

РАДЧЕНКО М. М. ✉, БЕЙКО Н. Є., АНДРІЯШ Г. С., ТІГУНОВА О. О., ШУЛЬГА С. М.

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,  
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: shulga5@i.ua

✉ shulga5@i.ua, (044) 434-45-77

## ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТУ РИБОФЛАВІНУ

**Мета.** Мета дослідження полягала в отриманні штаму-продуценту рибофлавіну з природних джерел для розробки технології рибофлавіну. **Методи.** Штами-продуценти виділяли методом відбитків (реплік). Ідентифікацію штамів проводили за загальноприйнятими методиками з використанням «Визначника бактерій Берджі». Отримані клони перевіряли на накопичення рибофлавіну флуориметричним методом. **Результати.** Досліджено 9 природних джерел (бульб картоплі), з них виділено чисті культури мікроорганізмів та проведено їх ідентифікацію. Виявлено два типи колоній бактерій роду *Bacillus*. Виділені штами перевірено на чутливість до антибіотиків та здатність накопичення рибофлавіну. **Висновки.** В результаті досліджень виділено штам-продуцент рибофлавіну, штам класифіковано як *B. subtilis*. Під час культивування протягом 72 годин на середовищі з сахарозою штам накопичував 4,3 г/л рибофлавіну. Цей штам був прийнятий як вихідний для розробки технології рибофлавіну.

**Ключові слова:** рибофлавін, штам, мікробіологічний синтез, *Bacillus subtilis*.

Рибофлавін (вітамін В<sub>2</sub>) – органічна сполука, що бере участь у багатьох біохімічних процесах та використовується в медицині, фармакології, харчовій та комбікормовій промисловості. Використання рибофлавіну в тваринництві збільшує приріст маси тварин на 15 % та на 30 % знижує їх смертність [1]. Сьогодні, виробництво рибофлавіну у світі перевищує 3000 т/рік [2, 3]. В Україні промислового виробництва рибофлавіну немає.

Існують три основні способи одержання рибофлавіну – хімічний, мікробіологічний та поєднаний хіміко-мікробіологічний. З останнього способу частину речовини, а саме рибозу, отримують мікробіологічним способом, а з неї хімічним синтезом отримують вітамін В<sub>2</sub>. Для створення промислового виробництва рибофлавіну необхідно мати високопродуктивний штам,

який міг би використовувати доступний та дешевий субстрат.

**Мета** дослідження полягала в отриманні штаму-продуценту рибофлавіну з природних джерел для розробки технології рибофлавіну.

### Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були культури мікроорганізмів, виділені з природних джерел, а саме з поверхні овочевих культур (картоплі). Для виділення чистої культури мікроорганізмів використовували метод відбитків (реплік). На циліндр діаметром 8 см накладали стерильний фільтрувальний папір. Папір туго натягували та закріплювали металевим кільцем. На циліндр накладали вихідний матеріал із колоніями і обережно притискали так, щоб на папері залишилися відбитки колонії. Папір із відбитками прикладали до чашок Петрі зі стерильним твердим середовищем. Чашки витримували в термостаті за температури 38°C протягом 72 годин. Підраховували загальну кількість мікроорганізмів і відбирали культури, які відповідали культурально-морфологічним ознакам колоній роду *Bacillus*. Відібрані культури пересівали для подальшого дослідження. Ідентифікацію штамів проводили за загальноприйнятими методиками з використанням «Визначника бактерій Берджі» [4].

**Умови культивування та середовища.** Для вирощування штамів-продуцентів рибофлавіну використовували такі поживні середовища: збагачений м'ясо-пептонний агар (зМПА) (склад: м'ясо-пептонний бульйон – 0,1 л, глюкоза – 0,1 г, дріжджовий екстракт – 0,5 г, агар – 2,0 г), рН 7,0±0,1 та L агар (склад: екстракт дріжджовий – 5,0 г; натрій хлористий – 5,0 г; пептон – 5 г; агар – 25 г; вода дистильована – до 1 л), рН 7,2±0,1. Для отримання поодиноких колоній брали 0,5•10<sup>-3</sup> л та 1,0•10<sup>-3</sup> л культуральної рідини з розведень 10<sup>-6</sup> та 10<sup>-7</sup> відповідно і переносили в чашки Петрі, які потім заливали двома різними середовищами (зМПА та L-агаром), охолодженими до температури 45±3°C. Інкубацію здійс-

© РАДЧЕНКО М. М., БЕЙКО Н. Є., АНДРІЯШ Г. С., ТІГУНОВА О. О., ШУЛЬГА С. М.

нювали в термостаті за температури  $38 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 72 годин. Усі колонії, які виростили на твердих середовищах, відбирали для культивування та перевірки накопичення рибофлавіну. Для культивування мікроорганізмів використовували середовище такого складу: сахароза – 80 г/л; дріжджовий екстракт – 32 г/л; зерновий екстракт – 10 г/л; гідроортофосфат калію – 8 г/л; сульфат магнію – 0,6 г/л; сечовина – 0,8 г/л; дистильована вода – додавали до мітки 1,0 дм<sup>3</sup>.

Культивування бактерій проводили протягом 96 годин з інтервалом 12 годин у шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) за температури  $38^\circ\text{C}$  і за швидкості 240 об/хв. Ріст штамів-продуцентів рибофлавіну на твердих живильних середовищах оцінювали візуально, за наявністю росту та зміною забарвлення середовища у жовтий колір навколо колонії; на рідких середовищах – вимірюванням концентрації клітин у культуральній рідині (КР) за оптичною густиною (ОГ). ОГ визначали за допомогою фотоелектроколориметра (модель КФК-3, РФ) в кюветях ( $d=5$  мм) за довжини хвилі 440 нм, рН середовища вимірювали за допомогою цифрового рН-метра (рН метр 150, РБ). Мікроскопіювання проводили за допомогою мікроскопа «Laboval 4» («Carl Zeiss», Німеччина). Фотографії робили за допомогою фотоапарата «Canon PowerShot A640» (Японія). Для визначення відношення до фарбування за Грамом проводили дослідження з використанням відповідних барвників. Вітальне фарбування проводили з використанням барвника метиленового синього [5]. Культурально-морфологічні особливості штаму визначали за методикою [6]. Кількість амонійного азоту визначали згідно з методикою з використанням реактиву Несслера [7]. Засвоєння вуглеводів

визначали за допомогою методики [8]. Для визначення відношення до антибіотиків нових штамів-продуцентів використовували диски з такими антибіотиками: ампіциліном, полімексином, гентоміцином, неоміцином, цепазіном, тобраміцином, еритроміцином, хлорамфеніколом та стрептоміцином [9]. Кількість синтезованого рибофлавіну визначали флуориметричним методом за допомогою флуориметра ЕФ – 3МА (Росія).

Статистичну обробку даних було виконано за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в 3 повтореннях. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною за  $P < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Бактерії роду *Bacillus* широко розповсюджені у природному середовищі. Їх знаходять на поверхні листків рослин, у каналах слізозотечі дерев, повітрі, ґрунті та мулі прісних і морських водойм. Найбільш характерним природним їх місцем знаходження є поверхня бульб картоплі та насіння рослин. Чисельність цих бактерій у літній період сягає багатьох сотень тисяч клітин на 1 г субстрату. Нами було досліджено 9 зразків бульб картоплі (табл. 1). Загальну кількість мікроорганізмів у зразках визначали за методом Виноградського у модифікації Шульгіної [10], кількість повторень кожного зразка – 12.

В усіх зразках було виявлено різні колонії мікроорганізмів: аскоміцети, дріжджі, бактерії. Визначивши кількість мікроорганізмів у зразках, підібрали потрібне розведення для виділення чистої культури.

Таблиця 1. Кількість мікроорганізмів у зразках

Зразок	Кількість мікроорганізмів, млн. КУО/г
1	$150 \pm 6$
2	$109 \pm 4$
3	$910 \pm 18$
4	$200 \pm 9$
5	$600 \pm 22$
6	$843 \pm 20$
7	$430 \pm 17$
8	$761 \pm 33$
9	$234 \pm 10$

Методом граничних розведень [11] провели розсіювання та виділили чисту культуру бактерій роду *Bacillus*. Виявлено два типи колоній (типові колонії – світло-жовті, неправильної форми та колонії амебоподібної форми жовто-коричневого кольору (рис. 1).

У процесі культивування відібраних штамів *Bacillus* відбувалося розщеплення на два типи колоній у співвідношеннях, наведених на рис. 2.

Із рис. 2 видно, що серед колоній було більше світло-жовтих (87 %). Подальші пересіви та очищення дали змогу виділити два незалежних клони роду *Bacillus* з різною морфологією колоній. Ці клони не розщеплювалися та не змінювали свої характеристики протягом 10 пересівів. Морфологія клітин, фарбування за Грамом, здатність до синтезу рибофлавіну також не відрізнялися.

Було проведено перевірку двох клонів із різним забарвленням за кількістю накопичення рибофлавіну в середовищі (рис. 3). Культивування здійснювали протягом 96 годин.

У культиваційному середовищі на 24 годину культивування рибофлавін був присутній в незначній кількості (1,6 г/л за культивування світло-жовтих колоній та 1,1 г/л за культивування жовто-коричневих), тобто протягом першої доби відбувалася адаптація мікроорганізмів до нового поживного середовища. Під час подальшого культивування світло-жовті колонії роду *Bacillus* накопичували більше рибофлавіну, ніж жовто-коричневі. Активне утворення рибо-

флавіну відбувалося на 48 годину і досягало максимальних величин на 72 годину культивування (4,3 г/л і 2,1 г/л – за культивування світло-жовтих та жовто-коричневих колоній відповідно). На 96 годину культивування накопичення рибофлавіну знижувалося (3,6 г/л і 1,9 г/л – за культивування світло-жовтих та жовто-коричневих колоній відповідно). Можливо, це пов'язано з використанням мікроорганізмами рибофлавіну для підтримки своєї життєдіяльності.

Колонії із світло-жовтим та жовто-коричневим забарвленням розсівали методом граничних розведень, відібрали 10 клонів (номери згідно табл. 2) і провели дослідження їх здатності до накопичення рибофлавіну. Кількість рибофлавіну визначали на 72 годину культивування.

У процесі ферментації клони світло-жовтого забарвлення (клони 2, 5 та 9) продукували найбільшу кількість рибофлавіну (3,9; 4,3 та 4,2 г/л відповідно). Клон з жовто-коричневим забарвленням накопичували рибофлавіну менше. Клон 5, який продукував 4,3 г/л рибофлавіну, відібрали для подальшого дослідження. Було проведено ідентифікацію клону за «Визначником бактерій Берджі» та встановлено його культуро-морфологічні та фізіологічно-біохімічні особливості. Колонії клону 5 мали світло-жовте забарвлення. Бактерії були грам-позитивними, аеробними, спороносними, паличкоподібними (рис. 4).

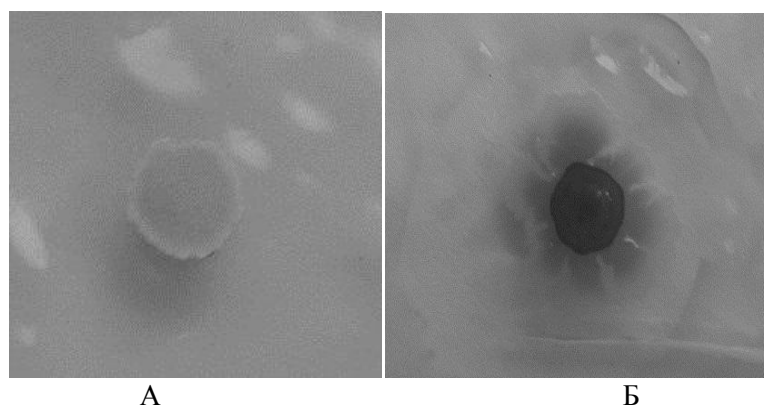


Рис. 1. Два типи колоній бактерії роду *Bacillus* – світло-жовті (А) та жовто-коричневі (Б).



Рис. 2. Співвідношення різних типів колоній у культурі.

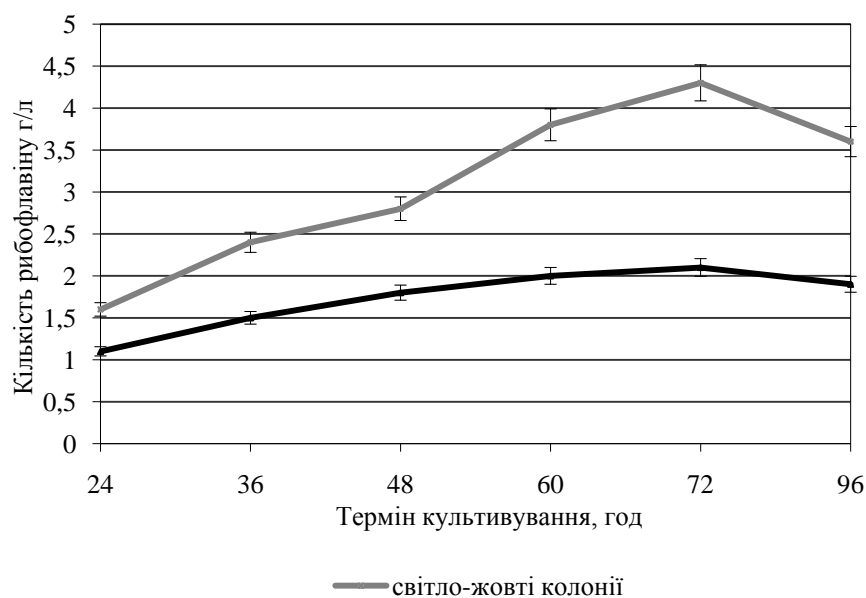


Рис. 3. Накопичення рибофлавіну різними типами колоній роду *Bacillus*.

Таблиця 2. Накопичення рибофлавіну клонами штамів *Bacillus*

№ Клону	Пігмент колоній	Концентрація рибофлавіну, г/л
1	Жовто-коричневий	1,8±0,16
2	Світло-жовтий	3,9±0,35
3	Жовто-коричневий	2,0±0,14
4	Жовто-коричневий	2,1±0,14
5	Світло-жовтий	4,3±0,37
6	Світло-жовтий	3,5±0,28
7	Світло-жовтий	3,3±0,21
8	Жовто-коричневий	2,0±0,15
9	Світло-жовтий	4,2±0,30
10	Жовто-коричневий	1,9±0,14

Через 24 години культивування в зразках було виявлено прямі паличкоподібні клітини розміром 0,4 – 2,0 x 1,3 – 5,0 мкм, розташовані поодинокі, попарно або ланцюжком. Бактерії росли на м'ясо-пептонному агарі (МПА) та сусло-агарі. На МПА вони утворювали колонії світло-жовтого кольору, неправильної форми, з гладенькою поверхнею. Колонії мали дрібнозморшкуватую форму, були непрозорі, матові, пастоподібні і частково інтеркалювали в агар. Ріст у рідкому середовищі супроводжувався помутнінням середовища, утворенням плівки сіро-білого кольору і осаду з овальних спор розміром 0,9 x 0,6 мкм (рис. 4). Розташування спор у материнській клітині було центральним, розтягування клітини не спостерігалось. У процесі культивування на середовищі з арабінозою

і манітом відбувалося зменшення рН. Бактерії гідролізували крохмаль та засвоювали азот у вигляді солей амонію. В середовищах різного складу, де джерелом вуглецю була сахароза, клітини накопичували рибофлавін у кількості 4,3 г/л.

У процесі досліджень було перевірено штам за ознакою стійкості бактерій до антибіотиків (табл. 3).

Із наведених даних видно, що виділений штам *B. subtilis* був чутливим до антибіотиків пеніцилінового ряду, мало чутливим до стрептоміцину і тетрацикліну та проявляв стійкість до еритроміцину та хлорамфеніколу. Отримані дані дозволили в подальшому культивувати штам з використанням еритроміцину та хлорамфеніколу для уникнення інфікування.

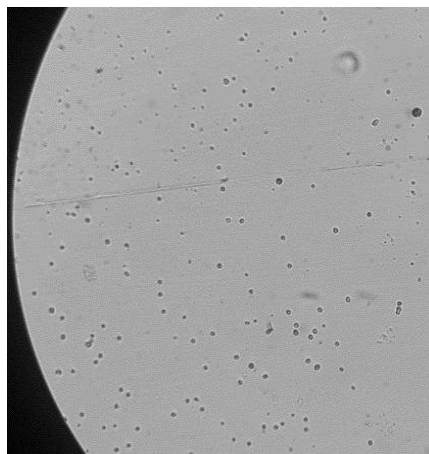


Рис. 4. Спори штаму *B. subtilis* (збільшення 10x40).

Таблиця 3. Чутливість штаму-продуценту рибофлавіну до антибіотиків

Антибіотик	<i>B. subtilis</i>
Ампіцилін	+
Полімексін	-
Стрептоміцин	+
Левоміцин	++
Тетрациклін	+
Гептоміцин	++
Неоміцин	++
Цепарін	++
Тобраміцин	++
Еритроміцин	-
Хлорамфенікол	-

Примітки: \*«-» – культура не чутлива, «+» – культура мало чутлива, «++» – культура чутлива.

**Висновки**

Виділено штам-продуцент рибофлавіну, який накопичував 4,3 г/л рибофлавіну, на середовищі з глюкозою та сахарозою на 72 години культивування. Проведено ідентифікацію штаму за «Визначником бактерій Бердже» та кла-

сифіковано штам як *B. subtilis*. Штам *B. subtilis* депоновано (номер ІМВ В-7797) в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Цей штам було прийнято для подальших досліджень і визначено як вихідний для розробки технології рибофлавіну.

**References**

1. Berezovskii V.M. Khimiia vitaminov. Moskva: Pishchevaia promyshlennost', 1973. 632 s. [in Russian] / Березовский В.М. Химия витаминов. М.: Пищевая промышленность, 1973. 632 с.
2. Survase S.A., Singhal R.S., Bajaj I.B. Biotechnological Production of Vitamins. *Food Technol. and Biotechnol.* 2006. № 44. P. 381–396.
3. Vandamme E., Revuelta J. Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016. 581 p.
4. Stahmann K.P., Revuelta J., Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 2000. Vol. 53, № 5. P. 509–516.
5. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3. The Firmicutes. USA: Springer, 2009. 1449 p.
6. Eremina I.A. Laboratornyi praktikum po mikrobiologii: Uchebnoe posobie. Kemerovo: Kemerovskii tekhnologicheskii institut pishchevoi promyshlennosti, 2005. 112 s. [in Russian] / Еремина И. А. Лабораторный практикум по микробиологии: Учебное пособие. Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2005. 112 с.
7. Pimenova M.N., Grechushina N.N., Azova L.G. Rukovodstvo k prakticheskim zaniatiim po mikrobiologii. Moskva: Izd. Moskovskogo universiteta, 1971. 220 s. [in Russian] / Пименова М.Н. Гречушина Н.Н., Азова Л.Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Изд. Московского университета, 1971. 220 с.
8. Labinskaia A.S. Obshchaia i sanitarnaia mikrobiologiia s tekhnikoI mikrobiologicheskikh issledovaniI. Moskva: Medicina, 2004. 576 s. [in Russian] / Лабинская А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 2004. 576 с.
9. Тереп Е.З., Шил'никова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по биологии. М.: Колос, 1979. 216 с. [in Russian] / Тепер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по биологии. М.: Колос, 1979. 216 с.
10. Концева І.І. Мікробіологія: культивування і рости бактерій. Prakticheskoe rukovodstvo dlia stud. biologich. spec. vuzov. Chernigov: Desna Poligraf, 2017. 44 s. [in Russian] / Концева И.И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биол. спец. вузов. Чернигов: Десна Полиграф, 2017. 44 с.

**RADCHENKO M. M., BEYKO N. E., ANDRIASH G. S., TIGUNOVA O. O., SHULGA C. M.**

*SU «Institute for food biotechnology and genomics NAS of Ukraine»,  
Ukraine, 04123, Kyiv, Osyrovskogo str., 2A, e-mail: shulga5@i.ua*

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A STRAIN PRODUCING RIBOFLAVIN**

**Aim.** Aim of investigation was to receive riboflavin strain-producers using natural sources for development of riboflavin technology. **Methods.** Strain-producers were isolated by the method of imprints (replica). The identification of stains was done by commonly used techniques using the «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology». The resulting clones were tested for accumulation of riboflavin by fluorometric method. **Results.** 9 natural sources (seeds of corn and potato tubers) were investigated, pure cultures of microorganisms were isolated and their identification was carried out. Two types of bacterial colonies of the genus *Bacillus* were identified. Selected strains were retested for antibiotic susceptibility and for the ability to accumulate riboflavin. **Conclusions.** As a result of the research, strain-producing riboflavin is isolated, the strain is classified as *B. subtilis*. The strain accumulated 4.3 g / l of riboflavin in a sucrose medium during a 72 hours cultivation. This strain was accepted as a source for the development of riboflavin technology.

**Keywords:** riboflavin, stain, microbial synthesis, *Bacillus subtilis*.