ясування природи УФ-абсорбуючих речовин розраховували константи E_{250}/E_{260} та E_{280}/E_{260} .



Рис. 2. Кристали рибофлавіну, виявлені у культурі мутанта № 21 на агаризованому середовищі, фазовий контраст, збільшення 700-х

За характером УФ-абсорбуючих речовин які нагромаджувалися у культуральній рідині, мутанти поділилися на чотири групи. Мутанти першої групи нагромаджують речовини, спектрофотометричні константи (СФК) яких перебувають в межах 0,65-0,85, другої групи – в межах 0,23-1,34, третьої групи – в межах 0,39-1,16, четвертої групи – в межах 0,60-0,86. Ці дані свідчать про те, що мутанти різних груп нагромаджують різні за природою речовини. Найбільша кількість УФ-абсорбуючих речовин визначена у мутантах другої групи, які нагромаджують до 7,7 одиниць E_{260} – густини на 1 мл або 2,4 на одиницю біомаси. Слід зазначити, що вихідна культура дріжджів і мутанти Н-101 нагромаджують лише до 1,70 од./мл або 0,32 од./од. біомаси.

Поділ мутантів на групи за природою УФ-абсорбуючих речовин корелює в якійсь мірі з нагромадженням рибофлавіну в культуральній рідині. Так, мутанти першої, третьої і четвертої груп нагромаджують близько 1,0 мкг рибофлавіну на 1 мг сухих речовин, а другої групи значно більше – до 3,0 мкг на 1 мг сухих речовин. Ідентифікацію природи УФ-абсорбуючих речовин, що нагромаджуються у культуральній рідині окремих мутантів, проводили шляхом зняття спектрів поглинання в ультрафіолетовій зоні, використовуючи метод паперової хроматографії. Для очищення від зайвих органічних домішок нативну культуральну рідину пропускали через колонки з активованим вугіллем. Концентрована під вакуумом і очищена культуральна рідина була нанесена на смужки хроматографічного паперу і розділена в різних системах розчинників. Крім плям абсорбції, характерних для пуринових похідних на хроматограмах в ультрафіолеті виявили плями з голубою флуоресценцією.

Речовини, що нагромаджуються у культурі мутантів та у вихідного штама дріжджів Н-101, розділяються на плями абсорбції в системі ізопропанол 2Н НСІ і визначені лише як плями флуоресценції в

системі ізомасляна кислота – H_2O-NH_3 . В інших системах розчинників плями абсорбції і флуоресценції майже не зсувалися з лінії старту ($R_f = 0$).

Висновки та перспективи подальших досліджень у даному напрямі. На сучасному етапі актуальними є питання виробництва вітамінів, зокрема рибофлавіну, який широко використовується у харчовій промисловості для вітамінізації продукції, як кормова добавка, в медицині тощо. Питання про те, які пуринові сполуки використовуються клітиною для побудови рибофлавіну, не є остаточно вирішеним. Застосовуючи мутанти з порушеною регуляцією ІМФ-дегідрогенази, досліджено, що збільшення фонду гуанілових сполук в клітині сприяє нагромадженню значної кількості рибофлавіну під час вирощування дріжджів на середовищі з великим вмістом заліза. Отримання мутантів дріжджів, резистентних до дії 8-азагуаніну, є цікавим не тільки з теоретичного погляду. Відкривається перспективний метод одержання високоактивних продуцентів рибофлавіну – мутантів з порушеним механізмом регуляції біосинтезу попередників вітаміну. Дослідження мутантів, резистентних до дії 8-азагуаніну, ще раз підтверджують гіпотезу про природу пуринового попередника рибофлавіну та відкривають перспективу використання регуляторних мутантів для одержання високоактивних продуцентів вітаміну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Продуцирование витаминов микроорганизмами-деструкторами / Л. Е. Матросова, В. В. Часов, М. Я. Тремасов, А. М. Тремасова // *Аграрный вестник Урала*. – 2013. – № 3 (109). – С. 10-11.
2. Крякунова Е. В. Применение иммобилизованных микроорганизмов и ферментов / Е. В. Крякунова, А. В. Канарский // *Вестник Казанского технологического университета*. – 2012. – № 22. – Т. 15. – С. 101-105.
3. Шпичка А. И. К вопросу определения рибофлавина в биотехнологическом сырье / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова, А. В. Кузнецова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2011. – № 1. – С. 30-32.

REFERENCES

1. Matrosova, L.E. Chasov, V.V., Tremasov, M. Ja. and Tremasova, A.M. (2013), "Producirovanie vitaminov mikroorganizmami-destruktorami", *Agrarnyj vestnik Urala*, vol. 3 (109), pp. 10-11.
2. Krjakunova, E.V. and Kanarskij A.V. (2012), "Primenenie immobilizovannyh mikroorganizmov i fermentov", *Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta*, vol. 15. no. 2, pp. 101-105.
3. Shpichka, A.I. Semenova, E.F. and Kuznecova, A.V. (2011), "K voprosu opredelenija riboflavina v biotehnologieskom syr'e", *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*, vol. 1, pp. 30-32.