

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

РАДЧЕНКО МАРИНА МИХАЙЛІВНА

УДК 663.18:577.222

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОТРИМАННЯ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТА *BACILLUS SUBTILIS* З
ПІДВИЩЕНИМ НАКОПИЧЕННЯМ РИБОФЛАВІНУ**

Спеціальність – 091 – біологія
Галузь знань – 09 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М.М. Радченко

Науковий керівник: Шульга Сергій Михайлович, доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник.

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Радченко М.М. – Отримання штаму-продуцента *Bacillus subtilis* з підвищеним накопиченням рибофлавіну. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2023.

Актуальним завданням щодо подальшого удосконалення і розвитку технології отримання рибофлавіну мікробіологічним способом є збільшення біосинтетичної здатності бактерії-продуцента шляхом вдосконалення її властивостей, умов культивування та розширення асортименту субстратів. Вирішення цих проблем потребує створення високопродуктивних штамів, які здатні позаклітинно продукувати цільові речовини (амінокислоти, вітаміни). У зв'язку з цим особливий інтерес викликають біосинтетичні властивості бактерії виду *Bacillus subtilis*.

Дисертаційна робота присвячена виділенню та селекціонуванню нових штамів-продуцентів рибофлавіну. Метою роботи було виділити культуру роду *Bacillus* з природних джерел, а саме поверхні овочевих культур, за допомогою методу відбитків, і отримати штаму-продуцент з підвищеним накопиченням рибофлавіну.

На першому етапі роботи було проведено огляд літературних джерел та проаналізовано результати наукових робіт стосовно існуючих мікроорганізмів-продуцентів рибофлавіну, методів підвищення їх активності, особливостей процесу культивування та промислового виробництва.

Для пошуку бактерій, що синтезують рибофлавін, було досліджено 9 зразків бульб картоплі сорту Адретта, зібраних на полях в передмісті міста Києва. Для дослідження візуально оцінювали стан та якість коренеплодів, розмір бульб, пошкодження шкідниками і хворобами, наявність зовнішніх

дефектів і пошкоджень, наростів, обдертої шкірки. Зразки для подальших досліджень візуально відбирали з жовтуватим нальотом на поверхні, який міг свідчити про наявність мікроорганізмів, що продукують рибофлавін. Для виділення чистої культури мікроорганізмів використовували метод відбитків (реплік). Відбитки вихідного матеріалу із колоніями переносили до чашок Петрі зі стерильним агаризованим LB середовищем і витримували в термостаті за температури 38 °C протягом 72 год. В усіх зразках було виявлено суміші культур, тому, для виділення чистих культур мікроорганізмів, які продукували рибофлавін, надалі було проведено розсіювання методом граничних розведень. У результаті з 9 зразків бульб картоплі було виділено 10 культур з забарвленням колоній різного кольору. З культурами, що походили із двох типів колоній, для яких була властива морфологія, характерна для бактерій роду *Bacillus*, було проведено культивування у рідкому середовищі та визначено здатність до накопичення рибофлавіну. Концентрації рибофлавіну і вологої біомаси бактерій визначалася за допомогою спектрофотометричних методів. Показано, що мікроорганізми з жовто-коричневим забарвленням колоній накопичували менше рибофлавіну, ніж мікроорганізми із світло-жовтим забарвленням. Методом граничних розведень отримали чисту культуру мікроорганізмів з найбільшим накопиченням рибофлавіну для подальшого встановлення її культурально-морфологічних особливостей.

Характеристики отриманої культури мікроорганізмів та культурально-морфологічні ознаки виділеного продуцента рибофлавіну за «Визначником бактерій Бердже» вказують на приналежність продуцента до виду *B. Subtilis* (ізолят IFBG). Антибіотикочутливість і морфологічні властивості штамів визначалися загальноприйнятими мікробіологічними методами.

За допомогою філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК штаму продуцента було підтверджено, що виділений штам належить до виду *B. subtilis*. Виділення ДНК, ПЛР-аналіз, секвенування ДНК проводили за допомогою загальноприйнятих молекулярно-генетичних методів. Результати

порівняльного аналізу з використанням алгоритму BLASTN виявили що послідовність гена 16S рРНК ізолята на 99% ідентична з послідовністю гена 16S рРНК *B. subtilis* IAM 12118.

Отриманий штам-продуцент рибофлавіну, внесено до «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для сільськогосподарської та промислової біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за номером IFBG МК-2 та депоновано в «Національній Депозитарії мікроорганізмів» Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером IMB В-7797.

Секвеновані послідовності гена 16S рРНК штаму *B. subtilis* IMB В-7797 (IFBG МК-2) зареєстровано в базі даних GenBank з реєстраційними номерами MK880455 і MK880456, (пряма та зворотня послідовність).

Стабільність властивостей культури після пересівів та під час зберігання є надзвичайно важливою характеристикою. Показано, що зберігання штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* IMB В-7797 у ліофілізованому вигляді протягом 12 місяців за температури 4 °С суттєво не вплинуло на продуктивність та життєздатність продуцента. На цій підставі зроблено висновок, що культуру можна використовувати для досліджень в умовах пілотних установок.

Для культивування мікроорганізмів має значення склад середовища та параметри культивування, які забезпечували б високий рівень накопичення необхідних метаболітів, зокрема, рибофлавіну. Визначено оптимальні параметри культивування для максимального накопичення рибофлавіну штамом...: кількість посівного матеріалу (10 % від кількості ензиматичного середовища) та термін його культивування (16 годин). Досліджено вплив джерел вуглецю на накопичення рибофлавіну та показано, що найбільше накопичення рибофлавіну спостерігалось в середовищі з глюкозою як джерелом вуглецю. Визначено оптимальні умови культивування, що підвищило накопичення рибофлавіну у культуральній рідині. Встановлено оптимальну концентрацію глюкози (120 г/дм³) в ензиматичному середовищі та

оптимальні температуру культивування (38 °С), рН культурального середовища (7,0) і термін культивування – 72 год. Показано, що синтез рибофлавіну можна підвищити за допомогою змін умов культивування більше ніж в 2 рази (з 4,3 г/дм³ до 8,9 г/дм³), в порівнянні з неоптимізованими умовами культивування.

Для підвищення продуктивності штамів-продуцентів важливих метаболітів використовують методи класичної селекції, індукованого мутагенезу і генної інженерії. Проведено інтенсифікацію накопичення рибофлавіну за допомогою УФ мутагенезу та отримано стійкий до УФ випромінювання штам роду *Bacillus* IFBG МК-1А, який продукував на 45 % більше рибофлавіну в порівнянні з вихідним штамом ІМВ В-7797. Встановлено, що штам отриманий після УФ опромінення (*B. subtilis* IFBG МК-1А) відрізнявся за культурально-морфологічними ознаками від вихідного штаму. Для штаму IFBG МК-1А виявилось характерним утворення колоній меншого розміру, що набували коричневого кольору з візуально видимими кристалами рибофлавіну.

Для подальшого збільшення накопичення рибофлавіну, було проведено обробку культури IFBG МК-1А мутагеном N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном (НГ) і визначено вплив хімічного мутагенезу на життєздатність клітин бактерій. Досліджено вплив дії хімічного мутагену НГ, визначено тривалість обробки мутагеном (30 хвилин) та його оптимальну концентрацію (50 мкг), за якої загибель клітин склала 98,75 %. У результаті дії НГ на штам *B. subtilis* IFBG МК-1А отримано мутантний штам *B. subtilis* IFBG NTG2, який за морфологічними ознаками (колір, розмір, форма колоній) і накопиченням рибофлавіну відрізнявся від вихідної культури. Отриманий штам-продуцент рибофлавіну *B. subtilis* IFBG NTG2 накопичував рибофлавін майже на 9 % більше (14,8 г/дм³), ніж вихідний штам (13,9 г/дм³).

Масштабування процесу культивування штаму-продуцента рибофлавіну IFBG МК-1А проводили в біореакторі об'ємом 10 дм³ з підживленням. Культивування штаму в біореакторі проводили за допомогою

стандартних біотехнологічних методів. Показано, що за культивування штаму в колбах об'ємом 1 дм³ та об'ємом ферментаційного середовища 0,250 дм³, накопичення рибофлавіну становило 13,9 г/дм³ на 66-ту год. культивування. За культивування штаму IFBG МК-1А у біореакторі з періодичним підживленням істотно збільшувалось накопичення рибофлавіну (на 65 %) порівняно з накопиченням рибофлавіну в колбах. Встановлено, що оптимальний об'єм внесення підживлення становив 47 %, а кількість аміачної води, необхідної для стабілізації рН та накопичення рибофлавіну, – 8 % від об'єму середовища до інокуляції. Визначено, що конверсія глюкози склала 12 %, накопичення рибофлавіну – 19,1 г/дм³ (за умов культивування з підживленням).

Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили за стандартними методиками за допомогою програми Microsoft Excel 12,0.

Штами *B. subtilis* ІМВ В-7797, IFBG МК-1А і IFBG NTG2 в подальшому пропонуються для використання в промисловій технології рибофлавіну і для створення на їх основі рекомбінантного штаму для надсинтезу рибофлавіну.

Ключові слова: рибофлавін, штам-продуцент, *Bacillus subtilis*, культивування, мікробіологічний синтез, мутагенез

SUMMARY

Radchenko M.M. – Generation of *Bacillus subtilis* strain-producer with increased accumulation of riboflavin. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Thesis is for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy (PhD), specialty 091 Biology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

An urgent task for the further improvement and development of riboflavin technology is to increase the biosynthetic capacity of the producer bacterium by improving its properties, cultivation conditions, and expanding the range of substrates. Solving these problems requires the creation of highly productive strains capable of producing target substances extracellularly. In this regard, the biosynthetic properties of the bacterium *Bacillus subtilis* are of particular interest.

The thesis is devoted to the obtaining and selection of new riboflavin-producing strains. The aim of the work was to isolate the novel strains of the genus *Bacillus* from natural sources, namely the surface of vegetable crops, using the fingerprint method and to obtain a producer strain with increased accumulation of riboflavin.

At the first stage of the work, a review of literature sources was carried out and the results of previous scientific works were analyzed regarding the existing microorganisms producing riboflavin, methods of increasing their biological activity, features of the cultivation process and industrial production.

In order to search for riboflavin-synthesizing bacteria, 9 samples of potato tubers of the Adretta variety, collected in the fields of Kyiv suburban area, were examined. For the study, the condition and quality of roots, the size of tubers, damage by pests and diseases, the presence of external defects and damages, growths, and torn skin were visually assessed. Samples for further research were visually selected with a yellowish coating on the surface, which could indicate the presence of microorganisms that produce riboflavin. To isolate a pure culture of microorganisms, the imprint method (replica) was used. Prints of the original material with colonies were transferred to Petri dishes with a sterile solid medium and kept in a thermostat at a temperature of 38 °C for 72 h. Mixtures of cultures were detected in all samples, therefore, in order to isolate pure cultures of microorganisms that produced riboflavin, scattering by the limiting dilution method was carried out. As a result, 10 cultures with colonies of different colors were isolated from 9 samples of potato tubers. Two types of colonies characteristic of the genus *Bacillus* were cultured on a liquid medium and the ability to accumulate riboflavin was determined.

Concentrations of riboflavin and biomass of bacteria were determined using spectrophotometric methods. It was shown that microorganisms with yellow-brown colored colonies accumulated less riboflavin than those with light yellow color. A pure culture of microorganisms with the greatest accumulation of riboflavin was obtained by the method of limiting dilutions for further establishment of its cultural and morphological features.

The characteristics of the obtained pure culture of microorganisms and the cultural and morphological characteristics of the isolated producer of riboflavin indicate that the producer belongs to the species *B. subtilis* according to the «Berge's Identifier of Bacteria». Antibiotic sensitivity and morphological properties of strains were determined by generally accepted microbiological methods.

Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence of the producer strain confirmed that the selected strain belongs to the species *B. subtilis*. Isolation of DNA, PCR analysis, sequencing of genetic material was carried out using molecular genetic methods. The results of the comparative analysis using the BLASTN algorithm revealed 99 % similarity of the obtained total fragment with the sequence of this gene of the typical strain *B. subtilis* IAM 12118.

The riboflavin-producing strain obtained was included in the «Collection of strains of microorganisms and plant lines for agricultural and industrial biotechnology» of the Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine under the number IFBG MK-2 and deposited in the «National Depository of Microorganisms» of the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology National Academy of Sciences of Ukraine under ID number IMV B-7797.

The sequenced sequences of the 16S rRNA gene of *B. subtilis* strain IMV B-7797 (IFBG MK-2) are registered in the GenBank database with registration numbers MK880455 and MK880456.

Stability of crop properties after transplanting and during storage is an extremely important characteristic. It was shown that storage of the riboflavin-producing strain *B. subtilis* IMV B-7797 in a lyophilized form for 12 months at a

temperature of 4 °C did not significantly affect the productivity and viability of the producer. On this basis, it was concluded that the culture can be used for research in the conditions of pilot plants.

For the cultivation of microorganisms, the composition of the medium and cultivation parameters are important, which would ensure a high level of accumulation of necessary metabolites, in particular, riboflavin. The optimal cultivation parameters for the maximum accumulation of riboflavin were determined: the amount of inoculum material (10 % of the amount of enzymatic medium) and the duration of its cultivation (16 hours). The effect of carbon sources on the accumulation of riboflavin was studied and it was shown that the greatest accumulation was in the medium with glucose as a carbon source. Optimal cultivation conditions were determined, which increased the accumulation of riboflavin in the culture liquid. The optimal concentration of glucose (120 g/dm³) in the enzymatic medium and the optimal cultivation temperature (38 °C), the pH of the culture medium (7,0) and the cultivation period - 72 h were established. It was shown that the synthesis of riboflavin can be increased by changing the cultivation conditions more than 2 times (from 4,3 g/dm³ to 8,9 g/dm³), compared to non-optimized cultivation conditions.

Methods of classical selection, induced mutagenesis and genetic engineering are used to increase the productivity of strains. Intensification of riboflavin accumulation was carried out using UV mutagenesis and a resistant strain of the genus *Bacillus* was obtained, which produced 45 % more riboflavin compared to the original strain IMV B-7797. It was established that the strain obtained after UV irradiation (*B. subtilis* IFBG MK-1A) differed in cultural and morphological characteristics from the original strain. Strain IFBG MK-1A had smaller, brown colonies with visible riboflavin crystals.

To increase the accumulation of riboflavin, the culture of IFBG MK-1A was treated with the mutagen N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine and the effect of chemical mutagenesis on the viability of bacterial cells was determined. The effect of the action of a chemical mutagen was studied, the duration of mutagen treatment

(30 minutes) and its optimal concentration (50 µg), at which cell death was 98,75 %, were determined. As a result of the action of a chemical mutagen on the *B. subtilis* IFBG MK-1A strain, a mutant *B. subtilis* IFBG NTG2 strain was obtained, which differed from the original culture in terms of morphological features (color, size, shape of colonies) and accumulation of riboflavin. The resulting riboflavin-producing strain *B. subtilis* IFBG NTG2 accumulated almost 9 % more riboflavin (14,8 g/dm³) than the original strain (13,9 g/dm³).

Scaling of the cultivation process of riboflavin-producing strain IFBG MK-1A was carried out in a bioreactor with a volume of 10 dm³ with feeding. Cultivation of the strain in the bioreactor was carried out using standard biotechnological methods. It was shown that when the strain was cultivated in flasks with a volume of 1 dm³, the accumulation of riboflavin was 13,9 g/dm³ at the 66th hour of cultivation. During the cultivation of strain IFBG MK-1A in a bioreactor with periodic feeding, the accumulation of riboflavin significantly increased (by 65 %) compared to the accumulation of riboflavin in flasks. It was found that the optimal volume of feeding was 47 %, and the amount of ammonia water required for pH stabilization and riboflavin accumulation was 8 % of the volume of the medium before inoculation. It was determined that the conversion of glucose was 12 %, the accumulation of riboflavin was 19,1 g/dm³ (for cultivation with feeding).

Statistical processing of the results of experimental studies was carried out according to standard methods of the Microsoft Excel 12,0 program.

The strains of *B. subtilis* IMV B-7797, IFBG MK-1A and IFBG NTG2 are further proposed for use in the industrial technology of riboflavin and to create a recombinant strain based on them for over synthesis of riboflavin.

Key words: riboflavin, producer strain, *Bacillus subtilis*, cultivation, microbiological synthesis, mutagenesis

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у періодичних виданнях.

1. Радченко, М.М., Тігунова, О.О., Андріяш, Г.С., Шульга, С.М. та Блюм, Я.Б., 2022. Особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *Bacillus subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з підживленням. *Доповіді Національної академії наук України*. 6, С. 79–84. <http://dspace.nbuiv.gov.ua/handle/123456789/187904> (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).
2. Радченко, М.М., Андріяш, Г.С., Бейко, Н.Є., Тігунова, О.О. та Шульга С.М., 2022. Отримання штаму-продуценту *Bacillus subtilis* із підвищеним накопиченням рибофлавіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 31, С. 77-82. <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v31.1488> (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).
3. Radchenko, M. M., Tigonova, O. O., Zelena, L. B., Beiko, N. Y., Andriiash, H. S. and Shulga, S. M., 2021. Phylogenetic Analysis of the *Bacillus subtilis* IFBG МК-2 Strain and Riboflavin Production by Its Induced Clones. *Cytology and Genetics*. 55(2), P. 145–151. Doi: 10.3103/s0095452721020134 Q3 (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).
4. Radchenko, M. M., Andriiash H., Beyko N., Tigonova O. O., and Shulga S. M. 2020. Optimization of the cultivation conditions of the riboflavin strain producer. *Biotechnologia Acta*. 13(2), P. 48–55. Doi: 10.15407/biotech13.02.048 (Особистий внесок здобувача: участь у

проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

5. Радченко, М.М., Бейко, Н.Є., Андріяш, Г.С., Тігунова, О.О. та Шульга С.М., 2019. Виділення та ідентифікація штаму-продуценту рибофлавіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 24, С. 154-159. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1094> (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

Тези доповідей у матеріалах конференцій

1. Radchenko, M.M., Beiko, N.E., Tigonova, O.O., Andriiash, G.S., Priyomov, S.G. and Shulga, S.M., 2022. Improvement of *Bacillus subtilis* strain producer for riboflavin accumulation increased. *All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*, June 15-17. Online. P. 104.
2. Радченко, М. М., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С., 2021. Вдосконалення штаму-продуценту рибофлавіну *Bacillus Subtilis* хімічним мутагенезом. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 23 квітня. Київ. Україна. С. 81.
3. Метейко, Д.О., Радченко, М.М., Тігунова, О. О., та Андріяш Г. С., 2021. Визначення вмісту рибофлавіну в розчинах флуориметричним методом. *Topical issues of modern science. Society and education. Proceedings of the 3rd International scientific and practical conference*, 26-28 December. Kharkiv. Ukraine. P. 83-85.
4. Радченко, М. М., Бейко, Н. Є., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С., 2020. Виділення штаму-родуценту рибофлавіну з природних джерел.

- «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 20 травня. Київ. Україна. С. 156.*
5. Радченко, М. М., Бейко, Н. Є., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С., 2020. Вплив джерела вуглецю на синтез біомаси та накопичення рибофлавіну штамом *Bacillus subtilis*. *«Біотехнологія XXI століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 20 травня. Київ. Україна. С. 157.*
 6. Radchenko, M.M., Andriiash G.S., Beyko N.E., and Pryiomov S.G., 2019. Staine-producer of riboflavin *Bacillus Subtilis* antibiotic resistance investigation. *«Біотехнологія XXI століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 19 квітня. Київ. Україна. С. 67.*
 7. Метейко, Д. О., Радченко, М. М., Тігунова, О. О. та Шульга С. М., 2019. Штами-надпродуценти рибофлавіну. *«Біотехнологія XXI століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 19 квітня. Київ. Україна. С. 52.*
 8. Радченко, М.М., Тігунова, О.О, Андріяш, Г. С., та Бейко Н. Є., 2018. Накопичення рибофлавіну штамом *Bacillus subtilis* за використання різної концентрації посівного матеріалу. *Біотехнологія: досвід, традиції та інновації: збірник наукових праць II міжнародної науково-практичної інтернет-конференції. 15 листопада. Київ. Україна. С. 82.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОФЛАВІНУ, ПРОДУЦЕНТИ ТА ПРОМИСЛОВЕ ВИРОБНИЦТВО	24
1.1. Загальна характеристика рибофлавіну	24
1.2. Способи отримання рибофлавіну	31
1.3. Продуценти рибофлавіну	33
1.4. Біосинтез рибофлавіну у бактерій.....	36
1.5. Структура, організація та регуляція рибофлавінового оперону <i>Bacillus subtilis</i>	39
1.6. Біохімічні та генетичні особливості синтезу рибофлавіну у рекомбінантного продуцента <i>Bacillus subtilis</i>	41
1.7. Промислове виробництво рибофлавіну.....	44
1.8. Тривале зберігання культури та ліофілізація.....	48
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	55
2.1. Умови культивування та поживні середовища для виділення та ідентифікація штамів-продуцентів рибофлавіну	55
2.2. Філогенетичний аналіз	58
2.3. Ліофілізація штамів роду <i>Bacillus</i>	59
2.4. Методи дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей <i>B.</i> <i>subtilis</i> IMB B-7797	62
2.5. Дослідження впливу мутагенних факторів на штам-продуценти рибофлавіну	65
2.5.1. Мутагенез за допомогою ультрафіолетового випромінювання... 65	
2.5.2. Хімічний мутагенез з використанням NTG..... 66	
2.6. Культивування штаму-продуцента рибофлавіну в біореакторі	67
2.6.1. Умови та процес культивування в біореакторі..... 68	
2.7. Статистичне оброблення експериментальних результатів	69

РОЗДІЛ 3 ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ РИБОФЛАВІНУ	71
3.1. Виділення мікроорганізмів з природних джерел	71
3.2. Ідентифікація виділених мікроорганізмів і дослідження їх фізіологічних та біохімічних властивостей.....	76
3.3. Ліофілізація штаму <i>B. Subtilis</i> IFBG NTG2 для тривалого зберігання.....	85
РОЗДІЛ 4. ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТА	89
4.1. Вплив терміну культивування інокуляту на накопичення біомаси та рибофлавіну	89
4.2. Вплив кількості внесеного інокуляту на накопичення біомаси та рибофлавіну штамом <i>B. subtilis</i> IMB B-7797.....	90
4.3. Вплив величини рН на синтез біомаси та рибофлавіну штамом <i>B. subtilis</i> IMB B-7797.....	94
4.4. Динаміка накопичення рибофлавіну штамом <i>B. subtilis</i> IMBB-7797.....	95
РОЗДІЛ 5 УФ-МУТАГЕНЕЗ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТА РИБОФЛАВІНУ	97
5.1. Чутливість мікроорганізмів до дії УФ-опромінення <i>B. subtilis</i> IFBG МК-1А	97
5.2. Морфологія та життєздатність бактеріальної культури <i>B. subtilis</i> IFBG МК-1А після опромінення	98
5.3. Накопичення рибофлавіну індукованими штамми <i>B. subtilis</i> IFBG МК-1А	100
РОЗДІЛ 6 ХІМІЧНИЙ МУТАГЕНЕЗ З ВИКОРИСТАННЯМ NTG ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТА РИБОФЛАВІНУ	104
6.1. Життєздатність клітин <i>B. subtilis</i> IFBG NTG2 під дією мутагену.104	
6.2. Морфологічна гетерогенність культури <i>B. subtilis</i> IFBG NTG2, отриманої за дії NTG.....	105
6.3. Накопичення рибофлавіну штамом <i>B. subtilis</i> IFBG NTG2.....	107

РОЗДІЛ 7 ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТА В БІОРЕАКТОРІ З ПІДЖИВЛЕННЯМ.....	110
7.1. Культивування штаму-продуцента <i>B. subtilis</i> IFBG МК-1А у біореакторі	111
РОЗДІЛ 8 УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	116
ВИСНОВКИ.....	122
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	124
ДОДАТКИ.....	143
ДОДАТОК А Список публікацій здобувача.....	143
ДОДАТОК Б Довідка про непатогенність штаму.....	146
ДОДАТОК В Паспорт на штам.....	149
ДОДАТОК Г Свідоцтво про первісне депонування	150

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АТФ – аденозинтрифосфат;
АДФ – аденозиндифосфат;
БПБ – бобово-пептонний бульон;
ДЕ – дріжджовий екстракт;
ДНК – дизоксирибонуклеїнова кислота;
ЕМС – етилметансульфонат;
ЗМПА – збагачений м'ясо-пептоний агар;
КоА – кофермент А;
КУО – колонієутворюючі одиниці;
КЕ – кукурудзяний екстракт;
КР – культуральна рідина;
МПА - м'ясо-пептоний агар;
МПБ – м'ясо-пептоний бульйон;
МПЖ – м'ясопептона желатина;
МС – мінімальне середовище;
НАДН – никотинамідаденіндинуклеотид (відновлена форма);
ОГ – оптична густина;
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
ПН – пар нуклеотидів
ПС – повноцінне середовище;
рРНК – рибосомні рибонуклеїнові кислоти;
СР – сухі речовини;
УФ – ультрафіолет;
ФЕК – фотоелектроколориметр;
ШКТ – шлунково-кишковий тракт
ІФВГ – ІХБГ – Інститут харчової біотехнології та геноміки;
NTG – N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідін

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Рибофлавін (вітамін В₂) бере участь у багатьох біохімічних та інших процесах в організмі людини та вищих тварин. Рибофлавін використовують в медицині, фармакології, харчовій промисловості та як добавка до кормів.

Рибофлавін належить до вітамінів, для яких розроблено декілька технологій промислового синтезу, серед яких: мікробіологічний синтез; хімічний синтез; та комбінований, який включає мікробіологічне отримання рибози з наступною хімічною модифікацією її в рибофлавін. Хімічний синтез рибофлавіну проходить у декілька стадій з усіма можливими недоліками та складнощами, на відміну від мікробіологічного способу, який дозволяє виробляти рибофлавін в одну стадію. Вибір методу залежить від стану і перспектив сировинної бази та інших кон'юнктурних умов ринку. В останні роки відновився інтерес до мікробіологічного синтезу рибофлавіну [14, 24], тому питання економічного споживання вуглецевого субстрату, зниження витрат у процесі синтезу, а також проблеми максимально повної трансформації субстрату у цільові метаболіти в промисловому масштабі набувають особливої актуальності.

Рибофлавін за мікробіологічного способу отримують із клітин промислових штамів грибів *Eremothecium gossypii* [14-21], *Candida famata* var. *flasheri* та бактерій *Bacillus subtilis*, досягаючи титру 15, 18 та 20 г/дм³, відповідно. Дослідження останніх років підтверджують необхідність вивчення особливостей і характеристик продуцентів рибофлавіну та створення оптимальної технології виробництва вітаміну В₂ для подальшої її комерціалізації. Світовий ринок виробництва рибофлавіну збільшився за 20 років більш ніж удвічі (з 4000 т/рік в 2002 р. і до 10000 т/рік в 2022 р.), і постійно зростає. Приблизно 70 % рибофлавіну використовуються як кормова

добавка і близько 30 % – в фармацевтиці та як харчова добавка. В Україні виробництво рибофлавіну відсутнє.

Для створення сучасної комерційної біотехнології виробництва рибофлавіну необхідні високопродуктивні штами-продуценти, які отримують шляхом створення нових або вдосконалення існуючих штамів-продуцентів за використання методів класичної селекції, генної інженерії та біоінформатики. В Інституті біології клітини НАН України було сконструйовано надпродуценти рибофлавіну дріжджами *Candida famata*, які мали втричі вищу продуктивність біосинтезу вітаміну B₂ внаслідок введення додаткових копій гена позитивного регулятора біосинтезу рибофлавіну SEF1 у геном раніше селекціонованого штаму, здатного до надсинтезу рибофлавіну та підібрано умови для отримання максимального накопичення цільового продукту [51, 108].

Зростаючий інтерес викликали дослідження бактерії *B. subtilis*, яка в природних умовах виробляє вітамін B₂ для підтримки життєдіяльності свого організму. Бактерії виду *B. subtilis* є одними з найбільш розповсюджених об'єктів мікробіології та класичної генетики і мають високий ступінь толерантності. Бактерії *B. subtilis* можуть рости в широкому діапазоні значень температури, рН та інших фізіологічних параметрів. Подальше вдосконалення і розвиток технології рибофлавіну та збільшення біосинтетичної здатності *B. subtilis* шляхом вдосконалення властивостей продуцента, умов культивування та розширення асортименту субстратів є важливою складовою наукових досліджень для досягнення здорового способу життя населення, що підтверджує актуальність і важливість даної роботи в сучасних умовах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в Державній установі «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» в рамках відомчої тематики лабораторії промислової та харчової біотехнології

«Створення штамів надпродуцентів вторинних метаболітів (амінокислот, спиртів, вітамінів)» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U101489).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – виділити культуру роду *Bacillus* з природних джерел та отримати штам-продуцент з підвищеним накопиченням рибофлавіну.

Для досягнення поставленої мети сформульовано такі завдання:

- виділити штамми-продуценти рибофлавіну із природних джерел;
- дослідити фізіологічні та культурально-морфологічні властивості виділених штамів-продуцентів;
- провести ідентифікацію виділених штамів-продуцентів за допомогою секвенування гена 16S рРНК;
- оптимізувати умови культивування штаму-продуцента рибофлавіну;
- отримати за допомогою хімічного та фізичного мутагенезу штамми-продуценти з підвищеним накопиченням рибофлавіну;
- встановити особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* в біореакторі «Sartorius Biostat B TWIN».

Об'єкт дослідження – процес накопичення вітаміну В₂ під час культивування бактерій роду *Bacillus*.

Предмет дослідження – зміна рівня синтезу рибофлавіну штамми роду *Bacillus* під впливом мутагенезу та оптимізації умов культивування.

Методи дослідження. Антибіотикочутливість і морфологічні властивості штамів визначали загальноприйнятими мікробіологічними методами. Концентрації рибофлавіну і біомаси бактерій визначали за допомогою спектрофотометричних методів. Виділення ДНК, ПЛР-аналіз, секвенування генетичного матеріалу нового штаму проводили молекулярно-генетичними методами. Мутагенез культури проводили за допомогою методів хімічного (N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном) та фізичного (ультрафіолетове опромінення) впливу. Культивування штаму в біореакторі проводили

стандартними біотехнологічними методами. Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили за стандартними методиками програми Microsoft Excel 12,0.

Наукова новизна одержаних результатів. Виділено та селекціоновано нові штами-продуценти рибофлавіну *B. subtilis* IMB B-7797, *B. subtilis* IFBG МК-1А та *B. subtilis* IFBG NTG2. Визначено нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК виділеного штаму *B. subtilis* IMB B-7797 (IFBG МК-2) та проведено його філогенетичний аналіз. Секвеновану послідовність гена 16S рРНК штаму *B. subtilis* IMB B-7797 було зареєстровано в базі даних GenBank з реєстраційними номерами МК880455 і МК880456. За допомогою ультрафіолетового (УФ) мутагенезу отримано новий штам (*B. subtilis* IFBG МК-1А) з підвищеним накопичення рибофлавіну. За допомогою УФ мутагенезу та хімічного мутагенезу з використанням N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину отримано клони штаму з підвищеним накопичення рибофлавіну. Для отриманих штамів-продуцентів рибофлавіну визначено оптимальні параметри культивування.

Практичне значення одержаних результатів. Отримано штами-продуценти рибофлавіну *B. subtilis* IMB B-7797, *B. subtilis* IFBG МК-1А та *B. subtilis* IFBG NTG2, які внесено до «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для сільськогосподарської та промислової біотехнології» Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України». Культуру *B. subtilis* IMB B-7797 депоновано в «Національному Депозитарії мікроорганізмів» Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Отримано за допомогою мутагенезу стійкий штам роду *Bacillus* IFBG МК-1А, який продукував в 3,2 рази більше рибофлавіну в порівнянні з вихідним штамом. Показано, що культивування штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А в біореакторі з періодичним підживленням призводить до збільшення накопичення рибофлавіну на 65 % у порівнянні з накопиченням рибофлавіну в колбах.

Отримані результати є науковим підґрунтям для отримання промислових штамів-продуцентів рибофлавіну.

Особистий внесок здобувача. Вибір теми роботи, постановку мети та наукових завдань досліджень, аналіз та наступну інтерпретацію отриманих результатів, розробку структури дисертаційної роботи та підготовку публікації за результатами проведених досліджень здійснено спільно з науковим керівником д.б.н., с.н.с. Шульгою С.М.

Основні дослідження – виділення чистої культури, оптимізація умов культивування та проведення хімічного та фізичного мутагенезу було проведено автором особисто.

Наукові роботи опубліковано у співавторстві з д.б.н., проф. академіком НАН України Я.Б. Блюмом, д.б.н. С.М. Шульгою, к.б.н. Л.Б. Зеленою, к.б.н. Г.С. Андріяш, к.б.н. О.О. Тігуною та н.с. Н.Є. Бейко. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації доповідалися на XV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття», присвяченої 20-річчю Факультету біотехнології та біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського (Київ, Україна, 2021), Третій міжнародній науковій та практичній конференції (Харків, Україна, 2021), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченій 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (Київ, Україна, 2020), Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2019), III Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації» (Київ, Україна, 2019), II Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації» (Київ, Україна, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт, в тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях, 8 тез доповідей наукових конференцій.

Структура та обсяги роботи. Робота викладена на 151 сторінках тексту. Вона складається зі вступу, 7 основних розділів, а також висновків, додатків та списку використаних джерел (157 найменувань). Дисертація містить 39 рисунки, 13 таблиць, чотири додатки.

Автор висловлює вдячність науковому керівнику доктору біологічних наук, провідному науковому співробітнику С.М. Шульзі за наукове керівництво та консультації; співробітникам лабораторії промислової та харчової біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» к.б.н. Тігуновій О.О., к.б.н. Андріяш Г.С., Бейко Н.Є. за допомогу у проведенні досліджень, наукові консультації і моральну підтримку, а також к.б.н., с.н.с. Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Зеленій Л.Б. за допомогу у проведенні молекулярно-генетичного аналізу 16S рРНК бактерій.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОФЛАВІНУ, ПРОДУЦЕНТИ ТА ПРОМИСЛОВЕ ВИРОБНИЦТВО (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Загальна характеристика рибофлавіну

Рибофлавін (вітамін В₂) – органічна сполука, що бере участь у багатьох біохімічних процесах та використовується в медицині, фармакології, харчовій та комбікормовій промисловості (рис. 1.1.).

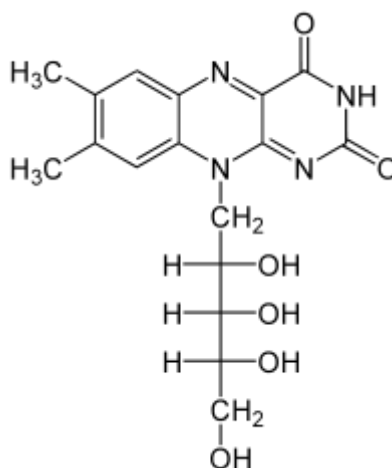


Рис. 1.1. 7,8-Диметил-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-тетрагідрокси-пентил]-бензо[*g*]птеридин-2,4(3*H*,10*H*)-діон, або 6,7-диметил-9-(1'-D-рибітил)-ізоаллоксазин [22]

Офіційно визнана назва вітаміну В₂ – рибофлавін. Раніше його також називали вітамін G, лактофлавін, овофлавін, гепатофлавін, вердофлавін та урофлавін [128]. Більшість з цих назв вказують на джерело, з якого даний вітамін був виділений – молоко, яйця, печінка, рослини та сеча [22]. Рибофлавін входить до групи водорозчинних вітамінів комплексу В, за структурою це 7,8-діметил-10-(1-D-рибітил)-ізоаллоксазин [6]. Рибофлавін належить до флавінів, в основі будови яких лежить гетероциклічна ізоаллоксазинова система, яка має три конденсованих цикли: ароматичний,

піразиновий та піримідиновий [45]. До азоту піримідинового кільця приєднаний спирт рибітол. Рибофлавін функціонує в двох коензимних формах, які є його фосфорними ефірами: флавінмононуклеотид (ФМН) та флавінаденіндинуклеотид (ФАД) (рис. 1.2) [76].

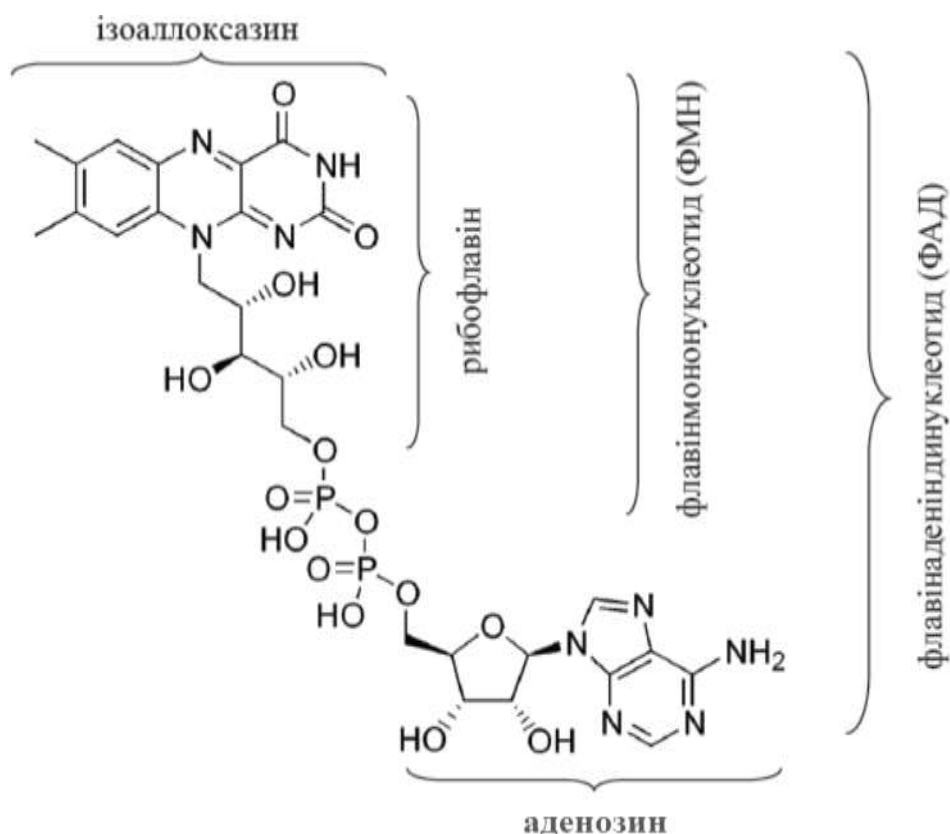


Рис. 1.2. Структура рибофлавіну та флавінових коферментів [3]

Рибофлавін кристалізується у вигляді помаранчево-жовтих голок з температурою плавлення 282 °С, нерозчинний в жирах та в розчинниках жирів, слабо розчинний у воді. За температури 27,5 °С насичений водний розчин містить 0,012 % рибофлавіну, за 40 °С – 0,01944 %, а за 100 °С – 0,23 % [13]. У лужному середовищі рибофлавін краще розчинний ніж у нейтральному. Рибофлавін слабо розчинний в нормальному бутиловому, аміловому, етиловому (0,0045 % за 27,5 °С) та метиловому спиртах [13]. Рибофлавін помірно розчинний у льодяній оцтовій та мурашиній кислотах. Рибофлавін добре розчинний у соляній кислоті.

В нейтральних водних розчинах рибофлавін має зеленкувато-жовте забарвлення (забарвленість вітаміну зумовлена наявністю азометинового групування $R-C=N-R$) з інтенсивною жовто-зеленою флуоресценцією, яка зменшується до зникнення як у кислому, так і в лужному середовищі (максимум за рН 6–7) [13].

У лужному середовищі рибофлавін переходить в люміфлавін, який розчинний у хлороформі і не володіє біологічними властивостями вітаміну B_2 [76]. Рибофлавін – світлочутлива жовта речовина. Світлочутливість рибофлавіну зумовлена наявністю вільної гідроксильної групи в другому положенні бічного ланцюга. За дії світла в нейтральному та кислому середовищі рибофлавін перетворюється на біологічно неактивний люміхром, який володіє сильною блакитною флуоресценцією. Пряме сонячне світло швидко руйнує рибофлавін за будь-якого значення рН. Найбільш згубну дію на рибофлавін мають промені світла з довжиною хвилі 440 нм [4].

Спектр поглинання рибофлавіну (у воді) має один максимум у видимій частині спектру за довжини хвилі 445 нм та три максимуми в ультрафіолетовій частині спектра за довжини хвилі 372, 269 і 225 нм. Спектр флуоресценції знаходиться в жовто-зеленій області (максимум 530 нм). Флуоресценція пов'язана з наявністю вільної аміногрупи у третьому положенні кільця піримідину [26].

Іншою властивістю рибофлавіну є його здатність до зворотнього окислення та відновлення (рис. 1). Відновлення рибофлавіну до дигідрорибофлавіну відбувається шляхом послідовного приєднання атомів водню в першому та п'ятому положеннях з утворенням проміжного напіввідновленого семіхінонового радикалу. Відновлена форма рибофлавіну може окиснюватися повітрям [19].

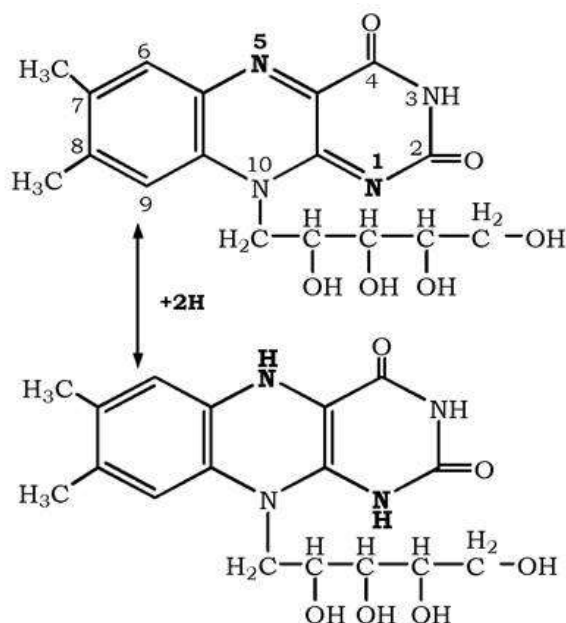


Рис. 1.3. Відновленн та оборотне окиснення рибофлавіну до дигідрорибофлавін [2]

Основною функцією рибофлавіну в клітині є його участь в якості прекурсора в синтезі флавінових коферментів (ФМН і ФАД) [26]

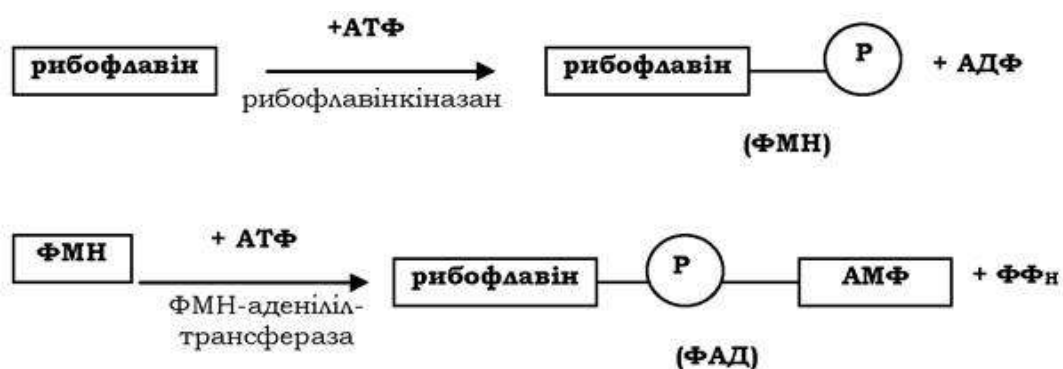


Рис. 1.4. Схема участі рибофлавіну в синтезі флавінових коферментів [3]

Флавопротеїни беруть участь у регуляції окисно-відновного потенціалу клітин. У клітині, спільно з глутатіонредуктазою, рибофлавін бере участь у підтримці достатнього рівня глутатіону і, в такий спосіб, має антиоксидантну дію. Часто рибофлавін, опосередковано через глутатіон, бере участь в інактивації активних форм кисню, тим самим запобігаючи перекисному окисненню ліпідів мембран [79, 88].

Флавіни, що потрапляють в організм людини з їжею, звільняються у шлунку під дією кислот і потім всмоктуються у верхній частині тонкого кишечника за допомогою транспортного механізму за участі жовчних кислот. В клітинах слизової оболонки кишечника рибофлавін перетворюється в коферментну форму ФМН. Далі він зв'язується з плазматичним альбуміном та переноситься у печінку, де перетворюється в другу коферментну форму – ФАД і зв'язується з спеціальними білками – флавіновими протеїнами [4, 67, 102].

Рибофлавін можна безпечно використовувати як індикатор аерозольних крапель за допомогою УФ-світла для зменшення поширення інфекцій з повітряно-крапельним механізмом передачі [70]. Рибофлавін та його нові синтезовані похідні можуть використовуватися як фотосенсибілізатори у фотодинамічній терапії ракових захворювань шкіри [84]. Процес біосинтезу рибофлавіну та його похідних є перспективним для розробки нових антибактеріальних (зокрема антимікобактеріальних препаратів, враховуючи відсутність транспортера рибофлавіну в *Mycobacterium tuberculosis*) [78]. Лікування вітиліго також може здійснюватися шляхом використання рибофлавіну, використовуючи його інгібуючий потенціал при депігментації шкіри [91]. Рибофлавін та його транспортери є перспективними біомаркерами для діагностики та терапії раку [65]. Вітамін В₂ має антиоксидантний потенціал у терапії станів, що супроводжуються окислювальним стресом [114].

Експериментальні дослідження також показали і роль рибофлавіну в інгібуванні патогенетичних механізмів виникнення мігрені [154]. Рибофлавін зменшує патологічну гіпертрофію серця та фіброз через вплив на коротколанцюгову ацил-КоА-дегідрогеназу [118]. Можливе використання похідних рибофлавіну у фотодинамічній інактивації вірусів і антибіотикорезистентних бактерій [89]. Рибофлавін можна використовувати для зшивання та зміцнення амніотичної оболонки людини під УФ-світлом,

досліджується його вплив на культуру стовбурових клітин жирового походження. Пероральне введення рибофлавіну перед гінекологічними операціями покращує візуалізацію сечоводів, викликаючи жовте забарвлення сечі [144]. Рибофлавін має антикандидозну дію широкого спектру та може бути використаний у терапії орофарингеального кандидозу, зазвичай спричиненого інфекцією *Candida albicans* [72].

Рибофлавін може бути використаний для розробки лікарських засобів для неінвазивної терапії кератоконусу. Вживання рибофлавіну у пацієнтів з хворобою Крона протягом 3-ох тижнів привело до зниження системного окислювального стресу, помітних протизапальних ефектів та зменшення клінічної симптоматики. Для покращення біомеханічних властивостей, стабільності та біосумісності децелюризованих серцевих клапанів може використовуватися реакція фотозшивання рибофлавіном та УФ-світлом [95].

Рибофлавін є одним з найбільш широко розповсюджених вітамінів. Він міститься у всіх тваринних та рослинних клітинах, але лише деякі продукти є багатими джерелами даного вітаміну [19]. Найбільша концентрація рибофлавіну спостерігається у дріжджах (2 мг/100 г) та печінці (1,6–2,2 мг/100 г), але найбільш розповсюдженими дієтичними джерелами рибофлавіну є молоко та молочні продукти (0,013–0,17 мг/100 г), м'ясо (0,14–0,23 мг/100 г), яйця (0,32–0,44 мг/100 г), овочі та зелень [4, 22]. Рибофлавін з тваринних продуктів засвоюється краще, ніж з рослинних джерел. У коров'ячому, овечому та козиному молоці не менше 90 % рибофлавіну знаходиться у вільній формі, в більшості інших джерел він зв'язаний з білками. Норми вітаміну B₂, що рекомендуються до вживання для різних груп населення, становлять 1,5–2,4 мг на добу [4, 32, 58].

Рибофлавін застосовують за гіпо- та арибофлавінозу екзо- та ендогенного походження, гемералопії, кон'юнктивіті, іриті, кератиті, помутніння рогівки, катаракті, ранах та виразках, що довго не загоюються, променевій хворобі, астенії, хейліті, кутовому стоматиті (заїди), глоситі,

зудячому дерматозі, екземі, нейродерміті, фотодерматозі, себореї, красних вуграх, кандидозі, вірусному гепатиті А, хронічному гепатиті, цирозі печінки, порушеннях функції шлунково-кишкового тракту (ШКТ), гіпотрофії, анемії, лейкозі. З профілактичною метою – при зниженні всмоктування з ШКТ, інтенсивній елімінації та збільшенні потреби в рибофлавіні (гостра і хронічна гіпоксія, дихальна та серцева недостатність, опікова хвороба, обмороження, нестача білкового та надлишок вуглеводного харчування, гострі інфекційні захворювання, також при лікуванні протимікробними засобами, що пригнічують грам-негативну флору кишечника, фототерапія) [22, 128].

В останні роки було встановлено, що вітамін В₂ є ефективним за лікування мігрени [37], малярії [34] та хвороби Паркінсона [45]. Встановлено, що рибофлавін має клінічно-важливий вплив на зниження артеріальної гіпертензії [45]. На сьогоднішній день токсичність рибофлавіну не встановлена [157].

Рибофлавін застосовується у сільському господарстві. Використання препарату у тваринництві збільшує приріст тварин та птахів до 15 %, на 30 % знижує смертність, на 3 % збільшує яйценосність у курей та на 6 % виведення курчат [22, 128, 157].

За даними різних авторів, потреба свиней в рибофлавіні становить 3-4 мг на 1 кілограм кормів [128, 157]. Потреба птиці у вітаміні В₂ знаходиться в межах 4-6 мг на 1 кг кормів [28, 128]. Незбагачені вітамінними добавками корми, які використовуються в сільському господарстві, містять лише від 1 до 2 мг рибофлавіну на 1 кг, а отже додавання вітаміну В₂ в корми є обов'язковим. Як така добавка може застосовуватися кормовий рибофлавін, вироблений за допомогою промислових штамів-продуцентів на основі *B. subtilis* і *E. ashbyi* [22, 47, 62, 78].

1.2. Способи отримання рибофлавіну

На даний час, виробництво рибофлавіну у світі перевищує 10000 т/рік [147, 157]. В Україні промислового виробництва рибофлавіну немає. Промислове виробництво рибофлавіну здійснюється трьома способами: хімічним синтезом, мікробіологічним синтезом та змішаним способом, який включає мікробний синтез рибози з наступною хімічною модифікацією її в рибофлавін [79]. За комбінованого методу мікроорганізми вирощують на середовищі, що містить 18-20 % глюкози, з додаванням L-триптофану і L-тироzinу.

При хімічному синтезі рибофлавіну основні методи зводяться до отримання 3,4-диметил-6-аміно-феніл-D-рибітиламіну і його конденсації з алоксаном або 5,5-дихлорбарбітуровою кислотою; або до конденсації 3,4-ксиліт-6-фенілазо-1-D-рибітиламіну барбітуровою кислотою (рис. 1.3).

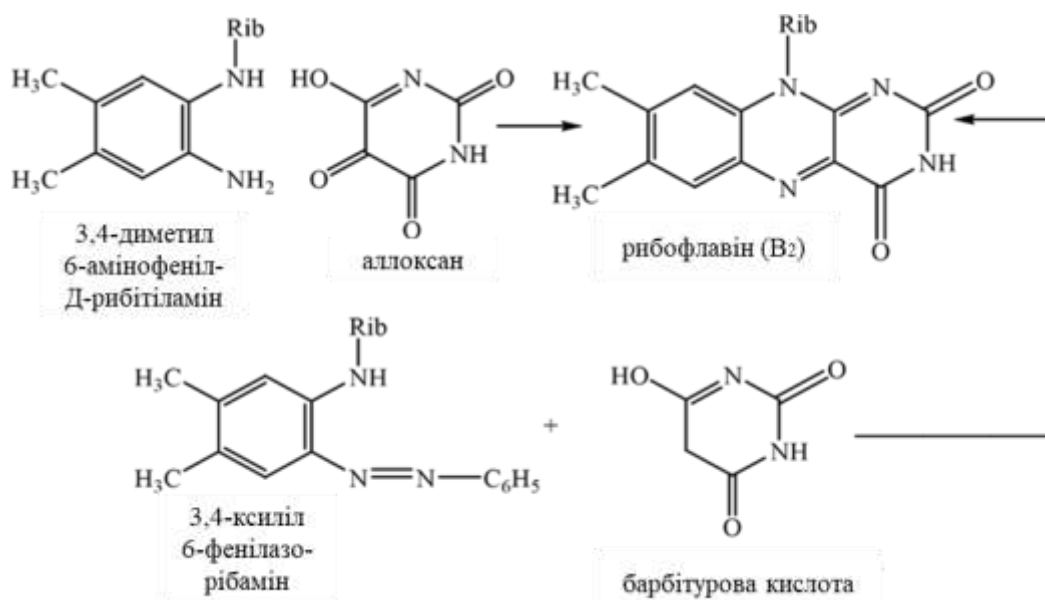


Рис. 1.5 Схема отримання рибофлавіну при хімічному синтезі [2]

У вітчизняній і світовій практиці промисловий метод полягає у синтезі ключових напівпродуктів: 3,4-ксиліт-6-фенілазо-1-аміну і барбітурової

кислоти, їх конденсації. Даний метод складається з таких технологічних стадій: синтез 4-*o*-ксілідину, отримання барбітурової кислоти, отримання D-рибози, отримання 3,4-ксіліт-1-аміну, отримання 3,4-ксіліт-6-фенілазо-D-рибітиламіну, отримання технічного рибофлавіну, отримання фармакопейного рибофлавіну [19]. Хімічний синтез є складним процесом і складається з багатьох стадій. Реакції проходять за температури 115 – 120 °C і тиску 1,5 атм. У процесі синтезу використовуються шкідливі для здоров'я речовини (наприклад, бром, ртуть і концентровані кислоти), тому даний метод є технічно-складним і комерційно-неефективним порівняно з альтернативними методами отримання рибофлавіну, наприклад шляхом мікробної ферментації. Так отримують рибофлавін у Японії (фірма «Takeda Yachuni Kogi»), а для отримання рибози використовують високопродуктивні мутантні штами бактерій роду *Bacillus* за геном транскетолази (що задіяна в...). Більшість виробників, таких як BASF (Федеративна Республіка Німеччина), Roche (Швейцарія), ADM / Aventis (Сполучені Штати Америки), Hubei Guangji (Китайська Народна Республіка), надають перевагу саме мікробіологічному виробництву рибофлавіну, а не хімічному процесу [24].

Рибофлавін виробляють різної якості: очищений, призначений для харчування та медичних цілей, та з меншим ступенем очистки, призначений для тваринних кормів. Для фармацевтичних рецептур рибофлавін синтезують хімічно, в той час як кормові концентрати для птахів та домашньої худоби отримують ферментаційно, використовуючи сахароміцетальні гриби роду *Eremothecium*, виду *Eremothecium ashbyi* або *Eremothecium gossypii*. Проте, додаткові етапи виділення та очистки дозволяють з рибофлавіну, отриманого ферментаційно, отримати препарат медичної якості [25]. Біотехнологічне виробництво вітамінів має багато переваг у порівнянні з хімічним синтезом. Біологічний шлях передбачає одноразову ферментацію, тоді як хімічний синтез – це багатоетапний процес [27]. Продукти, отримані методами

хімічного виробництва, є сумішами і вимагають ретельної очистки для отримання високоочищеного вітаміну, це збільшує час, необхідний для отримання бажаної кількості вітаміну [4, 21].

Останнім часом проведена велика кількість досліджень, спрямованих на підвищення виробництва рибофлавіну та розробку кращих виробничих середовищ. Різноманітні методи були використані для підвищення продуктивності штамів дикого типу, такі як УФ-опромінення [24], індукований мутагенез [26], антиметаболітний мутагенез [27] і метаболічні інженерні підходи [28]. Актуальним завданням щодо подальшого удосконалення і розвитку технології виробництва рибофлавіну є регулювання та збільшення біосинтетичної здатності продуцента шляхом вдосконалення умов культивування та використання більш ефективних джерел живлення.

1.3. Продуценти рибофлавіну

Мікробіологічний синтез – це найбільш дешевий та перспективний спосіб одержання рибофлавіну. Перевагами цього способу виробництва є доступна сировина, порівняно нескладна апаратура, одноетапний процес та відсутність шкідливих викидів в атмосферу [51]. Продуценти рибофлавіну можуть бути як екзо-продуцентами, так і ендо-продуцентами вітаміну В₂. Рибофлавін нагромаджується у клітинах мікроорганізмів ендо-продуцентів у вільному стані або у вигляді флавінаденіннуклеотиду.

Для біотехнологічного виробництва рибофлавіну використовуються організми різних таксономічних груп, як сахароміцетальні дріжджі (*Candida guilliermondii*), грам-позитивні бактерії (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamicus*) та міцеліальні гриби (*Aspergillus niger*).

Мікроорганізми, які продукують рибофлавін поділяють на три групи:

- сильні продуценти? (гриби)
- помірні (*Pichia guilliermondii*, *Candida flaveri*)

- слабкі (бактерії *Clostridium botulinum*).

Дані, які показують рівень накопичення рибофлавіну окремими мікроорганізмами, наведені в таблиці 1.1. У флавіногенних дріжджів *S. famata* [29] (використовуються фірмою Archer Daniels Midland (США) та *P. guilliermondii* [30].

Таблиця 1.1

Види мікроорганізмів, які синтезують рибофлавін

№	Вид	Рівень накопичення рибофлавіну, г/дм ³
1	<i>Eremothecium gossypii</i>	6,420
2	<i>Eremothecium ashbyi</i>	2,48-6,0
3	<i>Candida membrane faciens</i> subsp. <i>flavinogeni</i> W 14-3	2,2
4	<i>Bacillus subtilis</i> 63/p MX 30ribo0186	1,24
5	<i>Candida flaveri</i>	0,567
6	<i>Bacillus subtilis</i> 24A1/p MX 45	0,5
7	<i>Mycocandada riboflavin</i>	0,2
8	<i>Clostridium botulinum</i>	0,097
9	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0,058

Серед міцеліальних грибів активними продуцентами рибофлавіну є аскоміцети *E. gossypii* (синонім *E. gossypii*) [5] та *E. ashbyi* [30]. Крім того у промисловості для виробництва рибофлавіну застосовують генно-інженерні штами бактерії *B. subtilis* [22, 128]. Природні штами *B. subtilis* синтезують рибофлавін тільки в кількості, необхідній для підтримання власної життєдіяльності, і зовсім не виділяють його в середовище. Вид *B. subtilis* добре вивчений і охарактеризований як біохімічно, так і генетично. В даний час

повністю розшифрована первинна нуклеотидна послідовність хромосоми *B. subtilis*. Клітини *B. subtilis* швидко ростуть, не вимогливі до поживного середовища, тому існують добре розвинені технології ферментації і вилучення кінцевих продуктів. Багато штамів *B. subtilis* успішно застосовуються в мікробіологічній промисловості як продуценти різних біоактивних речовин: ферментів, антибіотиків, амінокислот, пуринових нуклеозидів, вітамінів [128].

Для оптимальної ферментації культури *B. subtilis* та ефективного синтезу рибофлавіну необхідно використовувати субстрат, який містить джерело вуглеводів (глюкозу, лактозу, галактозу, фруктозу, арабінозу, мальтозу, ксилозу, трегалозу, гідролізат крохмалю; спирти, такі як гліцерол, манітол і сорбітол; органічні кислоти, такі як глюконова, фумарова, лимонна та бурштинова). Як джерело азоту використовують неорганічні солі азоту, такі як: сульфат амонію, хлорид амонію і фосфат амонію; органічні сполуки азоту, такі як: гідролізат соєвих бобів, газоподібний аміак, водний розчин аміаку і подібні сполуки [22].

Авторами [22, 35, 128] створений промисловий продуцент рибофлавіну на основі рекомбінантного штаму *B. subtilis*. Спочатку були отримані мутанти, стійкі до розеофлавіну – структурного аналогу рибофлавіну. Дані мутанти володіли здатністю виділяти у культуральне середовище до 10 мг/дм³ вітаміну. На другому етапі були отримані мутації в гені-регуляторі, що кодує регуляторний білок, здатний впливати на експресію рибофлавінового оперону. Це дозволило отримати штам, що продукував до 100 мг/дм³ вітаміну. На наступному етапі були отримані мутації стійкості до аналога пурину, що також привело до росту продукції рибофлавіну [22, 128,147]. Після цього було застосовано методи генної інженерії для подальшого покращення продукції рибофлавіну. Була сконструйована рекомбінантна плазміда рМХ45, яка несе рибофлавіновий оперон *B. subtilis* та ген стійкості до еритроміцину. Ця плазміда була внесена в штам *B. subtilis*, і рекомбінант, завдяки збільшенню

кількості копій рибофлавінового оперона, почав продукувати до 3–4 г/дм³ вітаміну за умов вирощування в комплексних поживних середовищах. В результаті подальших селекційних робіт були отримані мутанти, ауксотрофні за аденіном, та мутанти з порушеними генами транскетолази та глутаматсинтетази. Все це, а також підібраний склад середовища та умов культивування, дали змогу отримати до 8–12 г/дм³ рибофлавіну [22, 147].

1.4. Біосинтез рибофлавіну у бактерій

За останні 50 років досліджень, ферменти з рибофлавінкіназною і ФАД-синтазною активностями виявлені у багатьох видів живих організмів?. Відомо, що тварини, рослини, гриби і археї володіють монофункціональними ферментами, тоді як у бактерій виявлені біфункціональні ферменти, що каталізують послідовне перетворення рибофлавіну в ФМН, а потім ФМН в ФАД. Так, біфункціональна рибофлавінкіназа/ФАД-синтаза у *B. subtilis* кодується геном *ribC*, у *E. coli* – геном *ribF*. Слід зазначити, що реакція утворення ФАД є оборотною, позаяк було показано, що біфункціональний фермент може з ФАД і пірофосфату знову утворювати ФМН і АТР [35].

У бактерій *B. subtilis* виявлений також фермент з альтернативною кіназною активністю, який кодується геном *ribR* – монофункціональна рибофлавінсинтаза. Ймовірно, цей білок володіє додатковою функцією в клітині. Було показано, що N-кінцевий домен відповідає за флавокіназну активність, тоді як C-кінцева частина білка здатна зв'язуватися з лідерним регіоном мРНК рибофлавінового оперона [61,78].

В даний час за допомогою рентгенографії визначені структури рибофлавінкіназ із *Shizosaccharomyces pombe* і *Homo sapiens*, а також ФАД-синтази *Thermogota maritima* [79-81].

На відміну від тварин і деяких прокариотів (деякі лактобактерії), всі рослини і гриби, а також більшість бактерій здатні синтезувати рибофлавін *de novo*. Біохімічні шляхи синтезу рибофлавіну у рослин, бактерій і грибів досить схожі, але не є повністю ідентичними.

Біосинтез рибофлавіну, показаний на рис. 1.5, починається з однієї молекули гуанозинтрифосфату (ГТФ) і двох молекул рибулозо-5-фосфату. ГТФ-циклогідролаза II (рис. 1.5, реакція 1) каталізує вивільнення форміату від імідазольного кільця і вивільнення пірофосфату бічного ланцюга нуклеотидного попередника, що веде до утворення 2,5-діаміно-6-(рібозіламіно)-4(3*H*)-піримідінон-5'-фосфату. На наступних етапах біосинтезу (рис. 1.5, реакція 2-6) відбувається гідролітичне видалення аміногрупи в положенні два, зменшення бічного ланцюга і дефосфорилювання з утворенням 5-аміно-6-(рибітиламіно)-2,4(1*H*,3*H*)-піримідиндиону.

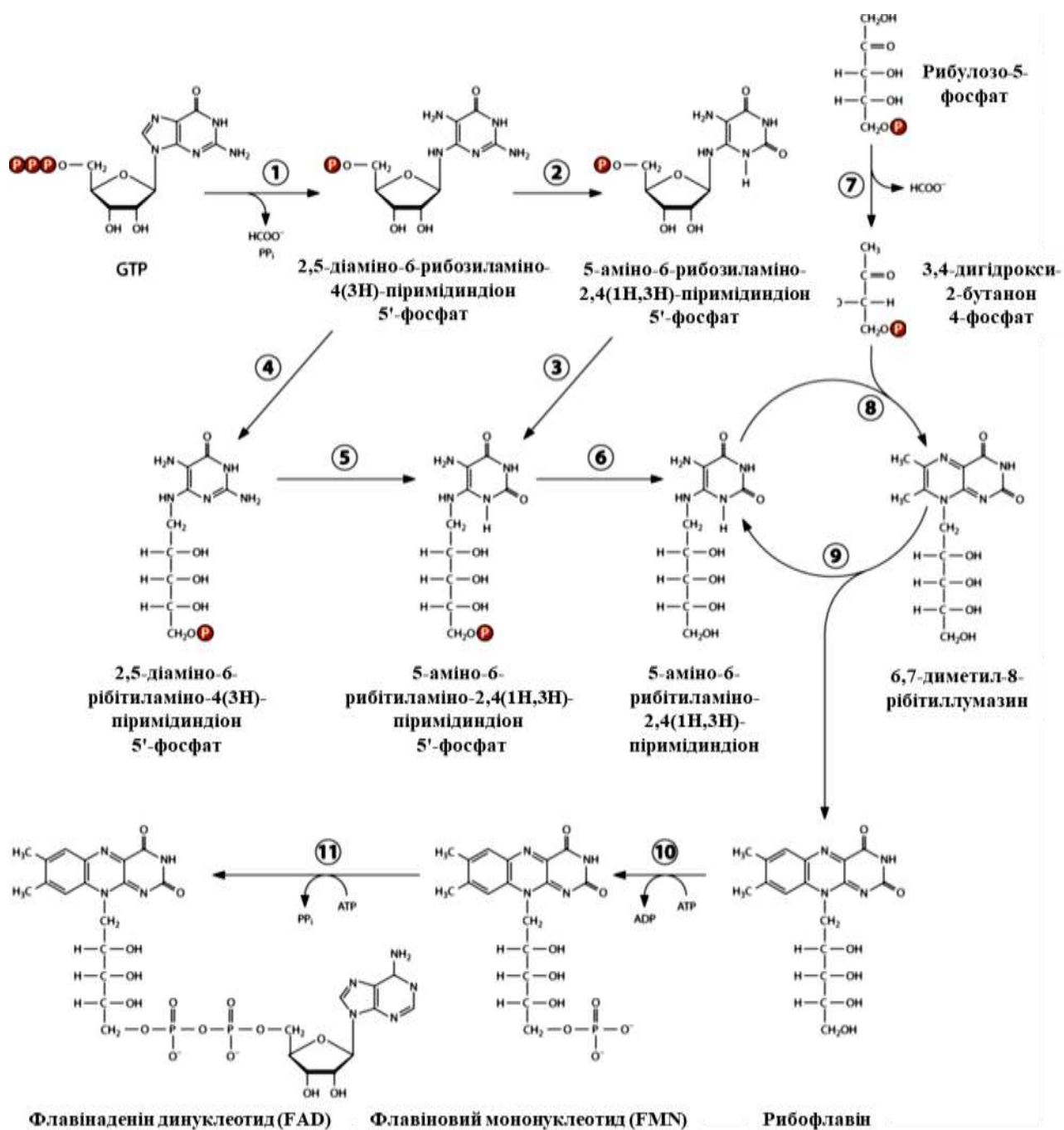


Рис. 1.7. Схема біосинтезу рибофлавіну та його похідних [95]

Почерговість процесів дезамінування і редукції бічного ланцюга варіює в організмах різних таксономічних груп. У еубактерій стадія дезамінування передує стадії зменшення бічного ланцюга, в той час як у дріжджів та міцеліальних грибів дані процеси відбуваються в зворотній послідовності [68, 80]. Слід зазначити, що 5-аміно-6-(рібітіламіно)-2,4(1*H*,3*H*)-піримідиндіон-5'-фосфат не є субстратом для 6,7-диметил-8-рібітіллумазинсинтази.

Досьогодні про цей важливий етапі біосинтезу рибофлавіну нічого не відомо. Далі дефосфорильоване похідне піримідину перетворюється в 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин шляхом конденсації з 3,4 дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатом (рис. 1.5, реакція 8), який утворюється з рибулозо-5-фосфату (рис.1.5, реакція 7). На заключному етапі біосинтезу відбувається дисмутації похідного птеридину, з утворенням рибофлавіну і піримідину (рис. 1.5, реакція 9). Ферменти біосинтетичного шляху, що здійснюють весь цикл перетворень починаючи зі стартового попередника ГТФ, найбільш детально описані в наступних розділах.

1.5. Структура, організація та регуляція рибофлавінового оперону *B. subtilis*

Рід *Bacillus* поєднує 2668 видів аеробних спороутворюючих грам-позитивних паличкоподібних бактерій. *B. subtilis* та найближчі родичі є непатогенними бактеріями, не синтезують ендотоксини та інші токсичні сполуки, і багато з них мають статус безпечних організмів GRAS (Generally recognized as safe), присвоєний ним Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США. Геноми, транскриптоми та основні шляхи клітинного метаболізму цих бактерій добре вивчені [35-36, 64-66, 85]. Клітини більшості штамів цих бактерій мають високу швидкість росту, стійкі до несприятливих впливів і стресових факторів.

Крім того, багато *Bacillus* sp. активно виділяють у середовище культивування низку екзоферментів та метаболітів. Завдяки перерахованим характеристикам, *B. subtilis* та інші близькоспоріднені бактерії активно використовуються в промисловій біотехнології для виробництва ферментів (амілаз і протеїназ), рекомбінантних білків, антимікробних сполук, а також D-рибози, вітамінів (рибофлавіну, фолієвої кислоти та ін.), пуринових

нуклеозидів, полігаммаглутамінових кислот та цілого ряду інших хімічних речовин, які широко використовуються в промисловості, сільському господарстві та медицині [42, 79].

Біосинтез рибофлавіну найкраще вивчений у *B. subtilis*. Його кодовано в рибофлавіновому (*rib*) опероні, а також незчеплених з опероном генів біфункціональної флавокінази/ФАД-синтази *ribC* (що забезпечує послідовне утворення ФМН з рибофлавіну і ФАД з ФМН [41, 42]) і монофункціональної флавокінази – *ribR* (відповідає за синтез ФМН [43]). *rib*-оперон *B. subtilis* складається з 5 генів, що не перекриваються і містить три регуляторних елемента. Регуляторна зона *ribO* розташована перед першим структурним геном оперона (*ribG*), включає основний промотор P1. В опероні наявні і два додаткові внутрішні промотори – P2 і P3, перший з яких розташований в дистальній області гена рибофлавінсинтази *ribB*, а другий – довжиною 113 пар нуклеотидів – відокремлює ген *ribT* від гена люмазинсинтази *ribH* [44]. Схема оперона представлена на рис. 1.6. Основний промотор *rib*-оперона P1 TTGCGT-17 п.н.-TATAAT був однозначно ідентифікований методом S1-мапування [45]. У випадку промотора P1 спостерігається регуляція транскрипції за допомогою безпосередньої взаємодії флавінів з консервативною ділянкою лідерної мРНК (*rfln*-елементом), в результаті чого змінюється її вторинна структура і модулюється експресія оперону завдяки зміні ймовірності утворення термінуючої шпильки [46].

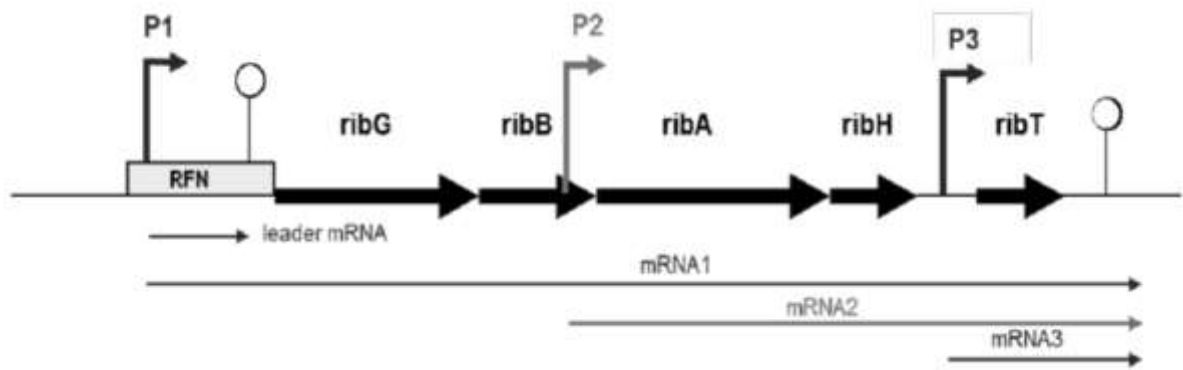


Рис. 1.8. Структура рибофлавінового оперона *B. subtilis* [40]

Такі некодуючі мРНК, здатні для регуляції експресії прилеглих генів безпосередньо розпізнавати і зв'язувати метаболіти без білкових посередників, отримали назву рибоперемікачів [47, 48]. Що стосується структури і функціональної значущості внутрішніх промоторів P2 і P3, то до теперішнього часу це питання залишається відкритим. Рибофлавінові оперони також були вивчені у *B. amyloliquefaciens* [49], *Actinobacillus pleuropneumoniae* [50] і у бактерій роду *Bartonella* [51]. У *Photobacterium phosphoreum* і *P. leiognathi*, гени біосинтезу рибофлавіну розташовані в *lux*-опероні [52, 53].

1.6. Біохімічні та генетичні особливості синтезу рибофлавіну у рекомбінантного продуцента *B. subtilis*

У генетичному та біохімічному сенсах біосинтез рибофлавіну найкраще вивчений у *B. subtilis*. Відповідно до наявних на сьогодні даних, рибофлавін синтезується у п'ять стадій. Попередником рибофлавіну служить ГТФ і рибулозо-5-фосфат або його метаболіт. Синтез рибофлавіну пригнічується за додавання у середовище екзогенного рибофлавіну та його похідних (ФМН і ФАД). У *B. subtilis* частина внутрішньоклітинного пулу флавінів завжди знаходиться у відновленій формі, причому субстратами для флавокінази/ФАД-синтази та флавокінази є відновлені форми рибофлавіну та

ФМН. У *B. subtilis* рибофлавін та його похідні у складі флавопротеїнів беруть участь у декарбоксилюванні пірувату та α -кетоглутарату, окисненні жирних кислот, синтезі піридоксальфосфату, катаболізмі триптофану та ред/окс-варіабельності глутатіону [75, 79].

Підвищенню ферментативної активності й інтенсифікації синтезу рибофлавіну сприяє більш активне утворення відновленого нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФН). НАДФН утворюється в окисній частині пентозофосфатного шляху, зокрема в першій реакції, що каталізується НАДФ⁺-залежною глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою. Відновлений НАДФН пригнічує глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу. Перетворення НАДФН в окислений стан НАДФ⁺ веде до послаблення інгібування ферменту. При цьому, швидкість відповідної реакції зростає і утворюється більша кількість НАДФН. Тобто, даний механізм відповідає принципу регулювання з позитивним зворотним зв'язком: чим більше клітини потребують анаболічних процесів і витрат НАДФН, тим інтенсивніше працює окислювальна частина пентозофосфатного шляху. Якщо потреби клітини НАДФН незначні, то рибозо-5-фосфат утворюється в результаті оборотних реакцій неокислювального етапу пентозофосфатного шляху, використовуючи як вихідні речовини метаболіти гліколізу – гліцеральдегід-3-фосфат і фруктозо-6-фосфат [29, 84].

Як вже зазначалося раніше, рибофлавіновий оперон *B. subtilis* – *rib* – включає п'ять структурних генів (рамки зчитування яких не перекриваються), а саме: *ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH* і *ribT*, що транскрибуються і регулюються спільно. Також було виявлено додатковий локус (*ribC*), не зчеплений з *rib*-опероном, мутації в якому суттєво впливали на рівень експресії генів *rib*-оперону.

Транскрипція з основного промотора *rib*-оперону контролюється внутрішньоклітинним рівнем ФМН (і частково ФАД) без участі будь-яких додаткових білкових факторів, оскільки ФМН може безпосередньо

зв'язуватися з лідерною мРНК і сприяти формуванню термінуючої шпильки, внаслідок чого відбувається інгібування експресії структурних генів. Цитоплазматичний рибофлавін швидко перетворюється рибофлавінкіназою на ФМН. Показано, що, на відміну від основного промотору P1, транскрипційні активності внутрішніх промоторів не залежать від ФМН [54].

ФМН-залежна регуляція механізму рибоперемикача була також виявлена у *B. subtilis* і для гена *fmnP* (синоніми: *ribU*, *upaA*) [58], продукт якого є рибофлавін-зв'язуючим білком родини ECF (Energy-Coupling Factor), що бере участь в АТФ-залежному транспорті рибофлавіну всередину клітини. Для гена *fmnP* було виявлено комбінаторний механізм дії рибоперемикача, який при зв'язуванні з ФМН утворює структуру, що перешкоджає як транскрипції, так і трансляції гена *fmnP* [79]. Тому, щоб забезпечити доступність вітаміну, білки біосинтезу і транспорту рибофлавіну синтезуються паралельно.

Комбінуючі методи селекції і генетичної інженерії, було створено промислові високопродуктивні штами *B. subtilis*, здатні до сильного надсинтезу рибофлавіну.

Спочатку були отримані мутанти, стійкі до розеофлавіну – структурному аналогу рибофлавіну. Такі мутанти володіли здатністю виділяти у культуральне середовище до 10 мг/дм³ вітаміну. На другому етапі були отримані мутації в гені-регуляторі, що кодує регуляторний білок, здатний впливати на експресію рибофлавінового оперону. Це дало змогу отримати штам, що продукував до 100 мг/дм³ вітаміну. На наступному етапі були отримані мутації стійкості до аналогу пурину, що також привело до росту рівнів продукції рибофлавіну [22, 76].

Наступним етапом було створення рекомбінантного штаму *B. subtilis*. Генно-інженерними методами була сконструйована рекомбінантна плазміда рМХ45, яка несла на собі рибофлавіновий оперон *B. subtilis* і ген стійкості до еритроміцину. Ця плазміда була внесена в штам *B. subtilis*, і, завдяки

збільшенню кількості копій рибофлавінового оперона, продукція вітаміну рекомбінантними штамми зросла до 3–4 г/дм³ за умов вирощування в комплексних поживних середовищах. В результаті подальших селекційних робіт були отримані мутанти, ауксотрофні за аденіном, та мутанти з порушеними генами транскетолази та глутаматсинтетази. Все це, а також підібраний склад середовища та умов культивування, дав змогу отримувати до 8–12 г/дм³ рибофлавіну [22,48].

Проведені дослідження показали, що плазмід рМХ45 є стійкою протягом 50 генерацій на агаризованих поживних середовищах. Єдиною умовою елімінації плазмиди є збільшення температури культивування рекомінантних штамів вище 45 °С [65, 72].

Стратегії генетики і метаболічної інженерії, такі як заміна промотора, нокаут гена і експресія гетерологічного гена, були застосовані для подальшого збільшення продукції рибофлавіну штамми *B. subtilis*. Наприклад, сильний промотор Р43 використовувався для полегшення надекспресії генів *purF*, *purM*, *purN*, *purH* і *purD*, що привело до 25 % збільшення продукції рибофлавіну рекомбінантним штамом. Більше того, синтез попередника рибофлавіну – гуаніну – був значно збільшеним у мутанті з надекспресією *purF*; цей штам продукував утричі більше рибофлавіну, ніж вихідний [83]. Хоча сучасні методи метаболічної інженерії значно збільшили виробництво рибофлавіну, залишаються різні вузькі місця на шляху до подальшого збільшення його виробництва.

1.7. Промислове виробництво рибофлавіну

Промислове виробництво рибофлавіну може здійснюватися як шляхом хімічного синтезу, так і мікробіологічним шляхом (ферментації) [46]. Шлях ферментації дозволяє виробляти вітамін В₂ в один етап, що є економічно

ефективним. Навпаки, хімічні процеси багатостадійні і дорогі. Отже, на сьогоднішній день ферментаційне виробництво рибофлавіну є економічно та екологічно більш доцільним і повністю витіснило хімічний синтез.

Для створення сучасної комерційної біотехнології рибофлавіну необхідно мати високопродуктивні штами-продуценти та дешевий і доступний субстрат. Останнім часом проводяться дослідження з оптимізації технології рибофлавіну шляхом вдосконалення штамів-продуцентів із використанням методів класичної селекції, генної інженерії та біоінформатики [31, 106]. Для підвищення продуктивності штамів використовують методи індукованого мутагенезу [99] і генної інженерії [35, 101]. У промисловому виробництві рибофлавін головно отримують з використанням аскоміцета *E. gossypii* і бактерії *B. subtilis* [22, 128, 147, 157]. Біосинтез рибофлавіну детально вивчався на прикладі *B. subtilis*, яка стала модельним організмом для промислових штамів, що продукують вітамін В₂, бо здатна за короткий час (68–72 години культивування) виділяти продукт безпосередньо в середовище [23].

B. subtilis здатна виробляти попередники рибофлавіну, інозин і гуанозин, у пуриновому шляху, який може метаболічно перетворюватися на рибофлавін. Проте, надпродукція рибофлавіну була досягнута шляхом отримання мутантів із надекспресією певних генів, а також стійкістю до пуринових аналогів (азагуаніну, декоїніну та метіонінсульфоксиду) або аналога рибофлавіну розеофлавіну [29].

Штами *B. subtilis* KU559874 і *B. tequilensis* KU559876 були описані як високоефективні продуценти рибофлавіну [36]. Додавання гліцину в живильне середовище вирощування цих штамів мало позитивний ефект на продукцію вітаміну. Оптимальна концентрація гліцину становила 1 г/дм³, що давало вихід рибофлавіну 144,7 і 184,2 мг/дм³ в *B. subtilis* KU559874 і *B. tequilensis* KU559876, відповідно. Іншим прикладом бацил-продуцентів

рибофлавіну є *B. subtilis* VKPM-B 6797, що несе плазмиду 62/pMX30ribO186 і виробляє до 12,5 г/дм³ рибофлавіну під час 42-годинної ферментації [6]. Штам VKPM-B 6797 отримано з мутанта *B. subtilis* RK6121, стійкого до 8-азогуаніну, метіонінсульфоксиду, діацетилу та псикофураніну, який містив, крім того, плазмиду з мутованим опероном *rib*. Також досліджували оптимальні концентрації 13 мінералів під час ферментації *B. subtilis* ATCC 6051 з метою покращення продукції рибофлавіну на фруктозному субстраті [100]. Результати показали, що концентрації MgSO₄, K₂HPO₄ і FeSO₄ мали більший вплив на продукцію рибофлавіну (3,85 мг/дм³). Скринінг 11 компонентів середовища для продукції рибофлавіну рекомбінантним *B. subtilis* X42 (штаму, отриманого шляхом метаболічної інженерії) показав, що найбільший вплив на продукцію рибофлавіну мали глюкоза, дріжджовий екстракт, MgSO₄, сечовина, CuCl₂ і MnCl₂.

Збільшити виробництво рибофлавіну можливо шляхом модифікації експресії багатьох генів, щоб збалансувати внутрішньоклітинний метаболічний потік. Стратегія модифікації експресії генів *zwf*, *ribBA* і *uwlf* (які кодують *x*, *y* і *z*, відповідно) була використана для збільшення внутрішньоклітинного пулу попередників біосинтезу рибофлавіну. Було обрано найкраще сконструйований штам, який продукував 2,7 г/дм³ рибофлавіну, а це число демонструвало збільшення продукції рибофлавіну на 64,35 % (в порівнянні із вихідним штамом) за умов вирощування в колбах Ерленмеєра. За умов вирощування цього ж штаму в ферментері з підживленням, титр рибофлавіну підвищився на 59,27 % – до 11,77 г/дм³.

Технологічна схема виробництва кормового рибофлавіну складається з наступних етапів: зберігання і підтримування культури в активному стані, приготування робочої партії культури, вирощування посівного матеріалу в колбах, вирощування посівного матеріалу в інокуляторі, приготування стерильного поживного підживлення, стерилізація піногасника, підготовка рН

підтримуючого агента, приготування та стерилізація ензиматичного середовища, отримання стерильного повітря, стерилізація ферментеру, завантаження ферментеру, інокуляція середовища, процес біосинтезу рибофлавіну, обробка культурального середовища гідросульфідом натрію, виділення осаду, автоліз біомаси, розведення автолізу і виділення осаду рибофлавіну, висушування рибофлавіну, фасовка та пакування готового продукту [19]. Схематично технологія виробництва рибофлавіну наведена на рис. 1.9.

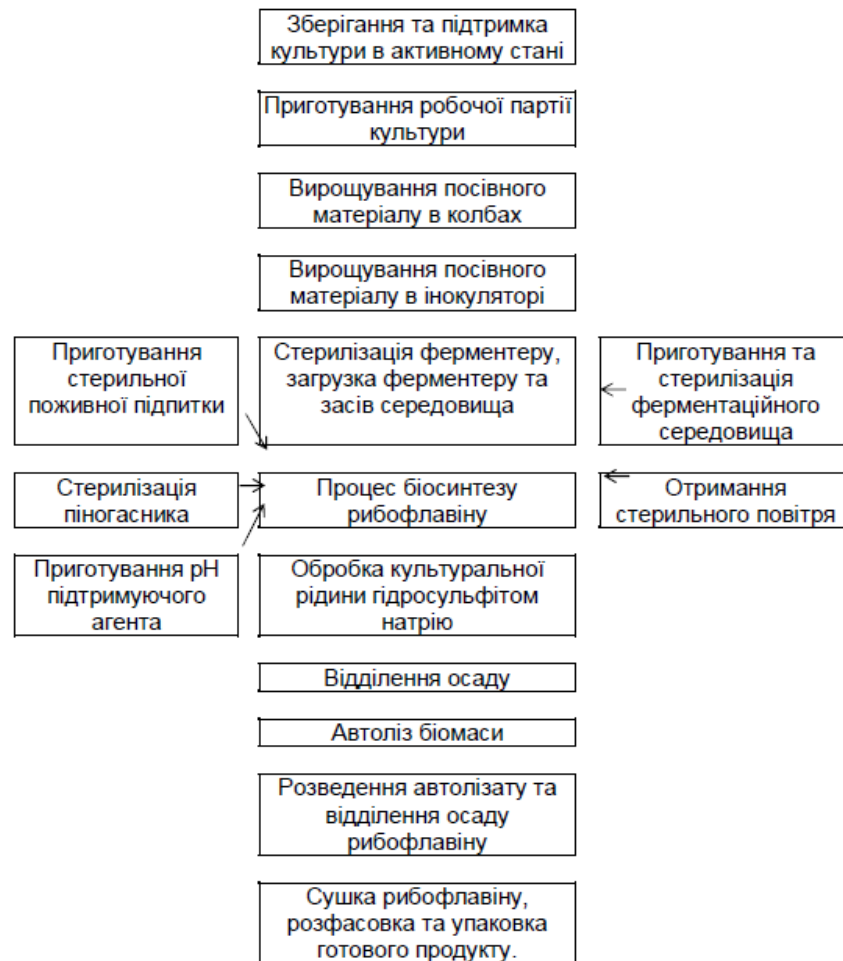


Рис. 1.9. Технологічна схема виробництва кормового рибофлавіну [101]

За промислового виробництва вітаміну B_2 важливу роль відіграє збереження культури штамів-надпродуцентів рибофлавіну без втрати властивостей синтезу вітаміну B_2 . При цьому важлива стабільність штамів-

продуцента та методи збереження культури. Одним із найефективніших методів зберігання штамів є ліофільне висушування культури [46].

1.8. Тривале зберігання культури і ліофілізація

Тривале зберігання культур є основною проблемою колекцій мікроорганізмів та промислового мікробіологічного виробництва [46]. Причиною зниження життєздатності бактерій та їх фізіологічних властивостей є зміна складу популяції під дією різних фізико-хімічних факторів [3]. Для зберігання матеріалів біологічного походження, як правило, застосовують метод ліофільного висушування [110]. Ліофілізація, також відома як сублімаційне сушіння, є процесом, який зазвичай використовується в харчовій промисловості для збереження біологічних зразків. Також ліофілізація знайшла застосунок і у фармацевтиці, бо є технікою зневоднення, придатною для термочутливих зразків [46]. Під час ліофілізації вода видаляється з продукту після його заморожування і поміщення в вакуум, що дозволяє льоду сублімуватися – безпосередньо перетворюватися з твердого стану на газоподібний, не проходячи через рідку фазу [7].

Ліофілізація відбувається в три фази, першою і найбільш критичною є фаза заморожування [102]. Правильне заморожування може скоротити час висихання на 30 %. Існують різні способи заморожування продукту. Заморожування можна здійснити в морозильній камері, охолодженій ванні або на полиці в сублімаційній сушарці. Охолодження матеріалу нижче його потрійної точки гарантує, що відбудеться сублімація, а не плавлення. Потрійною точкою називається період заморожування, коли рідина, що знаходиться в речовині, може одночасно перебувати відразу в трьох фазах: рідкій, твердій і газоподібній. Це зберігає фізичну форму продукту [46].

Ліофілізацію найпростіше здійснити за допомогою великих кристалів льоду, які можна отримати шляхом повільного заморожування або відпалу. Однак, у біологічних матеріалах, коли кристали занадто великі, вони можуть порушити клітинні стінки, що призводить до не ідеальних результатів сублімаційної сушки. Щоб запобігти цьому, заморожування проводять швидко. Для матеріалів, схильних до осідання, можна використовувати відпал. Цей процес передбачає швидке заморожування, а потім підвищення температури продукту, щоб дозволити кристалам рости.

Другою фазою ліофілізації є первинне сушіння (сублімація), під час якого тиск знижується та до матеріалу додається тепло, щоб вода сублімувалася. Вакуум прискорює сублімацію. Холодний конденсатор забезпечує поверхню для прилипання та твердіння водяної пари. Конденсатор також захищає вакуумний насос від водяної пари. Первинне сушіння може бути повільним процесом. Занадто багато тепла може змінити структуру матеріалу. Після первинної сушки весь лід сублімується, проте залишається зв'язана волога у дослідному зразку. Здається, що продукт уже висушений, але вміст залишкової вологи може бути в межах 7–8 % [7, 22, 31, 128].

Останньою фазою ліофілізації є вторинне сушіння (адсорбція), під час якого іонно-зв'язані молекули води видаляються. Підвищуючи температуру вище, ніж на первинній фазі сушіння, зв'язки між матеріалом і молекулами води розриваються. Оскільки відбувається десорбція, вакуум повинен бути настільки низьким, наскільки можливо, та температура конденсатора настільки низькою, наскільки можливо. Етап вторинної сушки зазвичай займає від 1/3 до 1/2 часу порівняно з часом, який займає первинна сушка [7]. Ліофілізовані матеріали зберігають пористу структуру. Після завершення процесу ліофілізації вакуум можна порушити за допомогою інертного газу, перш ніж матеріал буде герметизовано. Більшість матеріалів можна висушити до 1-5 % залишкової вологи [102].

В процесі вторинної сушки необхідно контролювати сталість залишкової вологи після майже 6-годинної роботи за підвищеної температури, температуру об'єкта, яка повинна бути вище температури навколишнього середовища. За високої температури та низької залишкової вологи неможливо нашкодити біологічному об'єкту, який піддається ліофілізації [7, 22, 31].

Принципову схему процесу ліофілізації наведено на рис. 1.10.

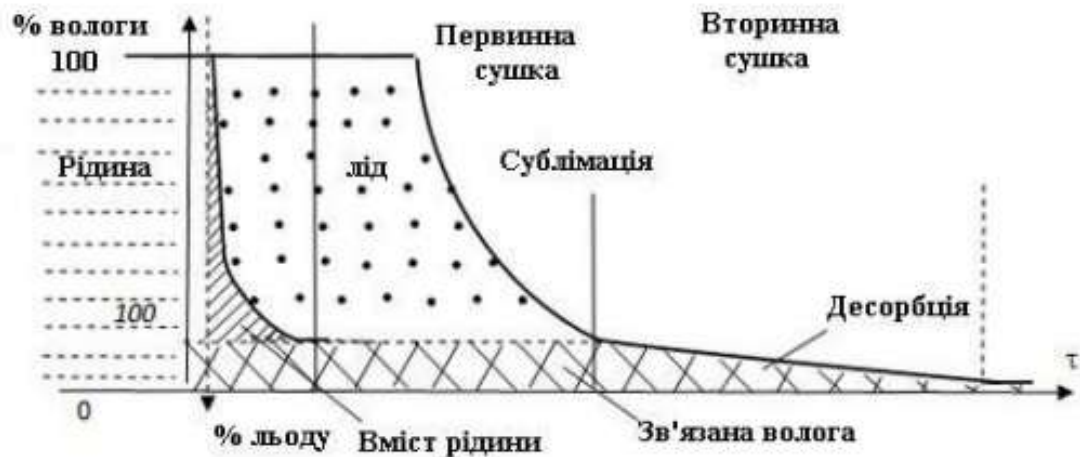


Рис. 1.10. Принципова схема ліофілізації, де τ – час [3]

Потрібно, щоб температура, при якій проходить ліофілізація, була збалансована між температурою повного замерзання об'єкту та температурою точки максимальної сублімації. Спочатку біологічну субстанцію охолоджують до певної температури, а потім поступово піднімають температуру, яка називається критичною точкою. За подальшого підвищення температури лід перетвориться на рідину, тому в даній точці починають знижувати тиск, щоб оминати фазу рідини і перейти у газоподібний стан [7].

Заморожування з подальшим висушуванням не гарантує збереження всіх властивостей біологічного матеріалу, але цей метод значно підвищує шанси довготривалого зберігання культур мікроорганізмів, живих вакцин, сировоток, плазми, тощо.

Після ліофілізації бактерії можна зберігати протягом тривалого часу в ампулах чи флаконах за температури 5°C , і вони залишаються життєздатними.

Вживаність грам-позитивних бактерій відразу після сублімаційного сушіння, як правило, вище, ніж у грам-негативних бактерій на однаковий момент часу [110]. Можна припустити, що грам-позитивні бактерії мають більшу стійкість до висихання, ніж грам-негативні бактерій і що ця різниця зумовлена структурою клітинної стінки [100].

Деякі речовини складних біологічних систем мають виражений захисний вплив проти шкідливої дії евтектичних концентрацій солей. Руйнуючий вплив харчової солі при заморожуванні деяких бактерій повністю знімається в присутності желатози. Тобто, шляхом підбору і використання так званих «захисних» середовищ різного складу для різних мікроорганізмів, можна позбавитись пошкоджуючого впливу евтектичних концентрацій при заморожуванні і ліофілізації. Захисне середовище має підходити для заморожування та ліофілізації мікроорганізмів, найбільш лабільних до охолодження та видалення води. Після видалення вільної води середовище має забезпечувати дрібнопористу і достатньо щільну структуру. Якщо середовище не задовільняє цим вимогам, а сухий матеріал має не щільну структуру або має вигляд окремих грудочок, порошку, то частина мікробних частинок може бути видалена з ампул в процесі ліофілізації в потоці газів і водяної пари. Проте, якщо захисне середовище містить достатню кількість ефективних наповнювачів, ці речовини, після видалення вільної води, лишаються у вигляді пористої маси з включеними до неї клітинами мікроорганізмів. Така структура забезпечує фіксацію мікроорганізмів в сухому залишку і ліофільні властивості біологічного матеріалу.

Отже, для ліофільного висушування бактерій, важливо правильно підібрати склад захисного середовища, температуру і час заморожування.

Температура продукту є одним із найважливіших параметрів, який в подальшому визначає ознаки якості ліофілізованих об'єктів. Серед них: зовнішній вигляд, залишкова вологість, стабільність при зберіганні, час відновлення, тощо. Однак, її неможливо контролювати безпосередньо. На неї впливають такі параметри як температура полиці, тиск у камері, опір

продукту, а також попереднє переохолодження, тощо. Температура продукту не повинна перевищувати температуру критичної точки на етапі первинної сушки, оскільки це може спричинити танення [7,22].

Важливе значення має структура сухого матеріалу. Після сублімації льоду це має бути суха, пориста, без вільної води, маса, що майже зберегла об'єм і структуру вихідної речовини. При додаванні води ця суха маса повинна швидко розчинятися.

Взагалі, ліофілізації має низку переваг для зберігання біологічних об'єктів, зокрема:

– максимальний ступінь збереження (до 90 %) поряд з малою питомою вагою близько (1/5–1/10 ваги неліофілізованих речовин), що дозволяє запобігти розкладанню і дегенерації біологічного об'єкту, найбільш оптимальна для продуктів з високою чутливістю і високим ступенем окиснення [22,128];

– низький процент вмісту вологи, і, як наслідок, формування пористої структури продукту, який матиме властивості швидкого розчинення та регідратації, а також відновлення властивостей при додаванні води.

Тому, ліофілізація оптимально підходить для швидкорозчинних лікарських препаратів, а також продуктів, призначених для тривалого зберігання в нерегульованих температурних умовах.

Також, завдяки герметичності приладу, виключається можливість забруднення об'єкту чужорідною мікрофлорою. Проте, для досягнення основних цілей ліофілізації біологічних об'єктів, необхідно чітко контролювати усі етапи процесу: попереднє заморожування, первинну сушку та вторинну сушку [128].

Отже, проаналізовані літературні дані останніх років щодо продуцентів рибофлавіну, методів підвищення їх біологічної активності та промислового виробництва засвідчили необхідність застосування комплексного підходу для отримання штаму-продуцента *B. subtilis* з підвищеним накопиченням рибофлавіну.

Так, на першому етапі необхідне глибоке розуміння загальних характеристик рибофлавіну і існуючих способів отримання вітаміну В₂. Рибофлавін у світовому промисловому виробництві отримують трьома способами: хімічним синтезом, мікробіологічним синтезом і змішаним способом, який передбачає мікробіологічний синтез рибози з подальшою хімічною модифікацією рибози в рибофлавін. В Україні будь-яке виробництво рибофлавіну відсутнє.

Рибофлавін за мікробіологічного способу отримують із клітин промислових штамів грибів *E. gossypii*, *C. famata* var. *flasheri* та бактерій *B. subtilis*, досягаючи титру 15, 20 та 18 г/дм³ відповідно. Світовий ринок виробництва рибофлавіну за останні десятиліття збільшився більш ніж удвічі з 4000 т/рік (2002 р.) до 10000 т/рік (2022 р.) [157], й постійно зростає. Приблизно 70 % рибофлавіну в основному використовується як кормова добавка, а близько 30 % – як харчова добавка і в фармацевтиці.

Для створення сучасної комерційної біотехнології виробництва рибофлавіну необхідно мати високопродуктивні штами, дешевий і доступний субстрат. Останнім часом проводяться дослідження з оптимізації технології рибофлавіну шляхом вдосконалення штамів-продуцентів із використанням методів класичної селекції, генної інженерії і біоінформатики.

Для підвищення продуктивності штамів використовують методи індукованого мутагенезу і генної інженерії. У промисловому виробництві рибофлавін головно отримують за використання аскоміцета *E. gossypii* і бактерії *B. subtilis* [22]. Біосинтез рибофлавіну детально вивчався на прикладі непатогенної бактерії *B. Subtilis*, яка стала модельним організмом для промислових штамів у зв'язку зі здатністю виділяти продукт безпосередньо в середовище [22,147].

Актуальним завданням щодо подальшого удосконалення і розвитку технології продукції рибофлавіну є збільшення біосинтетичної здатності *B. subtilis* шляхом вдосконалення властивостей продуцента, умов

культивування і розширення асортименту субстратів для виробництва вітаміну з дешевших джерел вуглецю.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Умови культивування та поживні середовища для виділення та ідентифікація штамів-продуцентів рибофлавіну

Для дослідження були використані культури мікроорганізмів, виділені з природних джерел, а саме з поверхні овочевих культур. Для отримання культур бактерій відібрали 9 зразків бульб картоплі сорту Адретта, зібраних на полях Київської області в передмісті міста Києва. Для дослідження візуально оцінювали стан та якість коренеплодів, розмір бульб, пошкодження шкідниками і хворобами, наявність зовнішніх дефектів і пошкоджень, наростів, обдертої шкірки. Також, зразки для подальших досліджень відбирали візуально з жовтуватим нальотом на поверхні, який міг би свідчити про наявність мікроорганізмів, що продукують рибофлавін. Виділення чистої культури є основою роботи з бактеріями, бо часто зразки, що досліджуються, містять суміш різних видів мікроорганізмів. Основним завданням для виділення чистих культур з матеріалу, що містить суміш різних мікроорганізмів, є отримання окремих бактеріальних колоній (потомство однієї клітини на щільному живильному середовищі).

Для виділення чистої культури мікроорганізмів використовували метод відбитків (реплік). На циліндр діаметром 8 см накладали стерильний фільтрувальний папір. Папір туго натягували і закріплювали металевим кільцем. На циліндр накладали вихідний матеріал із колоніями і обережно притискали так, щоб на папері залишилися відбитки колоній. Папір із відбитками прикладали до чашок Петрі зі стерильним агаризованим середовищем. Чашки інкубували в термостаті за температури 38 °C протягом 72 год. [2,13]. Загальну кількість мікроорганізмів у зразках визначали за методом Виноградського у модифікації Шульгіної [13], кількість повторень кожного зразка – 12. Підраховували загальну кількість коленієутворюючих

одиниць (КУО) мікроорганізмів і відбирали культури, які відповідали культурально-морфологічним ознакам колоній бактерій роду *Bacillus*. Відібрані культури пересівали для подальшого дослідження. Ідентифікацію штамів проводили за загальноприйнятими методиками з використанням «Визначника бактерій Берджі» [130].

Для вирощування штамів-продуцентів рибофлавіну використовували такі поживні середовища: МПА та МПБ приготовані згідно з методикою, описаною в літературі [1], збагачений м'ясо-пептонний агар (зМПА) (склад: м'ясо-пептонний бульйон – 1 дм³, глюкоза – 10 г, дріжджовий екстракт – 5 г, агар – 20 г, рН 7,0±0,1) і LB агар (склад: дріжджовий екстракт – 5,0 г; натрій хлористий (NaCl) – 5,0 г; пептон – 5 г; агар – 25 г; вода дистильована – до 1 л, рН 7,2±0,1). Середовища стерилізували протягом 30 хв за тиску 1 атм. Для отримання поодиноких колоній брали 0,5•10⁻³⁺ дм³ та 1,0•10⁻³ дм³ культуральної рідини з розведень 10⁻⁶ та 10⁻⁷, відповідно, і переносили в чашки Петрі, які потім заливали двома різними середовищами (зМПА та LB агаром), охолодженими до температури 45±3 °С. Інкубацію здійснювали в термостаті за температури 38±1 °С протягом 72 год. Усі колонії, які виростили на агаризованих середовищах, відбирали для культивування та перевірки накопичення рибофлавіну. Для культивування мікроорганізмів використовували середовище такого складу (г/дм³): сахароза – 80; дріжджовий екстракт – 32; зерновий екстракт – 10; гідроортофосфат калію (KH₂PO₄) – 8; сульфат магнію (MgSO₄) – 0,6; сечовина – 0,8; дистильована вода – додавали до мітки 1 дм³. Середовище стерилізували протягом 30 хв. за тиску 0,5 атм.

Культивування бактерій проводили протягом 96 год., у шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) за температури 38 °С і за швидкості 240 об/хв. Брали проби культуральної рідини з інтервалом 12 год. Ріст штамів-продуцентів рибофлавіну на агаризованих живильних середовищах оцінювали візуально, за наявністю росту та зміною забарвлення середовища у жовтий колір навколо колонії; у рідких середовищах – вимірюванням титру клітин у культуральній рідині (КР) за оптичною густиною (ОГ). ОГ визначали за

допомогою фотоелектроколориметра (модель КФК-3, РФ) в кюветах ($d=5$ 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) з використанням імерсії. Фотографії робили за допомогою фотоапарата «Canon PowerShot A640» (Японія). Кількість синтезованого рибофлавіну (рис 2.1) визначали флуориметричним методом за допомогою флуориметра ЕФ – 3МА та спектрофотометра SPEKOL 1500 UV VIS (ФРН) [25-30].

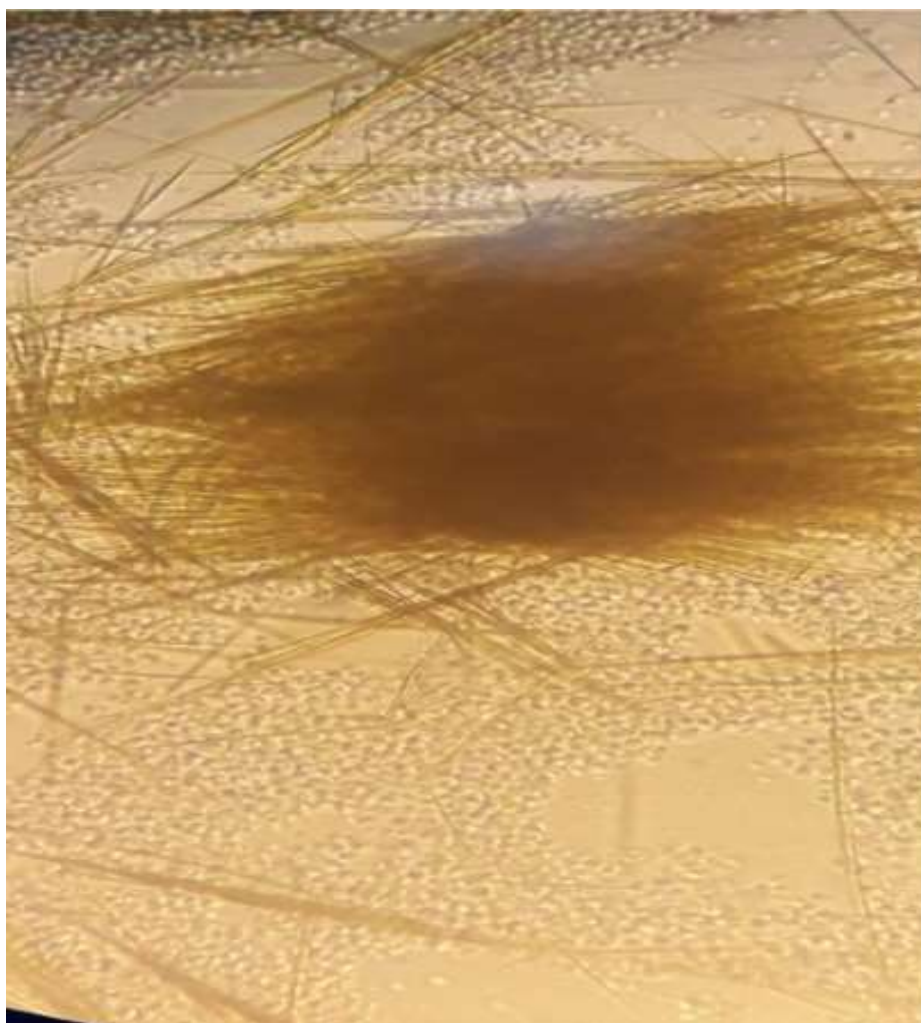


Рис. 2.1. Накопичення кристалів рибофлавіну у вигляді голок за культивування на L середовищі, збільшення 40х

Для визначення відношення мікроорганізмів до фарбування за Грамом проводили дослідження з використанням відповідних барвників (карболовий розчин генціанвіолету, розчин Люголю, фуксин Циля-концентрат, сафраніну) нейтральний червоний (для кат. № 440К) . Вітальне фарбування проводили з використанням барвника метиленового синього [2]. Культурально-морфологічні особливості штаму визначали за методикою, описаною в літературі [13]. Кількість амонійного азоту визначали згідно методики з використанням реактиву Несслера [1]. Засвоєння вуглеводів визначали за допомогою методики, описаної в літературі [1]. Для визначення чутливості до антибіотиків нових штамів-продуцентів рибофлавіну використовували диски з такими антибіотиками: ампіциліном, поліміксином, гентаміцином, неоміцином, цепарином, тобраміцином, еритроміцином, хлорамфеніколом і стрептоміцином [6]. Для визначення здатності культури до розщеплення желатини використовували м'ясопептону желатину (склад, г/дм³: суха суміш поживного бульйону – 15,0; NaCl – 5,0; дрібно порізаної желатини – 150,0), доливали водопровідною водою до 1 дм³. Середовище стерилізували протягом 30 хв за тиску 0,5 атм.

2.2. Філогенетичний аналіз

Для виділення сумарної ДНК, культивування бактерій проводили на збагаченому м'ясо-пептонному бульйоні (зМПБ) за температури 37±1 °С протягом доби (склад середовища: м'ясо-пептонний бульйон – 0,1 дм³; глюкоза – 0,1 г; дріжджовий екстракт – 0,5 г) [13,126]. Сумарну ДНК виділяли за стандартною процедурою для грам-позитивних бактерій [107]. Для більш ефективного лізису клітин додавали 1 % лізоциму (Fermentas, Латвія) (10 мг/см³). Виділену ДНК досліджували за допомогою горизонтального гелелектрофорезу в агарозному гелі та ПЛР [107]. Електрофоретичне розділення виділеної ДНК проводили в 1 %-му агарозному гелі в Трис-ацетатній буферній

системі. Молекулярну масу фрагментів ДНК визначали за їх електрофоретичною рухливістю, використовуючи ДНК маркер [126].

Ампліфікацію гена 16S рРНК здійснювали за допомогою універсальних праймерів (Fermentas, Латвія) 27f та 907r (27F 5'-AGAGTTTGATGGCTCAG-3'; 907r 5'-CCGTCAATTCCATTTGAGTTT-3') та 27f і 1492r (27F 5'-AGAGTTTGATGGCTAG-3'; 1492r 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT T-3'). ПЛР проводили на ампліфікаторі «Mastercycler personal 5332» (Eppendorf). Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буферу з сульфатом амонію ((NH₄)₂ SO₄ .), 0,2 мкМоль відповідних праймерів, 200 мкМоль кожного з дезоксирибонуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази (Fermentas, Латвія), 2,0 мМоль хлориду магнію (MgCl₂) (Fermentas, Латвія), 10-50 нг сумарної ДНК відповідного штаму. Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 0,0002 дм³ [126].

Після ампліфікації генів нуклеотидну послідовність отриманого амплікону визначали за допомогою секвенатора «ABI PRISM 310 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США). Результат секвенування отримували шляхом порівняння прямої та зворотної комплементарної послідовностей з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологічні послідовності відбирали з бази даних GenBank. Молекулярно-філогенетичний аналіз здійснено за допомогою методу максимальної правдоподібності. Для з'ясування систематичного положення досліджуваних штамів зі спорідненими було проведено вирівнювання відповідних нуклеотидних послідовностей в програмі ClustalW та побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків в програмі MEGA6 [126].

2.3. Ліофілізація штамів роду *Bacillus*

Як захисне, використовували середовище наступного складу: сахароза – 10 %, желатина – 1 % та агар – 0,02 %. Бактерії переносили в захисне середовище з заданою концентрацією клітин в 1 см^3 , після чого в кількості 5 см^3 вносили в пеніцилінові флакони або в кількості 3 см^3 – в скляні ампули.

Для одержання желатози, 10 %-вий розчин желатини готували з використанням бідистильованої води і автоклавували протягом 1 год. Одержаний розчин желатози фільтрували через фільтрувальний папір, а потім використовували для приготування захисних середовищ.

Для одержання суспензії клітин культуральну рідину осаджували центрифугуванням і ресуспендували в захисному середовищі до концентрації $(1-2) \cdot 10^9$ клітин/ см^3 .

Зразки заморожували в низькотемпературному холодильнику «LAB 11/EL19LT» (Elcold, Данія) за температури $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Заморожені зразки переносили в спеціальних касетах в попередньо охолоджену камеру (температура конденсатора $-50 \text{ }^\circ\text{C}$) ліофільної сушарки «CRUODOS-50» (TELSTAR, Іспанія) (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Ліофільна сушарка «CRUODOS-50»

Ліофілізація проводилась за температури $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ до стабільного залишкового тиску в камері $0,0018\text{ Па}$. Тривалість висушування становила 72 год. Кінцеву вологість контролювали за допомогою аналізатора вологості RADWAG MA 50/C/1 (Польща).

При підготовці ліофілізованого матеріалу для дослідження продуктивності необхідно було виконати дві умови: максимально точно відновити попередній (до висушування) об'єм матеріалу і вивести живі клітини із ліофільного стану. Для виконання цих умов, ліофілізований матеріал доводили дистильованою водою або фізіологічним розчином до об'єму $3\text{--}5\text{ см}^3$ і витримували за кімнатної температури протягом 30 хв.

Підрахунок загальної кількості клітин проводили за допомогою камери Горяєва з паралельним розсівом на чашки Петрі. Підрахунок колоній на чашках Петрі проводили через дві доби культивування за формулою Луста для визначення показника життєздатності:

$$ПЖ = \frac{x \cdot c \cdot R \cdot S \cdot T}{10 \cdot M} \quad (2.1)$$

де:

ПЖ – показник життєздатності;

М – середнє арифметичне значення кількості клітин в камері Горяєва;

х – середнє арифметичне значення кількості колоній в чашках Петрі;

с – кількість крапель в 1 см³ суспензії;

Р – кратність розведень;

S – площа квадрату камери Горяєва: великий квадрат – 1/400, малий квадрат – 1/2500;

T – товщина шару суспензії в камері Горяєва – 0,1мм.

Після регідратації, бактерії піддавали глибинному культивуванню в рідкому середовищі протягом двох діб.

2.4. Методи дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей *B. subtilis* ІМВ В-7797

Вивчення фізіолого-біохімічних ознак мікроорганізмів включало дослідження ферментної активності мікробів, споживання ними різних джерел вуглецю і азоту, характер продуктів життєдіяльності, які нагромаджувалися в поживних середовищах (гази, спирти, кислоти, тощо), а також реагування бактерій на кислоти, луги та інші фактори довкілля. Щоб встановити, які джерела вуглецю є оптимальними для досліджуваних культур, виготовляли спеціальні синтетичні поживні середовища і до них додавали 1 % сполуки джерела вуглецю (яку випробували). Застосовували пентози, гексози, дисахариди, солі органічних сполук, спирти, жири тощо [13,31]. При використанні мікробами сполук вуглецю (вуглеводів) у субстраті як продукти життєдіяльності нагромаджувались органічні кислоти, спирти, гази тощо, які

виявляли за допомогою різних методів (використанням індикаторів, якісних хімічних реакцій, тощо).

Досліджували цукролітичні, протеолітичні, пептолітичні, гемолітичні властивості ізолята виділеної культури. Ідентифікаційне значення мала здатність до перетворення нітратів у нітрити. Для цього, застосовували спеціальні живильні середовища, які засівали мікроорганізмами (строкатий ряд Гісса, МПБ, згорнута сироватка, молоко, тощо). Посіви на вуглеводні середовища (з глюкозою, лактозою, сахарозою, манітом, дульцитом та ін.) проводили розпрямленою у вигляді стрижня бактеріологічною петлею і уколом по центру середовища [2].

Для дослідження здатності бактерій розщеплювати білки (протеолітичні властивості) використовували молоко або середовище з желатином. Середовища із желатином готували на м'ясній воді, додаючи 1 % пептону, 0,5 % NaCl і 10-20 % желатину. Посів робили уколом. Індолоутворення визначали за здатністю культури розщеплювати амінокислоту триптофан під дією ферменту триптофанази. Індол виявляли за допомогою реактиву Ерліха. До бульйонної культури додавали 1 см³ сірчаного ефіру, після чого пробірку добре струшували. Потім, давали ефіру відстоятися і по стінці обережно нашаровували 1 см³ першого реактиву Ерліха. Реактив Ерліха готували завчасно (1 г парадиметиламідобензальдегіду розчиняли в 95 см³ спирту і 20 см³ HCl, щільність 1,19). Далі додавали 1 см³ другого реактиву Ерліха (водний насичений розчин сірчаноокислого калію (K₂SO₄)). За наявності індолу (позитивна реакція) на межі нашарованих рідин з'являлося кільце малинового кольору. Індол виявляли також шляхом використання індикаторних папірців. Для цього, фільтрувальний папір просочували першим реактивом Ерліха, потім його висушували на повітрі й нарізали на тонкі смужки. Первинний колір просочених реактивом Ерліха папірців був жовтим. Зберігали індикаторні папірці у стерильній банці з притертим корком. Для визначення індолу робили посів в пробірку з МПБ, під пробку вставляли індикаторний

папірець (нижній кінець папірця не повинен був торкатися до середовища) і культивували за температури 37 °С протягом 24-48 год.

Для виявлення сірководню робили посів уколом (всередину стовпчика) по стінці в агар з ацетатом свинцю (МПА з 5 % пептону і 0,25 % ацетату свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)) або в пробірку з МПБ, де під пробку над середовищем поміщали смужку стерильного фільтрувального паперу, просоченого розчином ацетату свинцю. Якщо досліджувана культура при розкладанні білка виділяла сірководень, то з'являлося темно-буре забарвлення (почорніння) за місцем уколу в щільному середовищі або на фільтрувальному папірці (у МПБ) [31].

Визначення аміаку починали з того, що під пробку з бульйонною культурою поміщали лакмусовий індикаторний папірець, культуру термостатували за 37 °С протягом 1-3 діб. За наявності аміаку лакмусовий індикаторний папірець набував синього кольору.

Для визначення здатності мікроорганізмів розщеплювати цукри, використовували спеціальні рідкі, напіврідкі і щільні живильні середовища з відповідними цукрами і індикатором. Цукролітична здатність бактерій визначалась за ферментативним розщепленням багатоатомних спиртів і деяких цукрів на альдегіди, кислоти, газоподібні продукти (CO_2 , CH_4 і H_2).

Набір рідких або напіврідких середовищ з вуглеводами і індикатором має назву «строкатий» ряд. Назва «строкатий» ряд зумовлена тим, що під дією ферментів колонії мікроорганізмів, що росте, використані цукри розкладалися до продуктів проміжного розпаду (до органічних кислот) [13]. У результаті накопичення кислот знижувалось рН середовища, змінювався колір індикатора і самого середовища. Якщо досліджувані мікроорганізми були неспроможними до розщеплення тих чи інших цукрів, рН залишалося незмінним, індикатор залишався в знебарвленій формі, а колір середовища також не змінювався. Для визначення цукролітичної здатності бактерій використовували середовища Гісса з індикатором. Вони склалися з

пептонної води, вуглеводів і індикатора (кислий фуксин, знебарвлений розчином їдкового луґу).

Якщо досліджувана культура мікроорганізмів під дією ферменту розкладала вуглеводи з утворенням кислоти, то відбувалося відновлення кольору індикатора і забарвлення середовища (в рожево-малиновий колір з індикатором Андреде або в блакитний з індикатором бромтимоловим синім). Кислота вступала в реакцію з луґом або розоловою кислотою і нейтралізувала їх [13].

2.5. Дослідження впливу мутагенних факторів на штам-продуценти рибофлавіну

2.5.1. Мутагенез за допомогою ультрафіолетового випромінювання

Згідно з методикою, описаною в літературі [6], проведено мутагенез ультрафіолетовим опроміненням (використовували дві лампи «Phillips» потужністю 30 Вт кожна, $\lambda=254$ нм, відстань до об'єкту опромінення – 0,16 м) бактерійних суспензій за кімнатної температури протягом 60-1800 сек. з інтервалом 300 сек. [31]. Мутагенез здійснювали згідно до схеми, що представлена на рис. 2.2, на установці, вигляд якої представлений на рис. 2.3.

Опромінену бактерійну суспензію розсівали у різних розведеннях (від початкової концентрації суспензії до розведення 10^{-6}) на мінімальне L-середовище [6]. Витримували культуру в термостаті протягом 24 год. за температури 37 ± 1 °С. Встановлювали кількості життєздатних клітин у вихідній популяції і опромінених колоній.

Всі колонії перевіряли щодо продукування рибофлавіну. Найбільш продуктивні клони відбирали для наступних етапів і подальших досліджень.

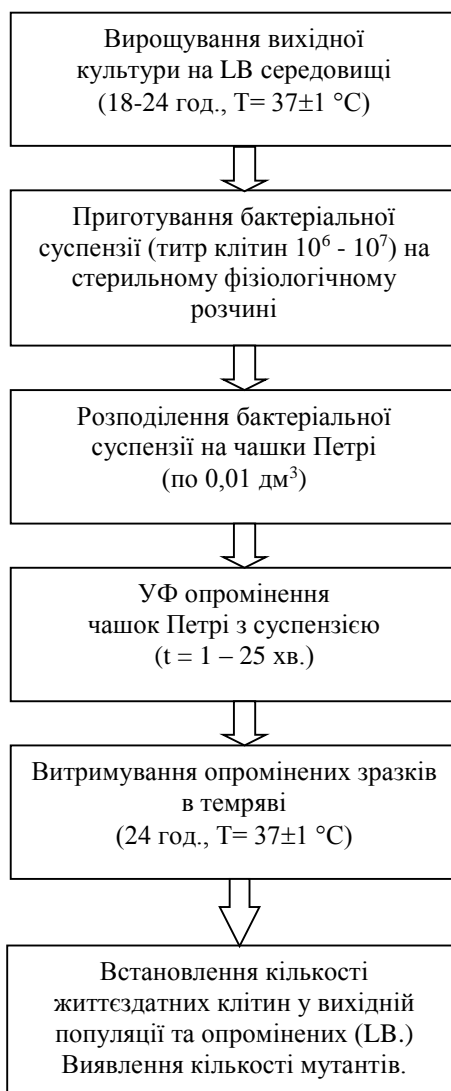


Рис. 2.2. Загальна схема мутагенезу продуцента рибофлавіну

2.5.2. Хімічний мутагенез з використанням NTG

Бактеріальну суспензію (титр клітин $10^6 - 10^7$) готували у стерильному фізіологічному розчині. Суспензію вибраних клонів інкубували на шейкері (220 об./хв.) за температури 36-38 °C протягом 5-30 хв у Трис-малатному буфері (рН 6,0), що містив від 100 до 500 $\mu\text{г}/\text{дм}^3$ N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідін (NTG) . Потім, клітини промивали у 0,1 Моль Трис-фосфатному буфері з рН 7,2. В подальшому, бактерійну суспензію, отриману методом розведень, розсівали на чашки Петрі. Кількість клітин, що виживали,

визначали за кількістю колоній штамів *B. subtilis*, які вирости на LB середовищі [13, 31].



Рис. 2.3. Установка для опромінення бактеріальної культури УФ, $\lambda=254$ нм

2.6. Культивування штаму-продуцента рибофлавіну в біореакторі

Культивування проводили в біореакторі «Sartorius Biostat В TWIN» (ФРН) з лопатевою мішалкою і об'ємом колб 10 дм³. Інокулят (10 % об'ємних) вносили в біореактор до ензиматичного середовища з початковим об'ємом середовища – 30 % від об'єму біореактора.

Склад інокуляційного середовища (г/дм³): м'яса 30 г, амоній сірчаноокислий – 4 дм³, магній сірчаноокислий – 0,5 дм³, кукурудзяний екстракт – 15 г, вода водопроводна – до 1 дм³, рН 7,2±0,1.

Склад ензиматичного середовища (г/дм³): дріжджі хлібопекарські сухі – 65 г; кукурудзяний екстракт – 25 г; амоній сірчаноокислий (NH₄)₂SO₄) – 10 г; магній сірчаноокислий – 2,5 г; калій ортофосфорний (K₃PO₄) – 6,25 г; вода дистильована – до 1 дм³, рН 7,2±0,1.

Склад вуглецевого підживлення (загальний об'єм – 2,350 дм³) (г): дріжджі сухі – 40 г; кукурудзяний екстракт – 50 г; глюкоза – 1500 г; вода дистильована до кінцевого об'єму. Ємність з середовищем, оснащена силіконовою трубкою і дренажним фільтром, стерилізували протягом 40 хв за температури 121 °С. Готове підживлення у скляних пляшках 2 дм³ (Simax, Чехія) підключали до біореактора. Для підтримання рН використовували аміачну воду (25 %), як піногасник використовували «Пропінол Б400» (виробник ТОВ «Альхім»), який стерилізували протягом 30 хв за температури 120 °С [126].

2.6.1. Умови та процес культивування в біореакторі.

Перед початком процесу культивування перевіряли біореактор на герметичність омилуванням за тиску повітря в біореакторі 1 атм. Для цього, перекривали подачу та вихід повітря з біореактора та витримували 1 год. У біореактор заливали 3 дм³ питної води (робоча частина датчиків була занурена у воду) та стерилізували ферментер з водою в автоклаві протягом 40 хв. за температури 130 °С. Встановлювали ферментер на стенд, підключали до комунікацій повітря і охолоджувальної води, встановлювали мінімальний рівень аерації за тиску 0,1-0,2 атм., охолоджували воду у біореакторі до 45-50 °С. Приєднували за допомогою факелу бутлі до завантажувальних патрубків ферментера. Для асептичної захисту силіконових трубок та пробовідбірника використовували 6 %-й розчин H₂O₂ з витримкою не менше 10 хв. Після того, як всі шланги підключили до ферментера, перекачували

стерильний концентрат поживного середовища. Залишки середовища з бутля контролювали на стерильність. Встановлювали у ферментері температуру 37 °С, після чого відбирали пробу на стерильність. Пробу висівали на LB агар та витримували 24 год. за температури 37 °С у термостаті та 2-5 см³ проби поміщали до колби з рідким LB середовищем на 24 год. за температури 37 °С. Інокулят вирощували на качалках протягом 18 год. і 10 % за об'ємом вносили в біореактор з ензиматичним середовищем. Концентрація біомаси на 18 год. культивування становила 16,9 г/дм³ одиниці, рН 7.0-7.1. Вуглеводне підживлення додавали в залежності від зменшення рівня глюкози. Параметри культивування вказані в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

**Параметри культивування штаму-продуцентау рибофлавіну
B. subtilis IMB B-7797**

Показник	Значення
Температура	37±1 °С
Подача повітря	3,5 м ³ /год (1об/об середовища за хвилину)
Значення водневого показника, рН	7,0±0,2
Частота обертання мішалки, с ⁻¹	6,0-6,6 (360-400 об./хв.)
Тиск в апараті	0,03-0,04 МПа

Процес культивування завершували, коли знижувався рівень споживання глюкози (дві проби підряд був відсутній значний приріст рибофлавіну, а рівень глюкози був сталим за відсутності додавання підживки) [126]. Для завершення процесу ферментації, спочатку переставали додавати цукрову підживку, і коли рН виростав до показників 7,5-7,6 культивування завершували.

2.7. Статистичне оброблення експериментальних результатів

Обчислення середньоквадратичного відхилення. Середньоквадратичне відхилення σ обчислювали за формулою:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, \quad d = X_i - X_{\text{ср}}, \quad (2.2)$$

де d – різниця між окремими показниками параметру і середньою арифметичною величиною ($X_i - X_{\text{ср}}$); n – кількість досліджуваних зразків; X_i – значення параметру для окремого зразка; $X_{\text{ср}}$ – середнє арифметичне параметру всіх досліджуваних зразків [2].

Значення вірогідності отриманих даних обраховували за методикою В. Ю. Урбаха [13] з використанням t -критерію Ст'юдента та вважали достовірними при рівні значимості $p < 0,05$. Усі досліди проводили в трьох повтореннях.

РОЗДІЛ 3

ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ РИБОФЛАВІНУ

3.1 Виділення мікроорганізмів з природних джерел

Бактерії роду *Bacillus* широко розповсюджені у природньому середовищі. Їх знаходять на поверхні листків рослин, у повітрі, ґрунті і мулі прісних та морських водойм [31]. Найбільш характерним природним біотопом для них є поверхня бульб картоплі й насіння багатьох рослин [2, 13]. Чисельність цих бактерій у літній період сягає багатьох сотень тисяч клітин на 1 г субстрату. Для виділення та розмноження культури бактерій з досліджуваного матеріалу (молоко, м'ясо, вода, ґрунт тощо) у лабораторіях використовують метод посіву та пересіву [13]. Нами було досліджено мікроорганізми та їх кількість, отримані методом реплік з 9 зразків бульб картоплі.

Зразки були взяті з дерново-слабо- і середньопідзолистих піщаних та глинисто-піщаних ґрунтів Київської області. В усіх зразках були виявлені наступні колонії мікроорганізмів: аскоміцети, дріжджі, бактерії. Визначення кількості мікроорганізмів в зразках (табл 3.1) дало змогу підібрати потрібне розведення для виділення чистої культури потрібних мікроорганізмів.

Таблиця 3.1

Кількість мікроорганізмів в зразках відбитків з бульб картоплі

№ зразка	Кількість мікроорганізмів, млн. КУО/г
1	150± 15
2	109± 20
3	910± 18
4	200±50
5	600±52
6	843±20
7	430±19
8	761±33
9	234±41

В усіх зразках спостерігали один або більше видів мікроорганізмів, що мали форму паличок та були добре рухливі. В багатьох зразках було виявлено суміші культур, які надалі для виділення чистих культур мікроорганізмів, що продукували рибофлавін, було проведено розсіювання методом граничних розведень [2]. Використання запропонованого методу дало змогу отримати поодинокі чисті колонії. Особливу увагу було приділено двом типам колоній, які за морфологічними ознаками нагадували типові колонії роду *Bacillus* – світло-жовті, неправильної форми, та колонії амебоподібної форми, жовтокоричневого кольору (рис. 3.1).



А

Б

Рис. 3.1. Типи колоній, що вирости на L агарі, характерні для роду *Bacillus*: світло-жовті колонії (а) та жовто-коричневі колонії (б), 48 год. Збільшення 1.6x

У процесі культивування відібраних штамів відбувалося їх розщеплення на два типи колоній у співвідношеннях, наведених на рис. 3.2.



Рис. 3.2. Співвідношення різних типів колоній *Bacillus* в культурі

За результатами дослідження, було показано, що у культурі превалюють світло-жовті колонії (87 %) у співвідношенні до жовто-коричневих (13 %).

Подальше очищення та пересіви дали змогу виділити два незалежних клони з різною морфологією колоній. Було відмічено, що ці клони не розщеплювались та не змінювали свої характеристики протягом 10 пересівів. Було здійснено перевірку клонів за здатністю до накопичення рибофлавіну (рис.3.3.).

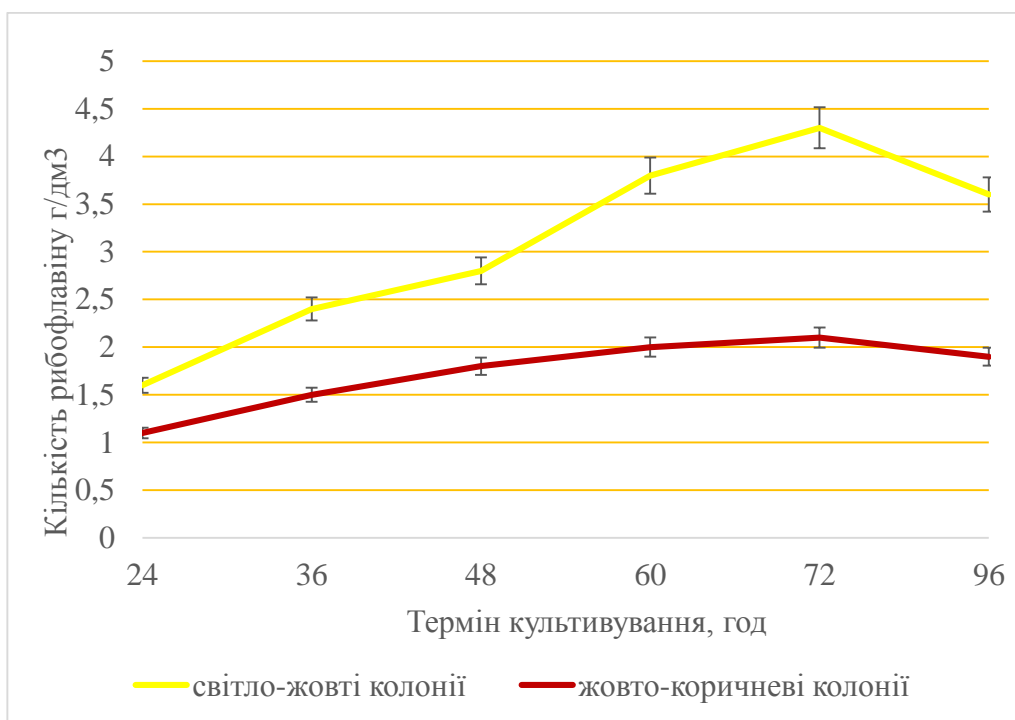


Рис. 3.3. Накопичення рибофлавіну різними типами колоній культури в динаміці, $p < 0,05$

Процес культивування здійснювали протягом 96 год. На 24-ту год. ферментації у культиваційному середовищі рибофлавін був присутній в незначній кількості (1,6 г/дм³ за культивування світло-жовтих колоній і 1,1 г/дм³ за культивування жовто-коричневих), тобто, протягом першої доби відбувалася адаптація мікроорганізмів до нового поживного середовища. Активне утворення рибофлавіну відбувалося на другу добу і досягало максимальної величини на 72-ту год. культивування (4,3 г/дм³ за культивування світло-жовтих колоній і 2,1 г/дм³ за культивування жовто-коричневих колоній). На 96-ту год. культивування накопичення рибофлавіну

значно знижувалося (3,6 г/дм³ за культивування світло-жовтих колоній і 1,9 г/дм³ за культивування жовто-коричневих колоній). Припускаємо, що клітини мікроорганізмів використовували рибофлавін в незначних кількостях для підтримки життєдіяльності свого організму. Також, 15 % рибофлавіну руйнувалося під дією УФ випромінювання. Колонії із світло-жовтим і жовтокоричневим забарвленням розсівали методом граничних розведень, відібрали 10 клонів (номери згідно табл. 3.2) і провели дослідження їх здатності до накопичення рибофлавіну.

Таблиця 3.2

**Накопичення рибофлавіну клонами
(72 - га год. культивування)**

№ клону	Пігмент	Концентрація рибофлавіну, г/дм³
1	Жовто-коричневий	1,8± 0,5
2	Світло-жовтий	3,9± 0,4
3	Жовто-коричневий	2,0± 0,6
4	Жовто-коричневий	2,1± 0,6
5	Світло-жовтий*	4,3± 0,5
6	Світло-жовтий	3,5± 0,4
7	Світло-жовтий	3,3± 0,3
8	Жовто-коричневий	2,0± 0,5
9	Світло-жовтий*	4,2± 0,6
10	Жовто-коричневий	1,9± 0,4

Примітка: * — найбільш продуктивні клони для подальших досліджень.

Кількість рибофлавіну в культуральній рідині визначали на 72 год. культивування. Клони світло-жовтого забарвлення (клони 2, 5 та 9) продукували найбільшу кількість рибофлавіну (3,9; 4,3 та 4,2 г/дм³). Клони з

жовто-коричневим забарвленням накопичували меншу кількість рибофлавіну (2,1 г/дм³). Було відібрано клон 5, який продукував 4,3 г/дм³ рибофлавіну та мав світло-жовте забарвлення колоній, для подальшого дослідження чистоти культури, властивостей мікроорганізму і встановлення його видової приналежності.

3.2 Ідентифікація виділених мікроорганізмів, дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей

Біохімічна активність мікробів надзвичайно різноманітна. Вона залежить від характеру і кількості тих ферментів, які мікробна клітина продукує і виділяє в зовнішнє середовище [13, 31]. Було проведено ідентифікацію виділених клонів за визначником бактерій Бердже, та встановлено їх культурально-морфологічні і фізіолого-біохімічні особливості. Загальний процес ідентифікації бактерій за видовою приналежністю проводили у декілька етапів:

- 1) визначення морфологічних особливостей (колоній і окремих клітин);
- 2) оцінка фізіологічних особливостей (споживання кисню і джерел живлення);
- 3) ідентифікація за продуктами ферментативної активності (розщеплення протеїнів, вуглеводів) [13, 31].

Виділені бактерії мали тенденцію до поверхневого росту. Часто утворювали безбарвну або блакитну плівку у вигляді ледь-помітного нальоту на поверхні, яка зникала при струшуванні або збовтуванні середовища. Плівка була волога, товста, мала в'язку, слизоподібну консистенцію і прилипала до петлі, тягнучись за нею. Однак, зустрічалась і щільна, суха, крихка плівка, колір якої залежив від пігменту, що вироблявся мікроорганізмами. Деколи відбувалося утворення осаду на дні пробірки. Він був крихтоподібним. Середовище над ним ставало каламутним. Було проведено мікроскопіювання

всіх досліджених зразків, як живих препаратів, так і зафарбованих вітально з використанням метиленового синього (рис. 3.4.)

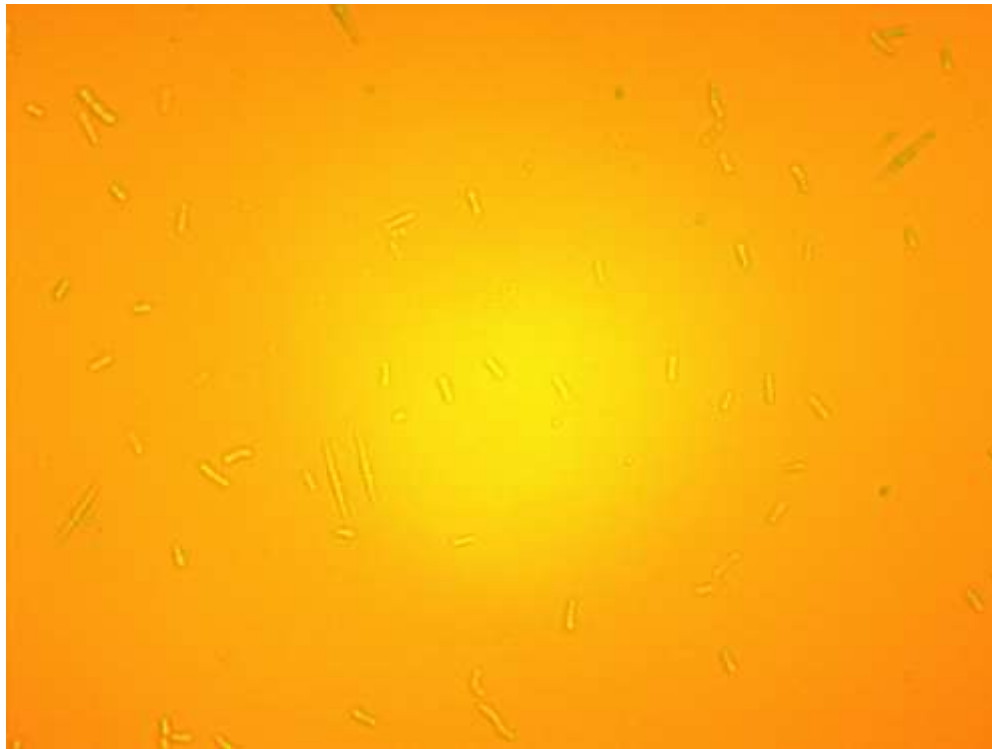


Рис. 3.4. Морфологія клітин, 24 година культивування на L середовищі за температури 38 °С, штам *B. subtilis* ІМВ В-7797, збільшення 40х

За допомогою цитологічного аналізу встановлено, що у досліджених зразках представлено прямі паличкоподібні клітини бактерій, розміром 0,4-2,0 x 1,3-5,0 мкм, розташовані поодинокі, попарно, або ланцюжком. Бактерії росли на МПА і утворювали колонії з наступними характеристиками: колір – сірувато-білий, форма – неправильна, поверхня – гладенька, структура – дрібнозморшкувата, прозорість – матова, консинстенція – пастоподібна, колонії з рівненькими краями, які злегка вросли в агар. Ріст в рідкому середовищі супроводжувався помутнінням середовища, утворенням плівки сірувато-білого кольору, утворенням осаду.

Було відібрано клітини з поодинокі колонії на агаризованому середовищі та перенесено їх у рідке. За 24 год. зразки культури відбирали для проведення диференціювання мікроорганізмів за біохімічними властивостями

клітинної стінки методом забарвлення за Грамом, яке має велике значення у ідентифікації і систематики бактерій (рис. 3.5.).



Рис. 3.5. Фарбування за Грамом клітин на 24 година культивування на L середовищі за температури 38 °С, штам *B. subtilis* ІМВ В-7797, збільшення 40х

Показано, що за фарбування клітини набули темно-синього забарвлення, що свідчило про приналежність їх до грамп-озитивних бактерій. Мікроорганізми надалі культивували й у рідкому середовищі. Згодом, готували мазок 72 год. культури для виявлення спор та визначення їх властивостей (рис. 3.7). Спори фарбували за методом, описаним в літературі [13, 31].

Виявлено чітко окреслені спори (рис. 3.6.), забарвлені блакитним або синім кольором, а цитоплазма молодих клітин, забарвлена рожевим або червоним. Було встановлено, що розмір клітин коливався у діапазоні: 0,4-2,0 x 1,3-5,0 мкм. Через 72-168 год. культивування кожна клітина штамів утворювала одну спору, яка була розташована в центрі материнської клітини, розтягування клітини не спостерігалось. Спори були овальної форми і мали розмір 0,9x0,6 мкм.

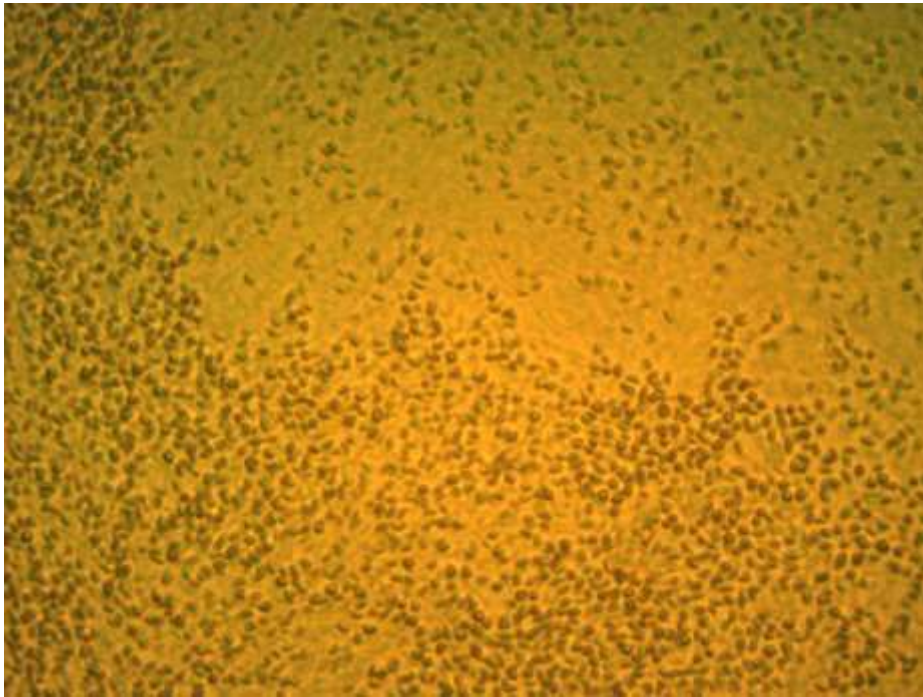


Рис. 3.6. Морфології спор культури в L середовищі. Штам *B. subtilis* IMB B-7797, збільшення 90x

Для продовження видової ідентифікації культури спори висівали у рідке поживне середовище та культивували протягом 18 год. Одним з важливих параметрів для систематики бактеріального виду є рухливість. Бактерії за механізмом рухливості поділяють на дві групи: ті, що «повзають», і ті, що «плавають». Ті, що «повзають», рухаються по твердій поверхні завдяки хвилеподібним скороченням клітини, ті, що «плавають» – завдяки джгутикам [13]. Джгутики мають не всі бактерії, більшість бактерій не плавають. Здатність утворювати джгутики генетично обумовлена [2]. Зразки добової культури фарбувалися за методом, опублікованим раніше [2, 13]. Результати дослідження представлені на рис. 3.7.

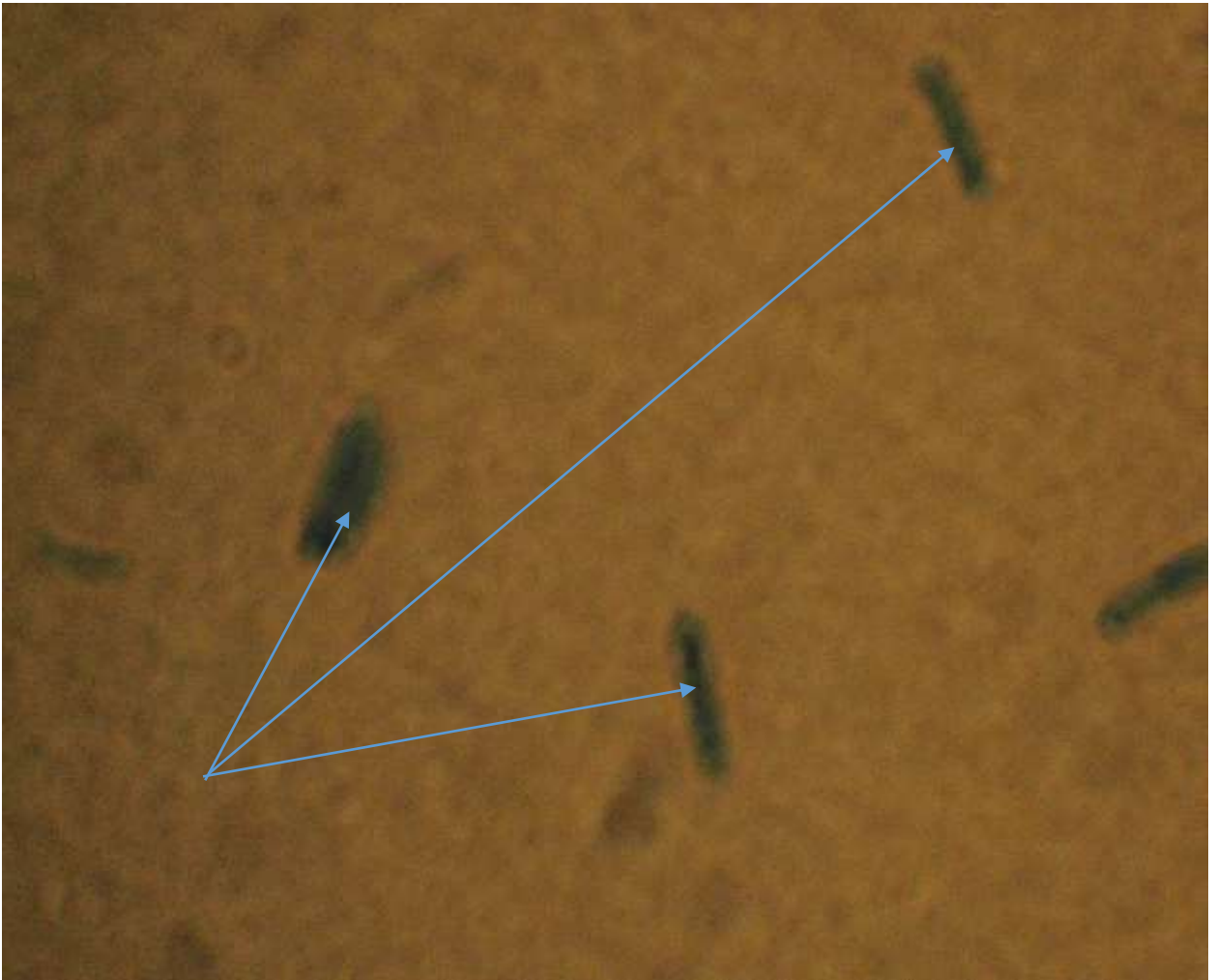


Рис. 3.7. Морфології джгутиків культури, збільшення 100x

За результатами цитологічного дослідження показано, що мікроорганізми мали перитрихіально розташовані джгутики. Використовуючи техніку мікроскопіювання у краплі [6, 13, 31], було показано, що швидкість пересування поодиноких клітин за секунду давала їм змогу долати відстані у 20-50 разів більше, ніж їх довжина. За несприятливих умов розвитку культури, старінні клітин або механічному пошкодженні, рухливість клітин втрачалась.

Для визначення здатності культури до конверсії різних видів джерел вуглецю її висівали на кольорові середовища Гіса та культивували за температури 37 ± 1 °C (рис. 3.8.).



Рис. 3.8. Вирощування культури на кольоровому ряді Гіса з індикатором Андреде для визначення властивостей до збродження цукрів за температури 30° С на 72 год. Штам *B. subtilis* ІМВ В-7797

У процесі культивування на середовищі з арабінозою і манітом відбувалося зменшення рН. Бактерії гідролізували крохмаль і засвоювали азот у вигляді солей амонію. В середовищах різного складу, де джерелом вуглецю була сахароза, клітини накопичували рибофлавін у кількості 4,3 г/дм³.

Після визначення особливостей клона № 5 остаточну ідентифікацію виду проводили за допомогою «Короткого визначника бактерій Бердже» [130]. Новий штам було введено в «Колекцію штамів мікроорганізмів та ліній рослин для сільськогосподарської та промислової біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» як IFBG МК-2 та депоновано в Дипозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України як *Bacillus subtilis* ІМВ В-7797.

У процесі досліджень було порівняно новий штам з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для сільськогосподарської та промислової біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за такою ознакою фенотипу, як природня стійкість бактерій до

антибіотиків. Дані про резистентність мікроорганізму до антибіотиків наведені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Чутливість штамів-продуцентів рибофлавіну до антибіотиків

Антибіотик	Концентрація антибіотиків, мкг	<i>B.subtilis</i>
Ампіцилін	10	--+
Стрептоміцин	10	--+
Левоміцетин	30	+
Тетрациклін	30	--+
Гептоміцин	10	+
Неоміцин	15	+
Цепарин	15	+
Тобраміцин	10	+
Еритроміцин	15	-
Хлорамфенікол	30	-

Примітка: «-» — культура не чутлива,

«+ -» - культура мало чутлива

«+» — культура чутлива.

Із отриманих даних випливає, що штам *B. subtilis* чутливий до антибіотиків левоміцетин, гептоміцин, неоміцин, цепарин, тобраміцин, малочутливий до антибіотиків стрептоміцину, тетрацикліну та стійкий до антибіотиків еритроміцину та хлорамфеніколу. Отримані дані дозволяють культивувати новий штам з використанням антибіотиків еритроміцину та хлорамфеніколу, щоб уникнути зараження культури.

Отже, виділений штам-продуцент рибофлавіну, який накопичував 4,3 г/дм³ на середовищі з глюкозою та сахарозою на 72 год. культивування, ідентифіковано за «Визначником бактерій Бердже» та класифіковано як штам

B. subtilis [130]. Цей штам було використано для подальших досліджень як вихідний для розробки технології продукції рибофлавіну.

Для удосконалення штаму-продуцента необхідною є також молекулярна видова ідентифікація штаму. Для встановлення таксономічного положення досліджуваного штаму проведено секвенування фрагменту гена 16S рРНК з прямого і зворотного праймерів, а отримані послідовності порівняли з депонованими у базі даних GenBank. У результаті секвенування було отримано фрагменти гена, сумарна довжина яких склала 1305 п.н. Секвеновані послідовності гена 16S рРНК штаму *B. subtilis* IMB B-7797 (IFBG МК-2) було зареєстровано в базі даних GenBank з реєстраційними номерами МК880455 та МК880456 [126].

Порівняння отриманого сумарного фрагменту із наявними в базі даних GenBank за допомогою алгоритму blastn, показало, що за подібністю нуклеотидних послідовностей штаму IFBG МК-2 ідентифіковано як *B. subtilis*, а ідентичність отриманої послідовності становить 99 % із послідовністю 16S рРНК гена типового штаму *B. subtilis* IAM 12118 [126].

Отримані послідовності наведено нижче:

МК880455

```

1  agaaatggcg  gcgtgctata  catgcagtcg  agcggacaga  tgggagcttg
ctccctgatg
      61  ttagcggcgg  acgggtgagt  aacacgtggg  taacctgcct
gtaagactgg  gataactccg
     121  ggaaaccggg  gctaataaccg  gatggttggt  tgaaccgcat
ggttcaaaca  taaaagggtg
     181  cttcggctac  cacttacaga  tggacccgcg  gcgcattagc
tagttggtga  ggtaacggct
     241  caccaaggca  acgatgcgta  gccgacctga  gagggtgatc
ggccacactg  ggactgagac
     301  acggcccaga  ctctacggg  aggcagcagt  agggaatctt
ccgcaatgga  cгааagtctg
     361  acggagcaac  gccgcgtgag  tgatgaaggt  tttcggatcg
taaagctctg  ttgttaggga
     421  agaacaagta  ccgttcgaat  agggcggtac  cttgacggta
cctaaccaga  aagccacggc

```

```

          481  ttactacgtg  ccagcagccg  cggtaatacg  taggtggcaa
gcgttgtccg gaattattgg
          541  gcgtaaaggg  ctcgcaagcg  gtttctttag  tctgatgtga
aagccccccg ctcaaccggg
          601  gagggtcatt  ggaaactggg  gaacttgagt  gcagaagagg
agagtggaat tccc

```

МК880456

```

    1  ggggggttcc  cgccccttag  tgctgcagct  aacgcattaa  gcattccgcc
tgggggagtac
          61  ggtcgcaaga  ctgaaactca  aaggaattga  cggggggcccg
cacaagcggg ggagcatgtg
          121  gtttaattcg  aagcaacgcg  aagaacctta  ccaggtcttg
acatcctctg acaatcctag
          181  agataggacg  tccccttcgg  gggcagagtg  acaggtggtg
catggttgtc gtcagctcgt
          241  gtcgtgagat  gttgggttaa  gtcccgcaac  gagcgcaacc
cttgatctta gttgccagca
          301  ttcagttggg  cactctaagg  tgactgccgg  tgacaaaccg
gaggaagggtg gggatgacgt
          361  caaatcatca  tgccccttat  gacctgggct  acacacgtgc
tacaatggac agaacaaagg
          421  gcagcgaaac  cgcgaggtta  agccaatccc  acaaatctgt
tctcagttcg gatcgcagtc
          481  tgcaactcga  ctgcgtgaag  ctggaatcgc  tagtaatcgc
ggatcagcat gccgcggtga
          541  atacgttccc  gggccttgta  cacaccgccc  gtcacaccac
gagagtttgt aacacccgaa
          601  gtcggtgagg  taacctttta  ggagccagcc  gccgaagggtg
ggacagatga t

```

Для визначення філогенетичного положення *B. subtilis* ІМВ В-7797 (ІFBG МК-2) серед типових представників роду *Bacillus* здійснено філогенетичний аналіз і побудовано дендрограму на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК з використанням методу Neighbour Joining і двопараметричної моделі Кімури для оцінки еволюції послідовностей (рис.3.9). Структура філогенетичного дерева даного методу вираховувалась на основі подібності між нуклеотидними послідовностями [26,126].

За представленими результатами досліджень отримано новий продуцент рибофлавіну *B. subtilis* ІFBG МК-2 з підвищеним рівнем синтезу в порівнянні з вихідним штамом , який обрано для використання в подальшій розробці

біотехнологічного процесу продукції ним рибофлавіну. Штам депоновано в Українській колекції мікроорганізмів за № UCM В-7797. При дослідженні нешкідливості виділеного штаму отримано висновок про належність його до групи авірулентних мікроорганізмів (BSL level 1), що вказує на відсутність небезпеки при роботі з культурою та можливість використання її в промисловості (Додаток А).

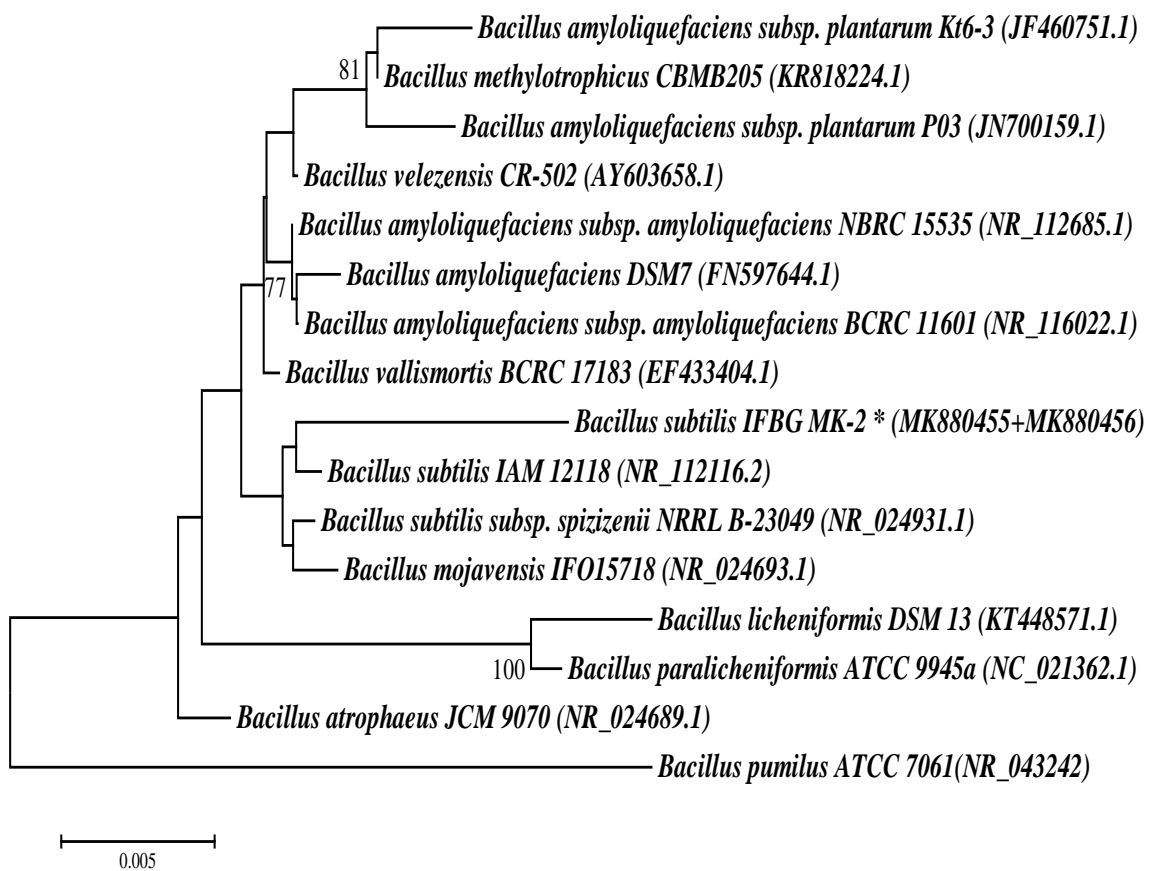


Рис. 3.9. Дендрограма генетичної подібності між штамом *B. subtilis* IFBG МК-2 та типовими штамами роду *Bacillus* IAM 12118

3.3. Ліофілізація штаму *B. subtilis* IFBG NTG2 для тривалого зберігання

Традиційні методи підтримання культур мікроорганізмів зводяться до їх вирощування на багатих живильних середовищах з частими пересівами. При

цьому, спостерігаються мутаційні зміни і автоселекція, які часто призводять до втрати важливих фізіолого-біохімічних властивостей. Тривале зберігання культур мікроорганізмів без втрати властивостей продуцентів можливе, якщо різко припинити всі процеси, які протікають в клітині. При цьому клітина переводиться в стан, близький до анабіозу [7].

При ліофілізації у більшості мікроорганізмів відбувається часткова загибель клітин, а у деяких випадках – зміна їх властивостей [102]. Крім того, характеристики ліофілізованих культур (кількість життєздатних клітин, залишкова вологість, структура сухого матеріалу, тощо) залежать від правильного проведення кожної операції і визначаються, в свою чергу, фізіологічними властивостями мікроорганізму, який підлягає ліофілізації [7, 31]. У зв'язку з цим, існує необхідність визначення впливу різних факторів ліофілізації на життєздатність клітин. Для тривалого зберігання штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* ІМВ В-7797, було проведено його ліофілізацію і визначено продуктивність та життєздатність культури (табл.3.4).

Таблиця 3.4

Продуктивність та життєздатність клітин штаму-продуцента рибофлавіну після зберігання у ліофілізованому вигляді

Культура	Після сушіння		Після 12 міс зберігання	
	Кількість клітин, КУО/ см ³	Накопичення рибофлавіну, г/дм ³	Кількість клітин, КУО/см ³	Накопичення рибофлавіну, г/дм ³
<i>B. subtilis</i> ІМВ В-7797	$2,7 \cdot 10^{11}$	4,3±0,3	$3,3 \cdot 10^{10}$	4,1±0,2

Бактеріальну суспензію в захисному середовищі (агар, желатоза, фруктоза) в кількості 0,3 см³ вносили в скляну ампулу. Після закінчення

сушіння в зразках визначали вміст життєздатних клітин і оцінювали структуру сухої біомаси на наявність дефектів [126].

Для відновлення сухої культури матеріал розводили в 3 см³ фізіологічного розчину, через 30 хв. суспензію висівали на чашки Петрі з МПА. Подальше культивування штаму на глюкозному ензиматичному середовищі протягом 72 год., показало, що накопичення рибофлавіну не змінювалось після зберігання ліофілізованих бактерій за температури 4 °С протягом одного місяця, але з підвищенням температури під час зберігання продуктивність штаму знижувалась на 4% [26].

Зберігання штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* ІМВ В-7797 у ліофілізованому вигляді протягом 12 місяців за температури 4 °С практично не впливало на продуктивність та життєздатність.

Отримані результати дають змогу зробити висновок, що штам-продуцент рибофлавіну *B. subtilis* ІМВ В-7797 після тривалого зберігання в ліофілізованому вигляді не втрачає свої властивості і культуру можна використовувати для досліджень та застосування в умовах пілотних установок.

Отже, з 9 видів картоплі виділено 10 клонів з колоній із різним забарвленням, що мали морфологію типову для бактерій роду *Bacillus*, а також були здатні до накопичення рибофлавіну. Показано, що клони з жовто-коричневим забарвленням накопичували менше рибофлавіну, ніж клони з світло-жовтим забарвленням колоній. Клон з найбільшим накопиченням рибофлавіну відібрано для встановлення культурально-морфологічних особливостей [26, 126].

Показано, що, відповідно до «Визначника бактерій Бердже» за культурально-морфологічними ознаками виділений штам-продуцент рибофлавіну (IFBG МК-2) належить до виду *B. subtilis*.

За допомогою молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК штаму IFBG МК-2 отримано підтвердження, що виділений штам належить до виду *B. subtilis*. Порівняння отриманого сумарного фрагменту із наявними послідовностями бази GenBank за допомогою алгоритму blastn показало, що отримана послідовність володіє 99% ідентичності з послідовністю гена 16S рРНК типового штаму *B. subtilis* IAM 12118.

Показано, що зберігання штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* ІМВ В-7797 у ліофілізованому вигляді протягом 12 місяців за температури 4 °С практично не впливало на продуктивність та життєздатність [26, 126].

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в публікаціях:

Радченко, М.М., Бейко, Н.Є., Андріяш, Г.С., Тігунова, О.О. та Шульга С.М., 2019. Виділення та ідентифікація штаму-продуцента рибофлавіну. Фактори експериментальної еволюції організмів. 24, С. 154-159. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1094>

Radchenko, M. M., Tigunova, O. O., Zelena, L. B., Beiko, N. Y., Andriiash, H. S. and Shulga, S. M., 2021. Phylogenetic Analysis of the *Bacillus subtilis* IFBG МК-2 Strain and Riboflavin Production by Its Induced Clones. *Cytology and Genetics*. 55(2), P. 145–151. Doi: 10.3103/s0095452721020134 **Q3**

РОЗДІЛ 4

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТА

4.1. Вплив терміну культивування інокуляту на накопичення біомаси та рибофлавіну штамом *B. subtilis* ІМВ В-7797

З літературних джерел [6, 31, 49, 83] відомо, що *B. subtilis* в природних умовах синтезує рибофлавін для підтримування життєдіяльності свого організму. Для культивування мікроорганізмів має значення склад середовища і технологічні умови, які забезпечували б високий рівень накопичення необхідних метаболітів, а саме рибофлавіну. Одним із критеріїв, які впливають на накопичення цільового продукту, є якість інокуляту [28]. Цей критерій перш за все залежить від терміну культивування посівного матеріалу. Було досліджено вплив терміну культивування інокуляту на накопичення рибофлавіну в ензиматичному середовищі після 72-ох год. культивування (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Вплив терміну культивування інокуляту на накопичення біомаси та рибофлавіну

Термін культивування інокуляту, год	Концентрація після культивування, г/дм ³	
	Біомаса	Рибофлавін
8	12,3 ± 0,4	2,60 ± 0,18
12	15,2 ± 0,5	3,20 ± 0,12
16	16,8 ± 0,3	4,40 ± 0,21
20	17,1 ± 0,4	4,30 ± 0,16
24	18,0 ± 0,3	4,10 ± 0,09

Отримані дані свідчать, що використання інокуляту у пізній експоненційній фазі росту (20-24 год.) вело до кінцевого підвищення накопичення біомаси бактерій. Проте, використання саме таких інокулятів призводило до зменшення кінцевого накопичення рибофлавіну, порівняно з використанням посівного матеріалу за терміну культивування 16-20 год. Визначено, що оптимальним було використання інокуляту за терміну культивування 16 год., при цьому накопичення рибофлавіну після ферментації складало 4,4 г/дм³. Це можна пояснити тим, що саме в цей час більшість клітин знаходяться в експоненційній фазі росту, що добре видно під час мікроскопіювання [124]. Так, більшість клітин було витягнутої форми, спори не були утворені, продукти життєдіяльності містилися в невеликій кількості, а отже дані показники передували майбутньому поділу клітин.

4.2. Вплив технологічних параметрів ферментації на накопичення рибофлавіну штамом *B. subtilis* ІМВ В-7797 рибофлавіну в колбах Ерленмєєра

На накопичення цільового продукту впливав не лише термін культивування інокуляту, а й концентрація посівного матеріалу. Було проведено дослідження впливу відсотку внесеного посівного матеріалу на накопичення біомаси і рибофлавіну після 72-ох год. культивування (табл.4.2).

Показано, що найбільше накопичення рибофлавіну на 72-гу год. культивування спостерігалось при внесенні 10 % посівного матеріалу. У випадку внесення посівного матеріалу в об'ємі 5 % накопичення рибофлавіну на 72-гу год. культивування було незначним і складало 1,15 г/дм³ [124].

**Вплив кількості внесеного інокуляту
на накопичення біомаси та рибофлавіну**

Кількість інокуляту, %	Накопичення після культивування, г/дм ³	
	Біомаса	Рибофлавін
1	8,2± 0,3	0,60± 0,08
5	12,3 ± 0,4	3,40 ± 0,11
10	15,8 ± 0,5	4,90 ± 0,09
20	10,8 ± 0,4	4,70 ± 0,10

Високе накопичення рибофлавіну було відмічено при внесенні 10 % посівного матеріалу (4,2 г/дм³), але, в зв'язку з тим, що процес накопичення починався пізніше ніж активне утворення біомаси, максимум накопичення рибофлавіну спостерігався в інтервалі від 56 год. до 66 год. культивування. При внесенні 1 % посівного матеріалу накопичення рибофлавіну на 72-гу год. культивації була невисоким (0,1 г/дм³), що можна пояснити незначною кількістю біомаси. Було показано, що збільшення частки посівного матеріалу до 20 % пригнічувало накопичення біомаси і вихідного продукту. Встановлено, що оптимальна кількість посівного матеріалу складала 10 % від об'єму ферментаційного середовища. Відповідно, в подальших дослідженнях використовували посівний матеріал 16-ти год. культивування у кількості 10 % [124].

Для підтримки життєдіяльності мікроорганізму та синтезу важливих сполук, в тому числі і рибофлавіну, необхідні вуглецевмісні сполуки, що використовуються як основне джерело енергії. Тому, було досліджено вплив вуглеводів глюкози, фруктози і сахарози на накопичення рибофлавіну та біомаси штамом ІМВ В-7797 (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

Вплив джерел вуглецю на накопичення біомаси та рибофлавіну

Джерело вуглецю	Накопичення, г/дм ³	
	Біомаса	Рибофлавін
Глюкоза	14,6 ± 0,4	5,20 ± 0,12
Сахароза	15,8 ± 0,5	4,90 ± 0,09
Фруктоза	12,8 ± 0,4	4,8 ± 0,10

При вирощуванні культури на різних вуглеводах було встановлено, що оптимальним для накопичення рибофлавіну було середовище з глюкозою, проте найбільше біомаси утворювалося на середовищі з сахарозою, а саме: 4,9 г/дм³ і 15,8 г/дм³, відповідно; на глюкозі – 5,2 г/дм³ і 14,6 г/дм³, відповідно, на фруктозі – 4,8 г/дм³ і 12,8 г/дм³. Тому, для подальших досліджень ми обрали середовище із глюкозою, як основним джерелом вуглецю. Однак, не лише джерело вуглецю, але і його концентрація впливала на накопичення біомаси і цільового продукту [31]. Було досліджено вплив різної концентрації глюкози на накопичення рибофлавіну та біомаси культури *B. subtilis* IMB В-7797 табл. 4.4).

Показано, що підвищення концентрації глюкози в культуральному середовищі впливало на процес біосинтезу рибофлавіну. При підвищенні кількості глюкози в ензиматичному середовищі з 30 до 120 г/дм³ накопичення біомаси та рибофлавіну зростало пропорційно. Внесення більш ніж 120 г/дм³ глюкози в культуральну рідину практично не вело до збільшення накопичення рибофлавіну і пригнічувало ріст біомаси. За цими результатами обрано оптимальну концентрацію джерела вуглецю – глюкози – у кількості 120 г/дм³, що дало змогу отримати до 7,2 г/дм³ рибофлавіну у культуральній рідині.

**Вплив кількості внесеної глюкози
на накопичення біомаси та рибофлавіну**

Накопичення, г/дм ³		
Глюкоза	Біомаса	Рибофлавін
30	12,3 ± 0,4	3,40 ± 0,14
50	13,8 ± 0,4	5,60 ± 0,18
80	15,8 ± 0,4	6,80 ± 0,21
120	16,1 ± 0,5	7,20 ± 0,16
150	14,9 ± 0,5	7,1 ± 0,18

Іншим важливим фактором, що впливав на ріст мікроорганізмів та їх фізіологічну активність, була температура культивування мікроорганізмів [3]. Досліджено процес накопичення біомаси та синтезу рибофлавіну штамом *B. subtilis* ІМВ В-7797 в залежності від температури культивування (рис. 4.1).

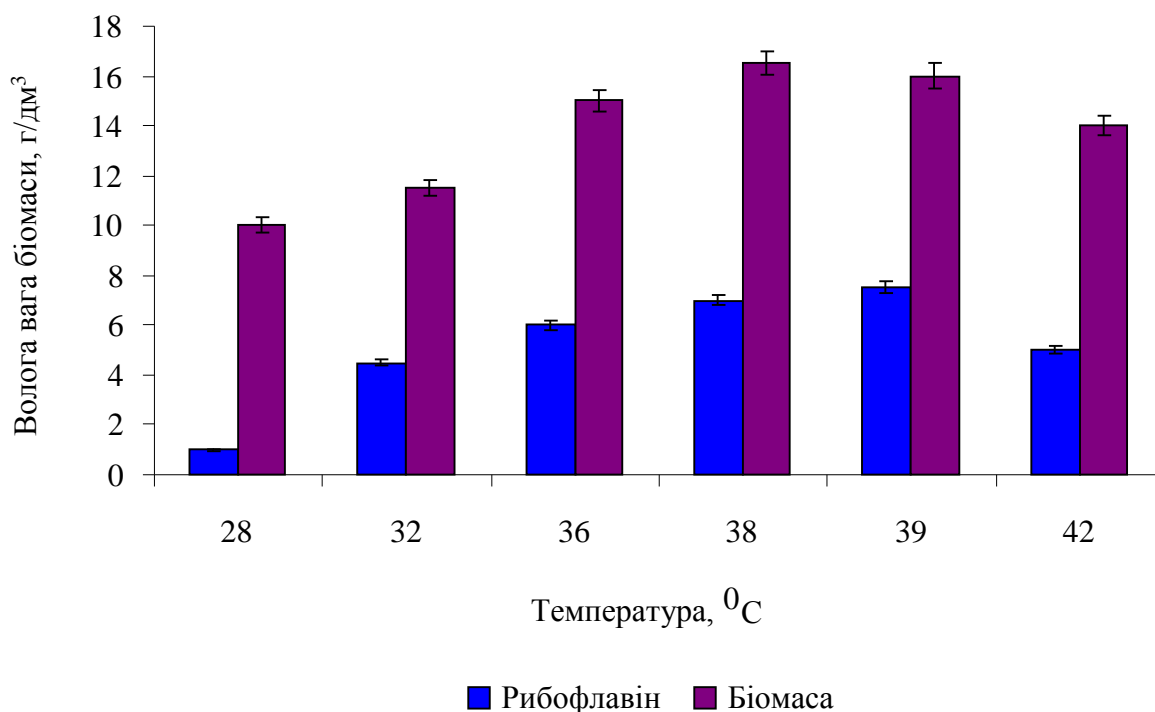


Рис. 4.1. Вплив температури культивування на синтез біомаси та рибофлавіну штамом *B. subtilis* ІМВ В-7797, на ферментаційному середовищі, $p < 0,05$

Показано, що підвищення температури з 28 до 39 °С привело до підвищення накопичення біомаси. Подальше підвищення температури культивування до 42 °С призводило до зменшення накопичення біомаси. Накопичення рибофлавіну підвищувалося до 8 г/дм³ із зміною температури з 28 до 39 °С, проте, за подальшого підвищення температури синтез рибофлавіну падав до 3,86 г/дм³. Отже, для підвищення накопичення рибофлавіну штам *B. subtilis* IMB B-7797 потрібно культивувати за 38 °С. Подальші дослідження проводили саме за такої температури [124].

4.3. Вплив величини рН на синтез біомаси та рибофлавіну штамом *B.subtilis* IMB B-7797

Суттєвий вплив на накопичення біомаси та синтез рибофлавіну має рН культурального середовища. Досліджено вплив різних величин рН на приріст біомаси і синтез рибофлавіну штамом *B. subtilis* IMB B-7797 (рис. 4.2).

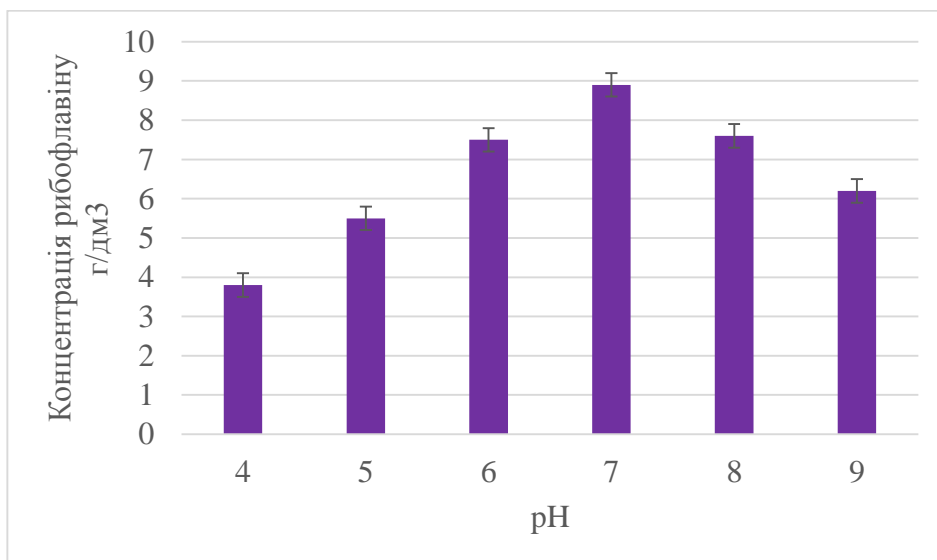


Рис. 4.2. Вплив величини рН на синтез біомаси та рибофлавіну штамом *B. subtilis* IMB B-7797

За результатами проведених досліджень встановлено, що максимальне накопичення біомаси відбувалося за величини рН 7,0. При цьому,

максимальна кількість синтезованого рибофлавіну була 8,9 г/дм³. Показано, що коливання рН від 5,2 до 7,5 несуттєво впливали на накопичення біомаси та синтез рибофлавіну. В подальшому дослідження проводили при рН 7,0.

4.4 Динаміка накопичення рибофлавіну штамом *B. subtilis* ІМВ В-7797

Для оптимізації терміну культивування було досліджено рівень накопичення рибофлавіну в динаміці. Культивування проводилося протягом 96 год., рівень накопичення рибофлавіну вимірювали кожні 12 год. (рис. 4.3).

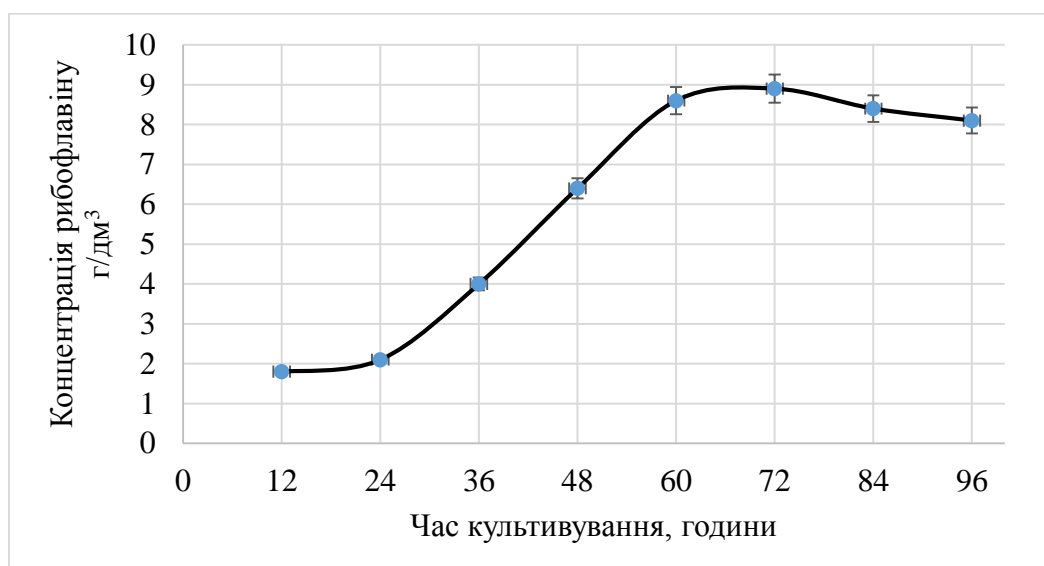


Рис. 4.3. Динаміка накопичення рибофлавіну штамом *B.subtilis* ІМВ В-7797 в залежності від часу культивування, на Lсередовищі $p < 0,05$

Встановлено, що оптимальний час для культивування складав 66-72 год. Зі збільшенням часу культивування більше 72-год., рівень накопичення рибофлавіну в культуральному середовищі знижувався. Такі результати можна пояснити тим, що при збільшенні терміну культивування *B. subtilis* ІМВ В-7797. Мікроорганізми починали використовувати рибофлавін для накопичення біомаси [124].

У підсумку, синтез рибофлавіну можна збільшити за допомогою змін умов культивування. В результаті підбору умов культивування (термін культивування інокуляту 16 год., кількість внесеного інокуляту 10 %, глюкоза як джерело вуглецю у концентрації 120 г/дм³, температура культивування 38 °С, рН 7,0, термін культивування 72 год) накопичення рибофлавіну підвищилось більше ніж в 2 рази (з 4,3 г/ дм³ до 8,9 г/ дм³) [124].

В ході роботи нам вдалося збільшити рівень накопичення рибофлавіну культурою *B. subtilis* ІМВ В-7797 за допомогою оптимізації різноманітних умов культивування. Визначено оптимальну кількість (10 % від кількості ензиматичного середовища) і термін культивування (16 год.) посівного матеріалу, необхідні для максимального синтезу рибофлавіну. Вивчено вплив джерел вуглецю на синтез рибофлавіну і показано, що найбільше накопичення рибофлавіну спостерігалось на середовищі з глюкозою як джерелом вуглецю. Встановлено, що оптимальна концентрація глюкози в ензиматичному середовищі становить 120 г/дм³, оптимальний температурний режим культивування становить 38 °С, а оптимальне рН культурального середовища – 7,0. Вивчена динаміка накопичення рибофлавіну у часі та визначено оптимальний термін культивування – 72 год. У сукупності, отримані дані засвідчують, що синтез рибофлавіну ким? можна підвищити у більше ніж 2 рази (з 4,3 г/л до 8,9 г/л) за допомогою оптимізації умов культивування, в порівнянні з неоптимізованими умовами [124].

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в публікації:

Radchenko M., H. Andriiash, N. Beyko, O. O. Tiginova, S. M. Shulga. 2020. Optimization of the cultivation conditions of the riboflavin strain producer. *Biotechnologia Acta*, V. 13, No 2, P. 48-55. DOI: [10.15407/biotech13.02.048](https://doi.org/10.15407/biotech13.02.048)

РОЗДІЛ 5

УФ-МУТАГЕНЕЗ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТА РИБОФЛАВІНУ

Одним із методів одержання нових штамів мікроорганізмів з підвищеною продуктивністю є селекція мутантних клонів [46-49]. Спонтанні мутанти бактерій зазвичай виявляють з частотою $1 * (10^{-6}-10^{-8})$. Можна суттєво збільшити цю частоту, обробивши клітини мутагенами. Мутагени індукують мутації у дозах, які одночасно спричиняють летальний ефект.

5.1. Чутливість клітин *B. subtilis* ІМВ В-7797 до дії ультрафіолетового опромінення

Види бактерій, а також штами одного виду, можуть різнитися за чутливістю до мутагенів. Передусім, необхідно було встановити, як впливають різні дози ультрафіолетового (УФ) опромінення на виживання спор. Оскільки УФ-опромінення – відносно слабкий мутагенний фактор, найкращі результати отримують за виживання клітин від 0,1 % до 1,0 %. Необхідно також максимально зменшити ефект фотореактивації. Для цього потрібно жорстко підтримувати умови УФ-опромінення (без домішок видимого світла) і проводити подальше вирощування бактерій у повній темряві [31]. Залежність кількості колоній культури *B. subtilis* штам? від тривалості опромінення представлено на рис. 5.1. Умови дослідження (відстань між УФ-лампю та поверхнею чашки з культурами, їх фізіологічний стан, хімічний склад та рН середовища) були незмінними, тому біологічні ефекти від опромінення залежали лише від тривалості опромінення. Для *B. subtilis* штам? LD₅₀ (доза, що зумовлює виживання 50 % клітин) дорівнювала 7 хв, а найбільший мутагенний ефект у дозах, за яких виживання клітин становило від 0,1 % до 1 % (гине 99,0-99,9 %) був за тривалості опромінення 20 хв. [126].

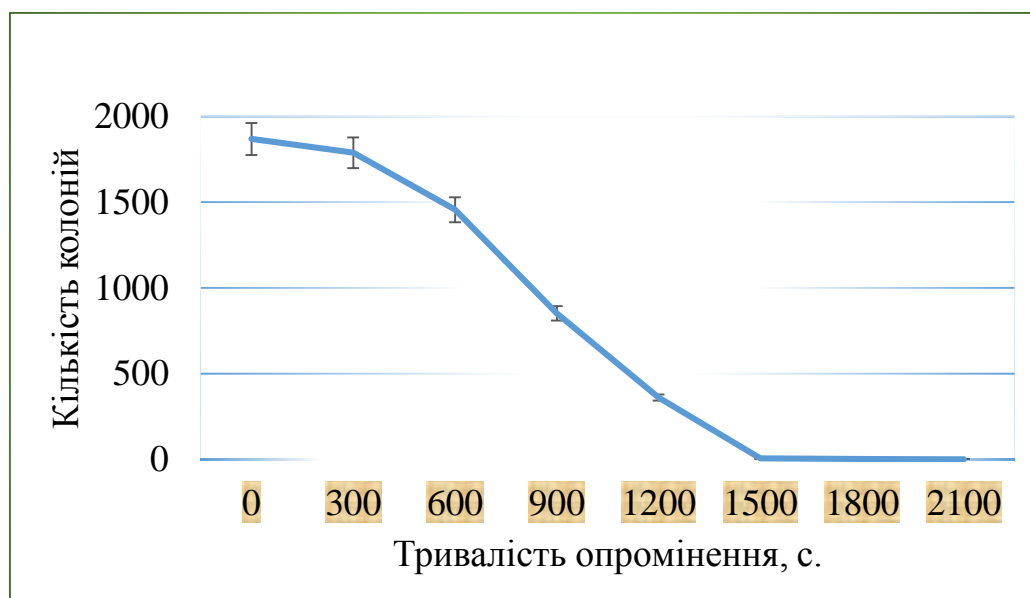
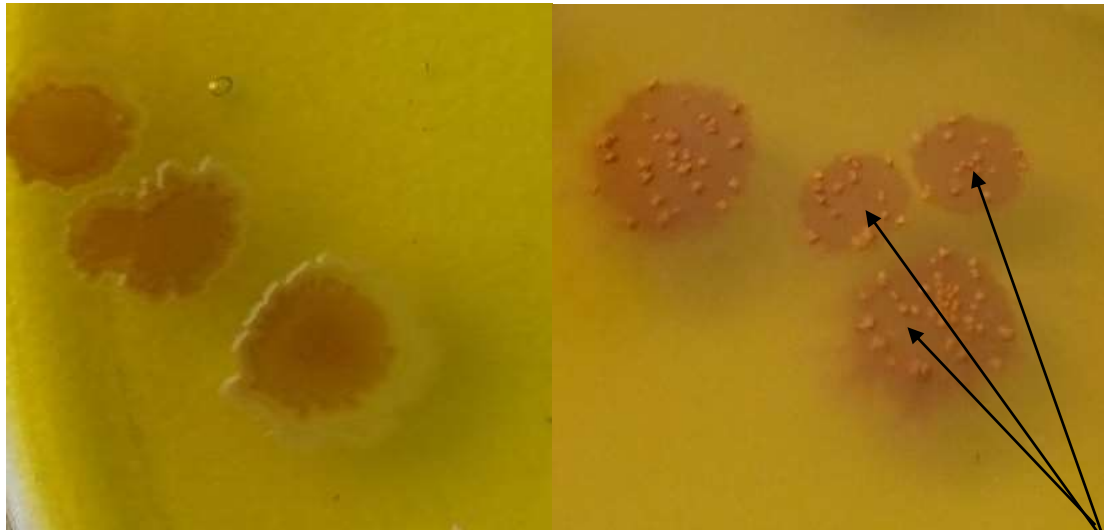


Рис. 5.1. Кількість колоній культури *B.subtilis* IFBG МК-2 за дії УФ-опромінення, $p < 0,05$

Після висівання живих клітин на агаризоване L-середовище отримано 1869 колоній бактерій. Усі колонії було проаналізовано, відмічено особливості росту, форму колонії та її країв, розмір забарвленої зони навколо колонії та її розміри, порівняно з колоніями вихідної культури. Показано, що кількість колоній, які мали відмінності від вихідного штаму, збільшувалась лінійно зі збільшенням дози УФ-опромінення (в нашому випадку до 20 хв.). Подальше збільшення тривалості опромінення (до 20-30 хв.) не супроводжувалось зміною життєздатності [126].

5.2. Морфологія та життєздатність бактеріальної культури штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А після опромінення

Після визначення летальної дози УФ-опромінення для *B. subtilis* IFBG МК-2 і розсіву опромінених клітин на повноцінне середовище L агару, з найбільшого розведення (10^{-7}) було відібрано 5 колоній (табл. 5.1.), які відрізнялись за морфологічними ознаками. Такі колонії були менші за розміром, мали коричневе забарвлення і візуально-помітні кристали рибофлавіну на поверхні колоній (рис. 5.2).



a *б* Кристали рибофлавіну

Рис. 5.2. Колонії культури *B. subtilis* IMB В-7797 (*a*) вихідні та (*б*) після УФ-опромінення, збільшення 1.6х

Колонії з морфологічними відмінностями було відсіяно і перевірено на накопичення рибофлавіну флуорометричним методом(рис. 5.3).

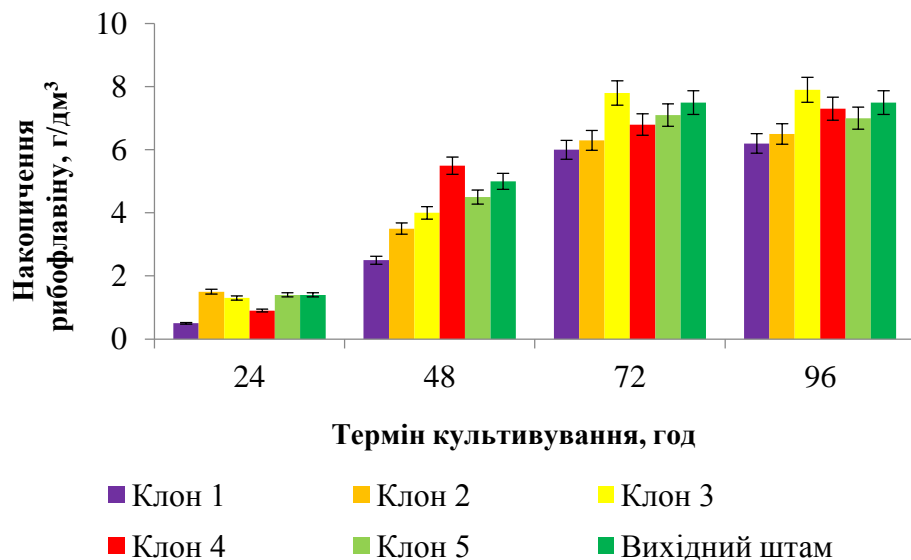


Рис. 5.3. Накопичення рибофлавіну клонами після першого етапу опромінення, за культивування на ферментаційному середовищі, при температурі 39°C, $p < 0,05$

Із результатів дослідження видно, що найбільше накопичення рибофлавіну спостерігалось у клона № 3. Відібрані спори було повторно опромінено протягом 20 хв із збереженням всіх умов попереднього етапу. Отримані чотири колонії, які виростили на чашках Петрі після опромінення, культивували протягом 48 год. [126].

Таблиця 5.1

Життєздатність бактеріальної культури після опромінення

Розведення	Вихідна культура	Опромінена культура	
		Життєздатні колонії	Мутантні колонії
10^{-6}	$1450 \pm 0,23$	$580 \pm 0,9$	$49 \pm 0,3$
10^{-7}	$150 \pm 0,23$	$60 \pm 0,9$	$5 \pm 0,3$

Отримані спори обробляли за допомогою УФ-лампи в такому ж режимі, що і на першому етапі.

5.3. Накопичення рибофлавіну індукованими штамми *B. subtilis* IFBG MK-1A

Після проведення першого етапу УФ-опромінення було відібрано 5 клонів, що відрізнялися за своєю морфологією для подальших досліджень та наступного етапу опромінення. Рівень накопичення рибофлавіну у відібраних клонів представлено на рис. 5.4.

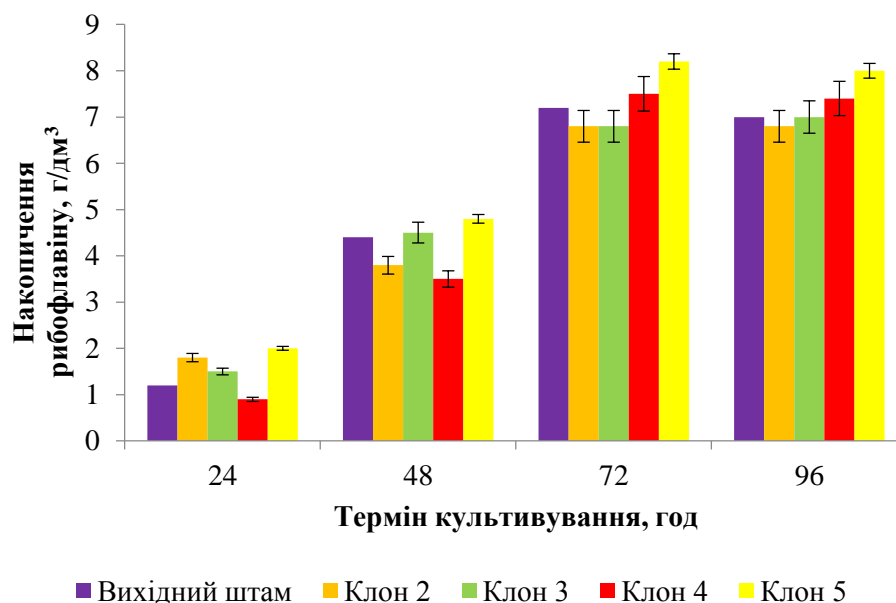


Рис. 5.4. Накопичення рибофлавіну клонами після другого етапу опромінення,
* – $p < 0,05$

Як видно з рис. 5.4. найбільше накопичення рибофлавіну було за культивування клону № 5. Використовуючи відібраний клон було проведено третю процедуру з опромінення за умов ідентичних до умов перших двох етапів опромінення. За результатами дослідження було отримано три колонії, які перевірили на здатність накопичувати рибофлавін у культуральній рідині в порівнянні з вихідним штамом (рис. 5.5.). Показано, що найбільше накопичення було за культивування клону 2 та становило $9,6 \text{ г/дм}^3$. З отриманою культурою було проведено ще два етапи опромінення з наступним послідовним селективним відбором і отримано дві колонії (клони № 1 і № 1А) та визначено накопичення рибофлавіну (рис. 5.6.).

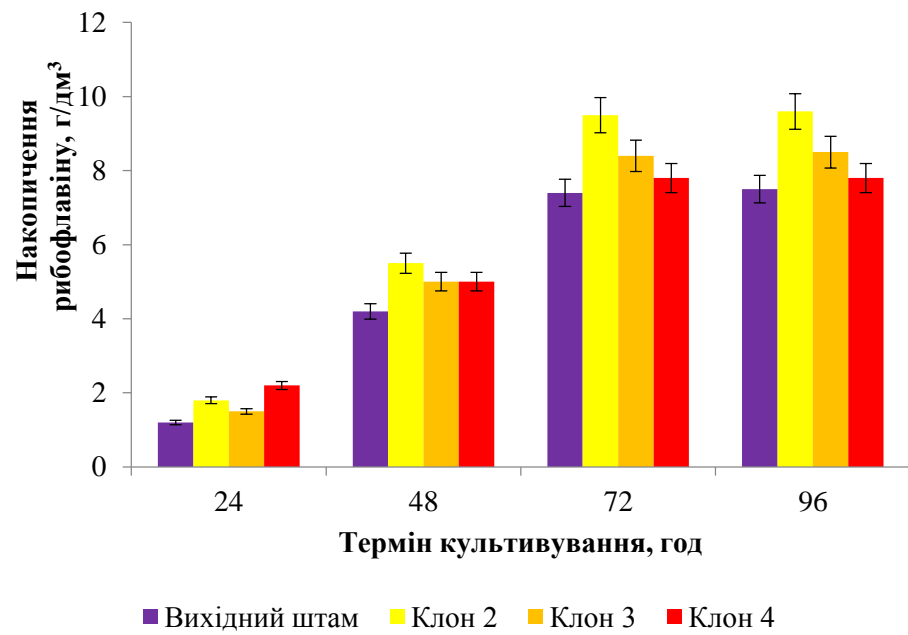


Рис. 5.5. Накопичення рибофлавіну клонами після третього етапу опромінення, * – $p < 0,05$

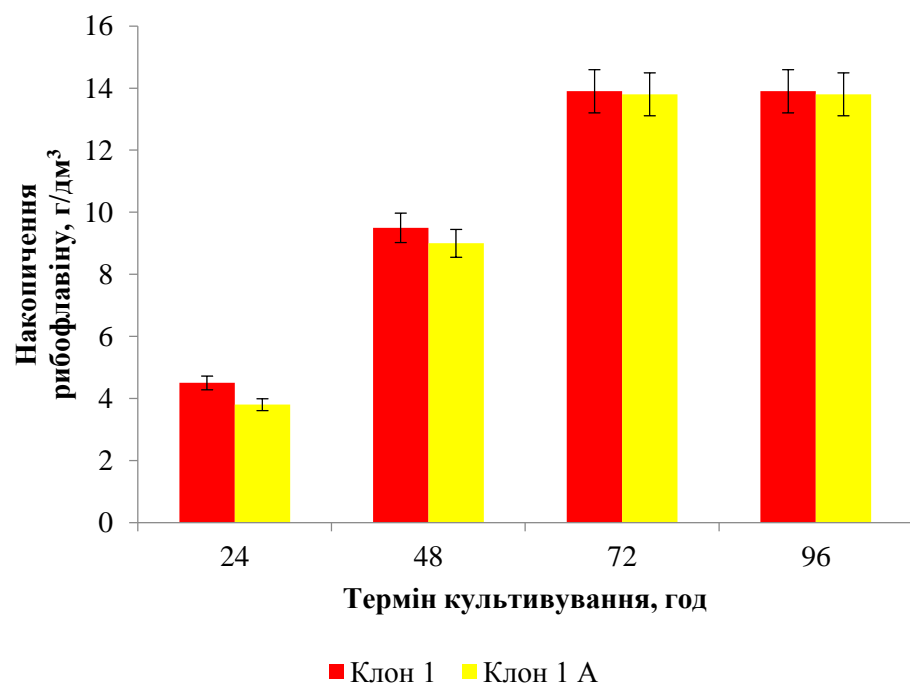


Рис. 5.6. Накопичення рибофлавіну клонами після четвертого і п'ятого етапу опромінення, * – $p < 0,05$

За рівнем накопичення рибофлавіну отримані клони № 1 та № 1А майже не відрізнялись, і продукували рибофлавін в концентрації 13,98 і 13,85 г/дм³, відповідно. Культуру пересівали на агаризоване і в рідке середовища з подальшим визначенням морфологічних ознак, а накопичення рибофлавіну моніторили протягом двох місяців (з інтервалом у два тижня). Виявилось, що морфологічні ознаки культури залишалися незмінними, а накопичення рибофлавіну під час пересівів було майже однаковим (в діапазоні від 13,87 до 13,98 г/дм³).

В результаті дії УФ-опромінення на спори *B. subtilis* IFBG В -7797 було отримано мутантний штам *B. subtilis* IFBG МК-1А, який за морфологічними ознаками (колонії меншого розміру, коричневого кольору з візуально видимими кристалами рибофлавіну) і біосинтетичною активністю відрізнявся від вихідної культури. Методом індукованого мутагенезу з використанням УФ-опромінення і послідовним ступінчастим відбором одержано стійкий до УФ мутантний штам *B. subtilis* IFBG МК-1А, який продукував рибофлавін майже на 50 % більше (13,98 г/дм³) в порівнянні з вихідним штамом (8,9 г/дм³) [126].

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в публікації:

Radchenko M. M., Tiginova O. O., Zelena L. B., Beiko N. Ye., Andriiash H. S. & Shulga S. M.. 2021. Phylogenetic Analysis of the *Bacillus subtilis* IFBG МК-2 Strain and Riboflavin Production by Its Induced Clones. *Cytol Genet.*, vol. 55, no. 2, pp. 145–151. DOI: [10.3103/S0095452721020134](https://doi.org/10.3103/S0095452721020134)

РОЗДІЛ 6

ХІМІЧНИЙ МУТАГЕНЕЗ З ВИКОРИСТАННЯМ NTG ШТАМУ

B. SUBTILIS IFBG МК-1А ПРОДУЦЕНТУ РИБОФЛАВІНУ

Останнім часом проведена велика кількість досліджень, спрямованих на підвищення виробництва рибофлавіну і розробку кращих ензиматичних середовищ. Різноманітні методи (УФ-опромінення, індукований мутагенез, антиметаболітний мутагенез і метаболічні інженерні підходи) було використано для підвищення продуктивності штамів дикого типу. Виникнення мутантів – досить рідкісне явище. Спонтанні мутанти бактерій зазвичай виявляють з частотою 10^{-6} – 10^{-8} [3, 31]. Можна суттєво збільшити цю частоту, обробивши клітини хімічними мутагенами. Передусім встановлюють, як впливають різні дози мутагену на виживання клітин [2, 25].

Для надання необхідних властивостей штамам-продуцентам вносять зміни в геном за допомогою методів і підходів класичної селекції, мутагенезу або за допомогою генетичної інженерії [1, 6]. Після таких маніпуляцій з культурою необхідно перевірити життєздатність і стабільність отриманих штамів, а також біосинтетичну активність накопичення рибофлавіну.

6.1. Життєздатність клітин *B. subtilis* IFBG NTG2 під дією хімічного мутагену

Вихідний штам *B. subtilis* IFBG МК-1А накопичував 13,98 г/дм³ рибофлавіну. Для збільшення накопичення рибофлавіну було проведено обробку мутагеном вихідної культури і визначено вплив хімічного мутагенезу на життєздатність клітин бактерій. Кількість клітин, що виживали, визначали за кількістю колоній, які виростили на середовищі LB-агар [25, 26].

Життєздатність клітин під дією NTG змінювалась в залежності від терміну дії мутагену. В роботі була використана оптимальна концентрація мутагену 50 мкг/дм³, літературними даними через 35 хв. не залишалось жодних життєздатних клітин (рис. 6.1).

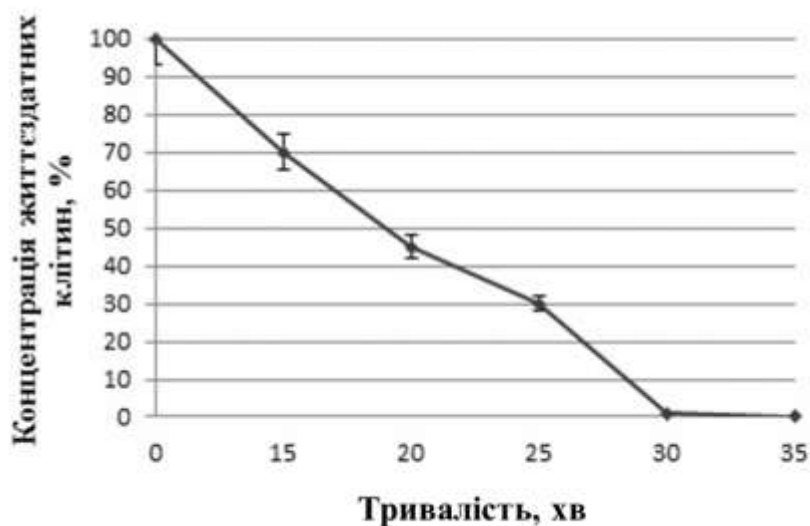


Рис. 6.1. Життєздатність клітин *B. subtilis* IFBG МК-1А під дією мутагену NTG тут і далі * – $p < 0,05$. Контролем слугував показник КУО (100 %) в необробленій бактеріальній суспензії)

Біологічні ефекти від оброблення мутагеном залежали лише від тривалості дії мутагену, всі інші умови дослідження (такі, як фізіологічний стан бактерій, хімічний склад і рН середовища, концентрація мутагену) були незмінними. Оптимальний час оброблення мутагеном – 30 хв. За час оброблення кількість загинувших бактерій склала майже 99 % [25-27].

6.2. Морфологічна гетерогенність культури *B. subtilis* IFBG NTG2, отриманої за дії NTG

Після висівання культур, оброблених НГ, на LB агар, спостерігали утворення колоній, що відрізнялися за своїми морфологічними характеристиками (рис.6.2).

Усього, після експозиції до НГ, було виділено 16 незалежних клонів *B. subtilis* з різною морфологією, зокрема:

- типові колонії, світло-жовтого забарвлення;
- колонії неправильної форми і колонії амебоподібної форми, жовто-коричневого кольору;
- білі, напівпрозорі колонії амебоподібної форми;
- світло-жовті колонії з темно-коричневою серединкою амебоподібної форми [25-28].

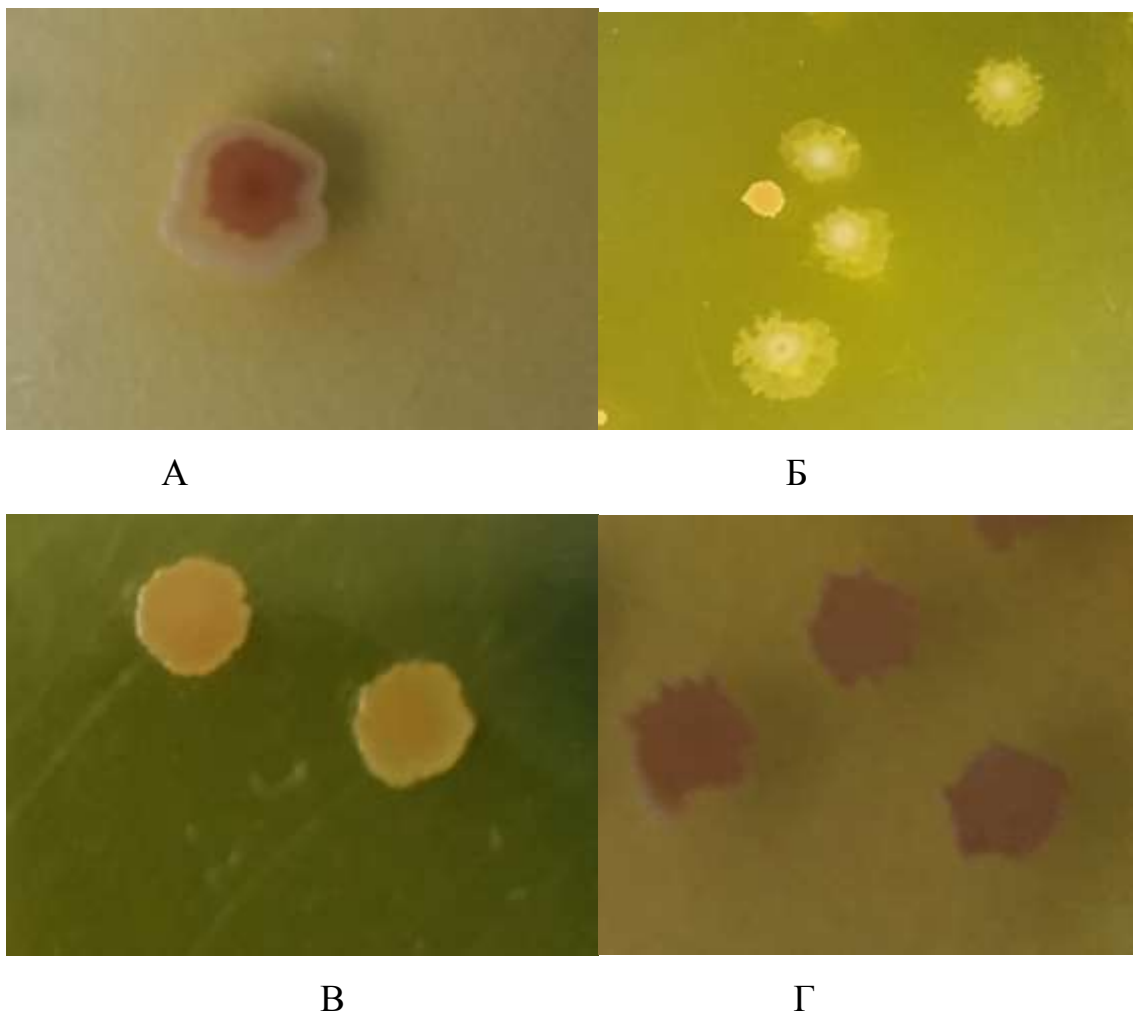


Рис. 6.2. Вигляд виділених колоній *B. subtilis*, отриманих в результаті..., збільшення 1,6: А – світло-жовті колонії з темно-коричневою серединкою амебоподібної форми; Б – білі напівпрозорі колонії амебоподібної форми; В – матові колонії – світло-жовтого кольору; Г – неправильної форми та колонії амебоподібної форми жовто-коричневого кольору; збільшення 1.4x

Формування різних типів колоній відбулося у співвідношеннях, показаних на рис. 6.3.

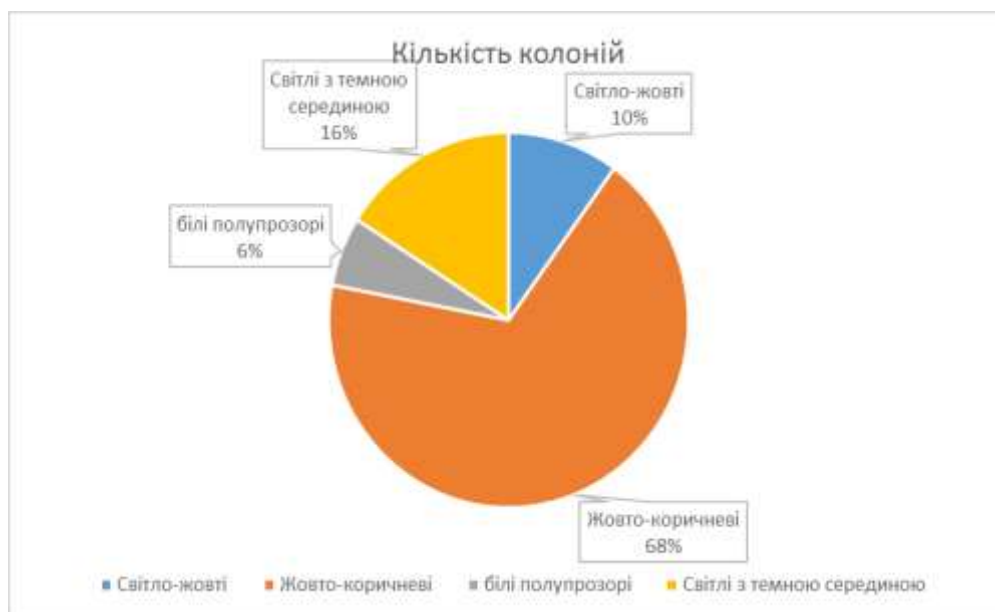


Рис. 6.3. Співвідношення різних типів колоній *B. subtilis* після проведення мутагенезу

6.3. Накопичення рибофлавіну штамом *B. subtilis* IFBG NTG2

Колонії з морфологічними відмінностями відсівали і проводили культивування отриманих мутантних штамів на глюкозному середовищі протягом трьох діб для визначення накопичення рибофлавіну. Результати дослідження наведено в таблиці 6.1.

За результатами дослідження встановлено, що найбільше накопичення рибофлавіну було за культивування клону №4, який мав жовто-коричневе забарвлення, кількість синтезованого вітаміну склала 14,8 г/дм³ [25].

Для визначення стабільності, культуру пересівали протягом двох місяців з інтервалом два тижні на агаризоване і в рідке середовище з подальшим визначенням кількості накопиченого рибофлавіну. Показник накопичення

рибофлавіну не змінювався від пересівів до пересівів, що говорить про стабільність отриманого штаму [25].

Таблиця.6.1

Накопичення рибофлавіну мутантними клонами

№ клону	Пігмент	Кількість рибофлавіну, г/дм ³
1	Жовто-коричневий	12,6±0,16
2	Жовто-коричневий	13,9±0,35
3	Жовто-коричневий	12,8±0,14
4	Жовто-коричневий	14,8±0,14
5	Світлий з темною серединою	12,3±0,37
6	Світлий з темною серединою	11,5±0,28
7	Світлий з темною серединою	12,1±0,21
8	Світлий з темною серединою	12,0±0,15
9	Білий напівпрозорий	7,2±0,30
10	Білий напівпрозорий	8,1±0,31
11	Білий напівпрозорий	7,8±0,24
12	Білий напівпрозорий	7,1±0,11
13	Світло-жовтий	9,8±0,12
14	Світло-жовтий	8,9±0,25
15	Світло-жовтий	9,0±0,38
16	Світло-жовтий	8,8±0,26
17 Контроль	темно-жовтий	13,9±0,21

Штам *B. subtilis* IFBG NTG2 в подальшому пропонується для використання в промисловій технології рибофлавіну, культивування в

біореакторі та створення на його основі рекомбінантного штаму для надсинтезу рибофлавіну.

Отже, проведена обробка мутагеном вихідної культури штам *B. subtilis* ІМВ В-7797 і визначено вплив хімічного мутагенезу на життєздатність клітин бактерій. Досліджено вплив мутагену NTG на штам *B. subtilis* IFBG МК-1А, підібрано тривалість обробки мутагеном (30 хв.) та його оптимальну концентрацію (50 мкг), за якої загибель клітин склала майже 99 % (98,75 %) [25].

Відібрано 4 типи клонів, які за морфологічними ознаками значно відрізнялись один від одного. Клони перевірено на здатність накопичувати рибофлавін [25].

У результаті дії хімічного мутагену (НТГ) на *B. subtilis* IFBG МК-1А отримано мутантний штам *B. subtilis* IFBG NTG2, який за морфологічними ознаками (колір, розмір, форма колоній) і накопиченням рибофлавіну відрізнявся від вихідної культури [25].

Отриманий штам-продуцент рибофлавіну *B. subtilis* IFBG NTG2 накопичував рибофлавін у кількості майже на 9 % більшій (14,8 г/дм³), ніж вихідний штам (13,9 г/дм³). Штам *B. subtilis* IFBG NTG2 в подальшому пропонується для використання в промисловій технології рибофлавіну і створення на його основі рекомбінантного штаму для надсинтезу рибофлавіну [25].

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в публікації:

Радченко М. М., Андріяш Г. С., Бейко Н. Є., Тігунова О. О., Шульга С.М. 2022. Отримання штаму-продуценту *Bacillus subtilis* із підвищеним накопиченням рибофлавіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. №31. – С. 77-82. DOI: 10.7124/FEEO.v31.1488

РОЗДІЛ 7

ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТУ В БІОРЕАКТОРІ З ПІДЖИВЛЕННЯМ

Процес культивування отриманого нового штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі ємністю 10 дм³ з підживленням складається з наступних етапів: вирощування культури продуцента на чашках Петрі (L агар) і перевірка культури на однорідність; розмноження культури у посівному середовищі; вирощування продуцента на маточних колбах в інокуляційному середовищі (рис 7.1); приготування та стерилізація поживних середовищ та розчинів; підготовка та перевірка біореактора; інокуляція ензиматичного середовища з подальшим культивуванням на ферментаційному середовищі[30].



Рис. 7.1. Вирощування продуцента в маточних колбах на LB середовищі за температури 39°C на 62 годину культивування.

7.1. Культивування штаму-продуценту *B. subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі

Для одержання інокуляційного матеріалу використовували штам *B. subtilis* IFBG МК-1А. Штам-продуцент рибофлавіну *B. subtilis* I IFBG МК-1А культивували в колбах об'ємом 1,0 дм³ на ферментаційному середовищі за температури 39°C та 240 обертів за хвилину, без підживлення. У досліді з використанням середовища з глюкозою штам продукував рибофлавін у кількості 13,8-13,9 г/дм³ [30].

Встановлено, що оптимальний час для культивування становив 66-72 год. Зі збільшенням часу культивування рівень накопичення рибофлавіну в середовищі знижувався. Зниження рівня накопичення можна пояснити тим, що зі збільшенням часу культивування відбувалося поступове руйнування рибофлавіну [28-30].

Масштабування процесу культивування рибофлавіну штамом-продуцентом *B. subtilis* IFBG МК-1А проводили в біореакторі об'ємом 10 дм³ з підживленням. Основні етапи культивування в біореакторі були такі: вирощування культури продуцента на чашках Петрі та перевірка чистоти культури, розмноження культури в посівному середовищі, приготування та стерилізація поживних середовищ і розчинів, підготовка та перевірка стерильності біореактора, інокуляція ензиматичного середовища з подальшим культивуванням [30].

Для одержання інокуляційного матеріалу штам-продуцент *B. subtilis* IFBG МК-1А висівали на агаризоване LB середовище у чашки Петрі і перевіряли чистоту культури (рис. 7.2.).



Рис. 7.2. Клітини штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А на LB агарі, збільшення 90х. На фото однорідні спори, без включень та домішків культур. Присутні кристали рибофлавіну у вигляді голок.

Колонії *B. subtilis* IFBG МК-1А були світло-жовтого кольору, неправильної форми, поверхня – гладенька, структура – дрібнозморшкувата, прозорість – матова, консинстенція – пастоподібна, клітини бактерій мали витягнуту форму з тупими закругленими кінцями, грам-позитивні, безбарвні. Діаметр бактерій у середньому становив 0,6 мкм, довжина коливалась від 3 до 8 мкм. Через 24 год. росту в мазках культури виявили прямі паличко-подібні клітини. Розташування спор у материнській клітині – центральне. Розтягування клітини не спостерігалось [26-30].

Інокулят вирощували в колбах протягом 24 год., з використанням інокуляційного середовища, за температури 38° С. Після чого проводили засів ензиматичного середовища в біореакторі. Біореактор з культуральною рідиною штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А показано на рис.у 7.3.



Рис. 7.3. Культуральна рідина штаму-продуценту *B. subtilis* IFBG МК-1А в біореакторі (на 48 годину культивування)

У процесі культивування через кожні 4 год. відбирали проби культуральної рідини для біохімічного та мікробіологічного контролю. Перевіряли на стерильність висівом зразків на чашки Петрі з LB агаром та проводили мікроскопію. Визначали накопичення рибофлавіну і вміст глюкози у культуральному середовищі. Різде збільшення концентрації розчиненого кисню в середовищі (pO_2) було сигналом до внесення підживлення. Одночасно відбувалося підвищення рН культуральної рідини. В процесі культивування подачу вуглеводного підживлення чергували з подачею аміачної води (для регуляції рН та азотного підживлення) [30].

Вуглеводне підживлення та аміачну воду подавали з таким розрахунком, щоб підтримувати значення рН на рівні 7,0-7,2 та значення NH_3 – 0,1-0,25 %.

Загальний об'єм підживлення, що додавали в процесі культивування, досягав 47 %, а загальний об'єм аміачної води, що використовувався для підтримання стабільного рівня рН, становив 8 % об'єму середовища до інокуляції. Після завершення подачі підживлення, процес продовжували ще 4 год для повної утилізації вуглеводів [30]. Під час піноутворення для зниження рівня піни в середовище вносили стерильний піногасник. Накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом залежно від тривалості культивування в біореакторі, показано на рис. 7.4.

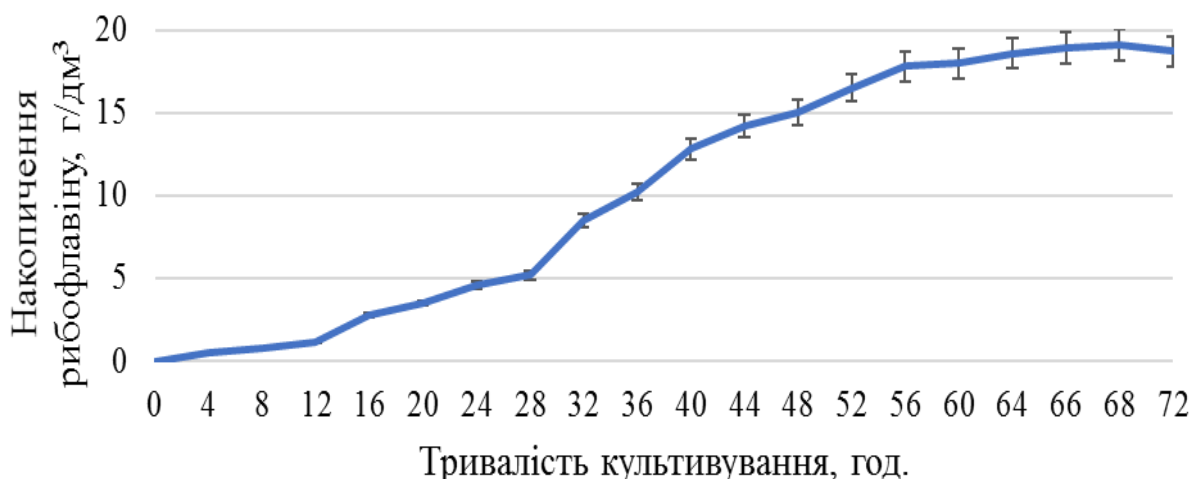


Рис. 7.4. Накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом залежно від тривалості культивування в біореакторі, * – $p < 0,05$

Встановлено, що оптимальний час культивування становив 68 год, за який штам-продуцент *B. subtilis* IFBG МК-1А накопичував 19,1 г/дм³ рибофлавіну, а конверсія глюкози становила 12 %. Об'єм культуральної рідини після культивування – 5,5 дм³ [30].

Отже, синтез рибофлавіну можна збільшити за допомогою змін умов культивування, масштабуючи культивування в колбах без додавання підживлення до культивування в біореакторі з додаванням вуглеводного

підживлення. За результатами досліджень накопичення рибофлавіну підвищилось (з 13,9 г/дм³ до 19,2 г/дм³).

Визначено особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі «Sartorius Biostat В ТWIN». За умов культивування штаму в колбах об'ємом 1 дм³ накопичення рибофлавіну на 66-ту год. становило 13,9 г/дм³ [25-30].

Масштабування процесу культивування з підживленням штаму-продуцента *B. subtilis* IFBG МК-1А проводили в біореакторі об'ємом 10 дм³. Оптимальний об'єм внесення підживлення становив 47 %, кількість аміачної води, необхідної для стабілізації рН та накопичення рибофлавіну, – 8 % об'єму середовища до інокуляції. Конверсія глюкози становила 12 %, накопичення рибофлавіну — 19,1 г/дм³ (за умов культивування в біореакторі з підживленням) [30].

За умов культивування штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з періодичним підживленням істотно збільшується накопичення рибофлавіну (на 40 %) порівняно з накопиченням рибофлавіну за умов культивування в колбах [30].

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в публікації:

Радченко М.М., Тігунова О.О., Андріяш Г.С., Шульга С.М., Блюм Я.Б. 2022. Особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *Bacillus subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з підживленням. *Доповіді Національної Академії Наук України*. С. 79-84. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.06.079>

РОЗДІЛ 8

УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Здійснено дослідження для отримання штамів-продуцентів рибофлавіну з роду *Bacillus*, вивчено біологічні особливості штамів для підвищення їх біосинтетичної здатності. Варто зазначити, що більшість існуючих штамів-продуцентів біологічно активних речовин, (таких як вітаміни, амінокислоти) з роду *Bacillus* знаходять на поверхні листків рослин, повітрі, ґрунті та мулі прісних і морських водойм [108-109]. Найбільш характерним природним місцем знаходження цих бактерій є поверхня бульб картоплі й насіння рослин. Чисельність бактерій роду *Bacillus* у літній період сягає багатьох сотень тисяч на 1 г субстрату. У роботі було відібрано 9 зразків бульб картоплі, а для виділення чистої культури мікроорганізмів використовували метод відбитків (реплік) [6]. Базуючись на даних стосовно різноманіття мікроорганізмів у ґрунтах [1], для отримання правильного розведення ґрунтової суспензії було проведено визначення кількості мікроорганізмів. В усіх зразках було виявлено різні колонії мікроорганізмів таких, як аскоміцети, дріжджі, бактерії. Визначивши кількість мікроорганізмів в зразках, підібрали потрібне розведення для виділення культури бактерій роду *Bacillus* [22]. Через те, що різні види бацил мають різні потреби для росту [34, 46-48, 54, 82, 109], було відібрано декілька середовищ для подальших досліджень. Для накопичення культур бактерій використовували комплексне середовище [35, 40, 66, 99] з сахарозою як джерелом вуглецю. Другим для виділення було обрано середовище [36, 54, 68, 96] з глюкозою як джерелом вуглецю. Такий вибір було зроблено тому, що більшість бацил (за даними літератури) вирощували саме на такому середовищі [30, 31, 70, 85].

Отримані дані показали, що на всіх середовищах після внесення зразків за культивування за температури 38 ± 1 °C розвивались бактерії роду *Bacillus*. Ріст бацил відзначався помутнінням середовища, що свідчило про накопичення бактеріальної біомаси; наявності тонкої прозорої плівки на

поживному середовищі та зміни забарвлення самого середовища – виділення супутнього продукту розвитку бактерій. Інтенсивність цих трьох параметрів змінювалась відносно відібраних зразків та середовищ на які вони були внесені. Результати дослідження відображають різноманітність бацил у ґрунтах, листках, насінні та бульб картоплі, що підтверджують літературні дані щодо потреб бактерій роду *Bacillus* [30, 47, 108-109].

Для підтвердження наявності бацил у рідких середовищах використовували цитологічне дослідження зразків за допомогою світлової мікроскопії [1]. Проведене цитологічне дослідження показало, що в усіх досліджених пробах були наявні одна або більше бактеріальних культур, що мали форму паличок, які були добре рухливі. В багатьох зразках було виявлено суміш культур, яку надалі розділяли методом граничних розведень [6].

Виходячи з огляду літератури про культивування бацил [36, 47-49, 68, 70], було використано агаризоване LB середовище, з урахуванням всіх потреб для бактеріального росту. Загальну кількість мікроорганізмів у зразках визначали за методом Виноградського у модифікації Шульгіної [1], кількість повторень кожного з зразків – 12 [124-126].

Методом граничних розведень [1] провели розсіювання та виділили чисту культуру бактерій роду *Bacillus*. Відібрані культури пересівали для подальшого дослідження. Підтвердження належності та чистоти колонії проводили загальноприйнятими методами [6].

Попередню ідентифікацію штамів проводили за загальноприйнятими методиками з використанням «Визначника бактерій Бердже» [130] та класифікували відібрані культури, як приналежні до виду *B. subtilis*. Кількість синтезованого рибофлавіну виділеними штамми визначали флуориметричним методом. Накопичення рибофлавіну складало від 1,0 до 4,3 г/дм³ в залежності від вибраного штаму. Для подальших досліджень відібрано штам-продуцент *B. subtilis*, який накопичував 4,3 г/дм³ рибофлавіну [25-30].

Для морфологічного аналізу існує ще декілька додаткових параметрів для ідентифікації [65-66, 105]. Одним із найбільш точних методів ідентифікації видової належності штамів вважається порівняння послідовностей генів 16S рРНК [40, 82]. Для встановлення родинних зв'язків здійснено філогенетичний аналіз і побудовано філогенетичне дерево. За допомогою молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК підтверджено, що виділений штам належить до виду *B. subtilis* [124].

Слід відмітити, що ідентифікація культур нових штамів-продуцентів – це перший крок на шляху подальшої розробки біотехнології рибофлавіну [85, 99]. Для створення промислового виробництва рибофлавіну необхідні високопродуктивні штами, які б використовували доступну та дешеву сировину-субстрат [30, 76]. Особливо гостро стоїть питання з чистоти мікробіологічного процесу, а саме інфікування його сторонньою мікрофлорою [51, 94-95]. Одним із методів подолання даної проблеми є використання в промисловості штамів, які не чутливі до певних антибіотиків [85]. Нами було визначено та порівнянно з даними літературних джерел, що штам-продуцент рибофлавіну *B. subtilis* був чутливий до антибіотиків: ампіцилін, амінокглікозид, цефалоспориноаміноглікозид [82], мало чутливий до антибіотиків, стрептоміцину, тетрацикліну та проявляв стійкість до антибіотиків поліміксину, еритроміцину та хлорамфеніколу [85]. Отримані дані дозволяють культивувати штам-продуцент рибофлавіну *B. subtilis* з використанням антибіотиків поліміксину, еритроміцину та хлорамфеніколу для уникнення інфікування культури в подальшій роботі [82-85].

Для створення конкурентноспроможної технології, окрім властивостей штаму-продуцента, ключову роль в собівартості продукту відіграє субстрат [30-31]. Якщо субстрат багатокomпонентний, то першочергово необхідно визначити концентрацію окремих компонентів [34-35, 68, 85], що необхідні для підтримки життєдіяльності мікроорганізмів та синтезу важливих сполук, в тому числі і рибофлавіну [57-58]. Необхідні вуглецевмісні сполуки, що використовує клітина як основне джерело енергії. Тому, було досліджено

залежність накопичення рибофлавіну і приросту біомаси від вибору джерела вуглецю (глюкози, фруктози і сахарози) при культивуванні *B. subtilis* ІМВ В-7797. При вирощуванні культури на середовищі з різними вуглеводами було встановлено, що найкращим джерелом енергії для синтезу рибофлавіну є середовище з глюкозою (накопичення біомаси 14,6 г/дм³, рибофлавіну – 5,2 г/дм³), проте найбільший приріст біомаси виявлено на середовищі з сахарозою (накопичення біомаси – 15,8 г/дм³, рибофлавіну 4,9 – г/дм³); на середовищі з фруктозою накопичення біомаси становило 12,8 г/дм³, а накопичення рибофлавіну – 4,8 г/дм³ [22, 25-30, 125, 147].

Не лише джерело вуглецю, але і його концентрація впливала на накопичення біомаси та вітаміну В₂ [57-58]. При підвищенні концентрації глюкози в ензиматичному середовищі з 30 до 120 г/дм³ накопичення біомаси і рибофлавіну зростало пропорційно. Внесення глюкози в культуральну рідину в концентрації, що більша за 120 г/дм³, практично не вело до підвищення накопичення рибофлавіну і пригнічувало ріст біомаси. При концентрації глюкози 150 г/дм³ ріст біомаси був знижений на 8 % в порівнянні з ензиматичним середовищем, де концентрація глюкози складала 120 г/дм³. Виходячи з вищевикладеного, підібрано оптимальну концентрацію вуглецевмісного субстрату глюкози, що підвищувало накопичення у культуральній рідині біомаси і рибофлавіну [99, 105]. Отримані дані корелюють з літературними [46, 65-66, 109].

Однак, не тільки джерело вуглецю відіграє ключову роль у культивуванні мікроорганізмів [28-29]. Відомо, що оптимізація параметрів, таких як температура, рН і тривалість культивування може збільшити накопичення цільового продукту в кілька разів [13-24]. Дослідження показали, що накопичення рибофлавіну в ензиматичному середовищі залежить від параметрів умов культивування [13-24]. Проведено культивування штаму *B. subtilis* ІМВ В-7797 за використання різної концентрації посівного матеріалу, який вносили до ензиматичного середовища. Було виявлено суттєвий вплив концентрації внесеного посівного матеріалу штаму *B. subtilis*

ІМВ В-7797 у ензиматичне середовище на накопичення рибофлавіну. Визначено, що найменше накопичення рибофлавіну було за внесення 1 % посівного матеріалу штамом *B. subtilis* ІМВ В-7797 в ензиматичне середовищі. Зі збільшенням внесеного відсотку посівного матеріалу (2 %) кількість накопиченого рибофлавіну збільшувалась. Найбільше накопичення спостерігалось за додавання 10 % посівного до ензиматичного середовища. При подальшому збільшенні відсотку посівного матеріалу до 20 % накопичення рибофлавіну спадало, що співпадає з даними літературних джерел [25-30,100, 124-126].

Було проведено оптимізацію основних параметрів культивування нових штамів-продуцентів. Отримані оптимальні технологічні параметри дозволили підвищити накопичення рибофлавіну штамом *B. subtilis* ІМВ В-7797 [114, 127]. Для дослідження продуктивності нових штамів-продуцентів було проведено порівняння накопичення рибофлавіну з існуючими штамми [85, 96, 126-128]. Отримані дані свідчать, що досліджувані штами-продуценти, в порівнянні з існуючими, можуть накопичувати рибофлавін на різних субстратах [110, 129]. Отже, нові штами можуть бути основою для подальших досліджень з метою розроблення комерційної біотехнології рибофлавіну.

Серед отриманих мутантів відібрано найкращий для подальших досліджень з підвищення накопичення рибофлавіну. Для підтвердження стабільності отриманої мутації проведено дослідження з накопичення рибофлавіну мутантним штамом протягом року зберігання. Незмінна концентрація рибофлавіну в культуральній рідині протягом 10 пересівів свідчила про стабільність мутантного штаму [32].

Одним із перспективних підходів для підвищення накопичення цільового продукту *B. subtilis* є УФ-опромінення [79]. У результаті дії УФ-опромінення на спори *B. subtilis* ІМВ В-7797 було отримано мутантний штам, який за морфологічними ознаками і біосинтетичною активністю відрізнявся від вихідної культури. Методом індукованого мутагенезу з використанням УФ-опромінення і послідовним ступінчатим відбором, одержано мутантний

клон *B. subtilis* IFBG МК-1А, який продукував рибофлавін майже на 50 % більше в порівнянні з вихідним штамом (з підвищеною у 1,5 рази продукцією рибофлавіну у порівнянні з вихідним штамом), що можна порівняти з результатами накопичення рибофлавіну, наведеними в роботах [76, 95] з використанням рекомбінантних штамів-надпродуцентів.

Одним із методів для підвищення продуктивності штамів є хімічний мутагенез [82, 99]. Було проведено відбір штаму для мутагенезу базуючись на [128]. Отримані за допомогою мутагенезу за використання N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину штами мали різне накопичення рибофлавіну, а деяки втратили здатність продукування цільового продукту. Отримані дані корелюють з результатами, які отримані в роботах [82, 96], хоча існують роботи, в яких мутаген не діяв на досліджувальні культури [105].

Як правило, дикий тип *B. subtilis* не може надмірно синтезувати та накопичувати рибофлавін [31]. Він вимагає модифікації, щоб стати надпродуцентом рибофлавіну і оптимізації умов культивування [35, 49-51, 76, 109]. З літературних джерел відомо, що синтез рибофлавіну можна збільшити за допомогою змін умов культивування при порівнянні культивування в колбах без додавання підживлення та культивування в біореакторі з додаванням вуглецевмісної підживлення [47-48].

Оптимізація технологічних параметрів з урахуванням потреб культур, дала змогу підвищити накопичення цільового продукту більше ніж в два рази для вихідного штаму, на 32 % для мутантного штаму та на 47 % при культивуванні в біореакторі. Отримані результати узгоджуються з літературними даними [101-104].

В даній роботі було отримано нові штами-продуценти рибофлавіну роду *Bacillus*, вивчено їх характеристики та біологічні особливості, запропоновано методи накопичення рибофлавіну та показано ефективність культивування в біореакторі з додаванням підживлення.

ВИСНОВКИ

В результаті проведеної роботи отримано нові штами-продуценти рибофлавіну роду *Bacillus*, вивчено їх характеристики та біологічні особливості, запропоновано методи накопичення рибофлавіну, показано ефективність культивування в біореакторі з додаванням вуглецевого підживлення.

1. Виділено 10 клонів зі здатністю до накопичення рибофлавіну з різним забарвленням колоній, що належали до роду *Bacillus*. Показано, що клони з жовто-коричневим забарвленням накопичували менше рибофлавіну, ніж клони з світло-жовтим забарвленням колоній. Клон з найбільшим накопиченням рибофлавіну відібрано для встановлення культурально-морфологічних особливостей.

2. Показано, що за культурально-морфологічними ознаками виділений штам-продуцент рибофлавіну (IFBG МК-2) за «Визначником бактерій Бердже» належить до виду *B. subtilis*.

3. Встановлено за допомогою філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК штаму IFBG МК-2, що виділений штам належить до виду *B. subtilis*. Порівняння отриманого сумарного фрагменту гена 16S рРНК із наявними у базі даних GenBank за допомогою алгоритму blastn показало, що отримана для IFBG МК-2 нуклеотидна послідовність на 99 % ідентична із послідовністю гена 16S рРНК *B. subtilis* IAM 12118. Отримані послідовності задепоновано в базі даних GenBank під номерами ... і

4. Показано, що активне накопичення рибофлавіну відбувалось на 48 годину культивування штаму IFBG МК-2 (*B. subtilis* IMB В-7797) і досягало максимуму на 72 год. культивування на середовищах різного складу, де джерелом вуглецю була глюкоза. Накопичення рибофлавіну становило 4,3 г/дм³. Підібрано оптимальні умови культивування, за яких накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом *B. subtilis* IMB В-7797 складало 8,9 г/дм³ (термін культивування інокуляту – 16 год., кількість внесеного інокуляту до

ензиматичного середовища – 10 %, концентрація глюкози в ензиматичному середовищі – 120 г/дм³, температура культивування – 38 °С, рН середовища – 7,0 та термін культивування – 72 год.

5. Одержано за допомогою індукованого мутагенезу з використанням ультрафіолетового опромінення і послідовним ступінчастим відбором мутантний штам *B. subtilis* IFBG МК-1А, який продукував рибофлавін майже на 32 % більше (13,9 г/дм³) в порівнянні з вихідним штамом (8,9 г/дм³). За допомогою хімічного мутагенезу (N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідін) штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А отримано мутантний штам *B. subtilis* IFBG NTG2, який за морфологічними ознаками (колір, розмір, форма колоній) і накопиченням рибофлавіну відрізнявся від вихідної культури. Штам *B. subtilis* IFBG NTG2 накопичував рибофлавін майже на 9 % більше (14,8 д г/дм³), ніж вихідний штам *B. subtilis* IFBG МК-1А (13,9 г/дм³).

6. Показано, що культивування штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А в біореакторі з періодичним підживленням привело до збільшення накопичення рибофлавіну (19,1 г/дм³) у порівнянні з накопиченням рибофлавіну в колбах (13,9 г/дм³), при цьому конверсія глюкози склала 12 %. Оптимізовано умови культивування: оптимальний об'єм внесеного підживлення склав 47 %, кількість аміачної води, необхідної для стабілізації рН та накопичення рибофлавіну – 8 % від об'єму середовища до інокуляції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Андріяш, Г. С., Бейко, Н. Е. та Шульга, С. М. 2017. Філогенетичний аналіз штамів-продуцентів лізину, треоніну та бутанолу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 21, С. 288-292.
2. Антипчук, А., Піляшенко-Новохатний, А. та Євдокименко, Т. 2011. *Практикум з мікробіології. Університет «Україна»*. Київ. С. 186
3. Бейко, Н. Є. та Прийомов, С. І. 2015. Скринінг штамів мікроорганізмів за продуктивністю та ефективністю процесів біоконверсії лігноцелюлозної сировини *Електроний журнал «Наукові доповіді НУБіП України» № 57 (Грудень)*. http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/index.html
4. Верховна Рада України, 2017. Норми фізіологічних потреб населення України в основних харчових речовинах і енергії: Додаток до наказу Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України від 03.09.2017 № 1073. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1206-17>
5. Григоренко, О.М. 2010. Роль вітамінів у харчуванні людини. *Харчова наука і технологія*. 3 (12), С. 33-36.
6. Демченко, Я. І. та Бородай, В. В. 2021. Інтенсифікація накопичення рибофлавіну на основі штаму *Vacillus subtilis* за селекції. *Матеріали ІХ Всеукраїнської онлайн науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія звершення та надії»*. С.42-43
7. Лиса, Я. П. та Беспалова, О. Я. 2013. Дослідження впливу температури як параметра процесу ліофілізації. *Вісник КрНУ імені Михайла Остроградського*. Випуск 5 (82), С. 184-189.
8. Радченко, М., Бейко, Н. та Андріяш, Г. 2019. Виділення та ідентифікація штаму-продуценту рибофлавіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів* №24, С.154-159. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1094>
9. Метейко, Д. О., Радченко, М. М., Тігунова, О. О. та Шульга С. М., 2019. Штами-надпродуценти рибофлавіну. *БІОТЕХНОЛОГІЯ ХХІ СТОЛІТТЯ*. С. 52.

10. Метейко, Д., Радченко, М., Тігунова, О. та Андріяш, Г. 2021. Визначення вмісту рибофлавіну в розчинах флуориметричним методом. *Proceedings of the 3rd International scientific and practical conference. Kharkiv, Ukraine*. P. 83-85
11. Павлишин, А. В., Беденюк, А. Д. та Сверстюк, А. С. 2006. Аерогелева пов'язка на основі аморфного діоксиду кремнію з газовим резистивним сенсором SNO₂ та можливістю введення вітаміну В₂. *Патент на корисну модель*.
12. Павлоцька, Л.Ф. Дуденко, Н.В. та Димитрієвич, Л.Р. 2007. Основи фізіології, гігієни харчування та проблеми безпеки харчових продуктів: навчальний посібник. ВТД «Університетська книга». С. 441
13. Пирог, Т.П. 2009. Загальна біотехнологія. Підручник С. 336
14. Поліщук, В. Ю. та Дуган, О. М. 2014. Вплив рН середовища культивування на накопичення біомаси та рибофлавіну штамом *Ermothecium ashbyi*. *Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції*. Київ. С. 60-61.
15. Поліщук, В. Ю. та Дуган, О. М. 2016. Вплив умов культивування на біосинтетичну здатність *Ermothecium ashbyi Guillierm.* *Технологічний аудит та резерви виробництва*. №2/4(28). С. 35–41.
16. Поліщук, В. Ю. та Дуган, О. М. 2016. Вплив ультрафіолетового опромінення на біосинтетичну здатність гриба *Ermothecium ashbyi*. *Біотехнологія XXI століття: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга*. С. 72.
17. Поліщук, В. Ю. та Дуган, О. М. 2017. Використання глюкозо-фруктозних сиропів для культивування продуценту рибофлавіну *Ermothecium ashbyi Guillierm.* *V Наукова конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній науці»*. Збірка наукових праць. С. 60.
18. Поліщук, В. Ю. та Дуган, О. М. 2017. Вплив умов отримання посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну

Eremothecium ashbyi. *Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences*. V. 14(132). P. 82–84.

19. Поліщук, В. Ю. та Дуган, О. М. 2017. Рибофлавін – виробництво і застосування. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія*. 134, С. 274–290.

20. Поліщук, В. Ю., Маланюк, М. І., Карпенко, О. Я. та Дуган, О. М. 2012. Вплив температури на життєдіяльність міцелію *Eremothecium ashbyi* Guill. *Вісник національного університету «Львівська політехніка»*. №726. С. 158–163.

21. Поліщук, В. Ю., Маланюк, М. І. та Дуган, О. М. 2011. Морфолого-культуральні і біосинтетичні властивості *Eremothecium ashbyi* Guill. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 3. С. 74–78.

22. Поліщук, В. Ю. 2018. Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill. *Дис. канд. біол. наук.*, Київ. <https://ela.kpi.ua/handle/123456789/23301>

23. Поліщук, В. Ю., Маланюк, М. І. та Дуган, О. М. 2014. Динаміка росту та накопичення рибофлавіну аскоміцетом *Eremothecium ashbyi* Guillier. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 3. С. 73–77.

24. Тігунова, О. О. та Прийомов, С. І. 2015. Філогенетичний аналіз штаму-продуценту бутанолу порівнянням послідовностей гена 16 S рРНК. *Електроний журнал «Наукові доповіді НУБіП України»* 57 http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/index.html.

25. Радченко, М. М., Андріяш, Г. С., Бейко, Н. Є., Тігунова, О. О. та Шульга, С.М. 2022. Отримання штаму-продуценту *Vacillus subtilis* із підвищеним накопиченням рибофлавіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 31. С. 77-82. DOI: 10.7124/FEEO.v31.1488.

26. Радченко, М. М., Бейко, Н. Є., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С. 2020. Виділення штаму-родуценту рибофлавіну з природних джерел. *Матеріали конференції БІОТЕХНОЛОГІЯ XXI СТОЛІТТЯ*. С. 156.

27. Радченко, М. М., Бейко, Н. Є., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С. 2020. Вплив джерела вуглецю на синтез біомаси та накопичення рибофлавіну штамом *Bacillus subtilis*. *Матеріали конференції БІОТЕХНОЛОГІЯ XXI СТОЛІТТЯ*. С. 157.

28. Радченко, М. М., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С. 2021. Вдосконалення штаму-продуценту рибофлавіну *Bacillus Subtilis* хімічним мутагенезом. *Матеріали конференції БІОТЕХНОЛОГІЯ XXI СТОЛІТТЯ*. С. 81.

29. Радченко, М., Тігунова, О., Андріяш, Г. та Бейко, Н. 2018. Накопичення рибофлавіну штамом *Bacillus subtilis* за використання різної концентрації посівного матеріалу. *Матеріали конференції БІОТЕХНОЛОГІЯ: ДОСВІД, ТРАДИЦІЇ*. С. 82.

30. Радченко, М.М., Тігунова, О.О., Андріяш, Г.С., Шульга, С.М. та Блюм, Я.Б. 2022. Особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *Bacillus subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з підживленням. *Доповіді Національної Академії Наук України*. 6. С. 79-84. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.06.079>

31. Тігунова, О.О. 2016. Отримання штамів-продуцентів роду *Clostridium* з підвищеним рівнем синтезу бутанолу. *Дис. канд. біол. наук., Київ*.

32. Федоров, А.О., Шкабара, Т.Л. та Федорова, В.О. 2013. Споживча характеристика мікрокомпонентів харчових продуктів. *Вісник Чернівецького торговельно-економічного інституту*. 2. С.367-374.

33. [Хоменко, А. И.](#) [Ткаченко, А. Ф.](#) [Бейко, Н. Е.](#) [Андріяш, А. С.](#) та [Заболотная, Г. М.](#) 2014. Скрининг культур грибів, дрожжей и бактерий для биоконверсии лигноцеллюлозного сырья в моносахара. *Actual problems of bioecology: Proceedings of the International Scientific Conference*. Р. 123-124.

34. Шульга, С. М. та Тігунова, О.О. 2013. Нові штами-продуценти біобутанолу. Виділення та ідентифікація. *Biotechnologia Acta*. 6(1). Р. 97-104.

35. Шульга, С.М., Ткаченко, А.Ф., Бейко, Н.Є., Андріяш, Г.С. та Прийомов, С.Г. 2011. Інтенсифікація біосинтезу треоніну штамом *Brevibacterium flavum* ТН-7«Біотехнологія». 4 (5). С. 97 -102.
36. Abbas, C.A. and Sibirny, A.A. 2011. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(2). P.321-360.
37. Abdullayeva, G. 2020. <https://informa.az/article/2498-kasid-works-sheikh-galib>. Azerbaijan Journal of Educational Studies 2(2), 101–107. [https://doi:10.29228/edu.294](https://doi.org/10.29228/edu.294)
38. Al-Hassan, S.S., Kulick, R.J., Livingstone, D.B., Suckling, C.J., Wood, H.C.S., Wrigglesworth, R. and Ferone, R., 1980. Riboflavin Biosynthetic Enzymes. *Journal of the Chemical Society* 1. P.2645–2656.
39. Aljaadi, A.M., Devlin, A.M. and Green, T.J. 2022. Riboflavin intake and status and relationship to anemia. *Nutr. Rev.* P. 43. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuac043>.
40. Bacher, A. and Lingens, F., 1970. Biosynthesis of Vitamin B2: Diastereomeric reaction intermediates of archaeal and non-archaeal riboflavin synthases. *Journal of Biological Chemistry* 245(18). P.4647-4652.
41. Bacher, A. and Mailander, B., 1978. Biosynthesis of riboflavin in *Bacillus subtilis*: function and genetic control of the riboflavin synthase complex. *Journal of Bacteriology*, 134(2). P.476-482.
42. Bacher, A., Baur, R., Eggers, U., Harders, H.D., Otto, M.K. and Schnepfle, H., 1980. Presteady State Kinetic Analysis of Riboflavin Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2). P.632-637.
43. Bacher, A., Eberhardt, S. and Richter, G. 1996. Biosynthesis of Riboflavin, in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington: SM Press.
44. Bacher, A., Eisenreich, W., Kis, K., Ladenstein, R., Richter, G., Scheuring, J. and Weinkauff, S. 1993. Biosynthesis of flavins, in Bioorganic Chemistry Frontiers. Berlin: Springer.

45. Bar Au-Pied Noir, E., De Keersmaecker, S.C.J., Wuyts, V., Gau, C., Pirovano, W., Costessi, A., Philipp, P. and Roosens, N., 2015. Genome sequence of unauthorized genetically modified *Bacillus subtilis* strain. *Genome Announcements*, 3(2). doi: 10.1128/genomeA.00214-15
46. Bartmann, L., Schumacher, D., Von Stillfried, S., Sternkopf, M., Alampour-Rajabi, S., Van Zandvoort, M. A., & Wu, Z. 2019. Evaluation of riboflavin transporters as targets for drug delivery and theranostics. *Frontiers in pharmacology*, 10 (79). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00079>
47. Beiko, N.E., Andriash, H. S., Melnik, I. V. and Shulga, S. M. 2017. Biobutanol accumulation using alternative substrates by cultivation of *Clostridium acetobutylicum* strains *Biotechnol.Acta*, 10 (5). P. 48-56.
48. Beiko, N.E., Andriash, A. S., Priyomov, S. G. and Shulga, S.M. 2016. Lyophilization effect on productivity of butanol-producing strain. *Biotechnol. Acta*. 9 (5). P. 67-75
49. Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, G.M., 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Archaea and the Deeply Branching, and Phototrophic Bacteria. 2nd ed. Springer.
50. Bosch, A.M. 2020. Riboflavin. Principles of nutrigenetics and nutrigenomics. London: *Elsevier*, P. 283—286. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804572-5.00037-9>.
51. Boyko, M. V., Patyka, N. V., Shulga, S. M. and Andriash, H. S. 2018. Mathematical modelling of optimization nutrient medium composition for entomopathogenic bacteria strain *Bacillus thuringiensis* 873 cultivation *Biotechnol. Acta*, 11 (2). P. 40-46
52. Braden, B.C., Velikovskiy, C.A., Cauerhff, A.A., Polikarpov I. and Goldbaum, F.A. 2000. Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*. *Journal of Molecular Biology*, 297(5). P.1031-1036.
53. Bretzel, W., Schurter, W., Ludwig, B., Kupfer, E., Doswald., S., Pfister, M. and van Loon, A., 1999. Commercial riboflavin production by recombinant

Bacillus subtilis: down-stream processing and comparison of the composition of riboflavin produced by fermentation or chemical synthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(1). P.19-26.

54. Buey, R.M., Ledesma-Amaro, R., Balsera, M., de Pereda, J.M. and Revuelta, J.L., 2015. Increased riboflavin production by manipulation of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in *Eremothecium gossypii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22). P.9577-9589. DOI: 10.3389/fbioe.2020.570828

55. Capozzi, V, Menga, V, Digesu, A.M., De Vita, P., van Sinderen, D., Cattivelli, L., Fares, C. and Spano, G., 2011. Biotechnological production of vitamin B2-enriched bread and pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), pp.8013-8020. DOI: 10.1021/jf201519h

56. Cashmore, A.R., 2003. Cryptochromes: Enabling Plants and Animals to Determine *Circadian Time*. *Cell*, 114(5), pp.537-543. DOI:10.1016/j.cell.2003.08.004.

57. Chen, J., Sambaiah, T., Illarionov, B., Fischer, M., Bacher, A. and Cushman, M., 2004. Biosynthesis of Flavocoenzymes. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(21), pp.6996-7003. <https://doi.org/10.1021/ja028226k>.

58. Coimbra, C.G. and Junqueira, V.B., 2003. High doses of riboflavin and the elimination of dietary red meat promote the recovery of some motor functions in Parkinson's disease patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, pp.1409-1417. DOI: 10.3389/fnagi.2014.00036.

59. Coimbra, T., Ghorri, N. and Haldar, K., 2000. In vitro activity of riboflavin against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, pp.88-96.

60. Coquard, D., Huecas, M., Ott, M., van Dijl, J.M., van Loon, A.P. and Hohmann, H.P., 1997. Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* for Riboflavin Production: A Review. *Molecular Genetics and Genomics*, 254(1), pp.81-84. DOI: 10.3390/microorganisms11010164.

61. Cushman, M., Mavandadi, F., Kugelbrey, K. and Bacher, A., 1998. Synthesis of 2,6-dioxo- (1H,3H) -9-N-ribityl-purine and 2,6-dioxo- (1H,3H) -8-aza-

9-N-ribityl-purine as inhibitors of lumazine synthase and riboflavin synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6(4). pp.409-415. DOI: 10.1107 / S0907444910029690.

62. Cushman, M., Mavandadi, F., Kugelbrey, K. and Bacher, A.J. 2001. Design, synthesis, and evaluation of 9-D-ribityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purinetriene, a potent inhibitor of riboflavin synthase and lumazine synthase. *The Journal of Organic Chemistry*, 66(25). pp.8944-8947. DOI: 10.1021/jo010706r.

63. Cushman, M., Mavandadi, F., Yang, D., Kugelbrey, K., Kis, K. and Bacher, A. 2007. A new series of 3-alkyl phosphate derivatives of 4,5,6,7-tetrahydro-1-D-ribityl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidinedione as inhibitors of lumazine synthase: design, synthesis, and evaluation. *Journal of Organic Chemistry*, №72(19). pp.4635-4642. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1228763.

64. Cushman, M., Sambaiah, T., Jin, G., Illarionov, B., Fischer, M. and Bacher, A. 2005. Design, synthesis, and biochemical evaluation of 1,5,6,7-tetrahydro-6,7-dioxo-9-D-ribitylaminolumazines bearing alkyl phosphate substituents as inhibitors of lumazine synthase and riboflavin synthase 2005. *Journal of Organic Chemistry*, 69(3). pp.601-612. DOI: 10.1021/jo051332v.

65. Darguzyte, M., Drude, N., Lammers, T., & Kiessling, F. 2020. Riboflavin-targeted drug delivery. *Cancers*, 12(2), pp. 295. <https://doi.org/10.3390/cancers12020295>

66. Dmytruk, K., Lyzak, O., Yatsyshyn, V., Kluz, M., Sibirny, V., Puchalski, C. and Sibirny, A., 2014. Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production. *Journal of Biotechnology*, 172, pp.11-17.

67. DSM. 2006. Fermentative preparation of riboflavin involving recycling of lysed biomass as nutrient medium. Pat. EP.

68. Duan, Y.X., Chen, T., Chen, X. and Zhao, X.M., 2010. Overexpression of glucose 6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6). pp.1907-1914. DOI: 10.1186/s12934-020-01302-7

69. Eggersdorfer, M., Laudert, D., Létinois, U., McClymont, T., Medlock, J., Netscher, T. and Bonrath, W., 2012. One hundred years of vitamins-a success story of the natural sciences. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(52). pp.12960-12990. DOI: 10.1002/anie.201205886

70. Emery, M. A., Reed, D., & McCracken, B. 2023. Novel use of riboflavin as a fluorescent tracer in the dissemination of aerosol and splatter in an open operatory dental clinic. *Clinical and experimental dental research*, 9(3), 500–508. <https://doi.org/10.1002/cre2.727>

71. Fath, Karami, Naderi, Malihe, Hamzavi, Hosna, Ganji, Mahmoud, Shabani, Shima, Noorabad, Faezeh, Khalesi, Bahman, Pourzardosht, Navid, Sadat Hashemi, Zahra and Khalili, Saeed. 2022. Molecular mechanisms and therapeutic effects of different vitamins and minerals in COVID-19 patients <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127044>.

72. [Ferrari](#), Alessandro, [Cassaniti](#), Irene, [Sammartino](#), José Camilla, [Baldanti](#), Fausto and [Percivalle](#), Elena. SARS-CoV-2 variants inactivation of plasma units using a riboflavin and ultraviolet light-based photochemical treatment [www.trasci.com/article/S1473-0502\(22\)00058-1/fulltext](http://www.trasci.com/article/S1473-0502(22)00058-1/fulltext).

73. Fischer, M. and Bacher, A., 2005. Biosynthesis of flavocoenzymes. *Natural Product Reports*, 22(3), pp.324-350. DOI: 10.1039/b210142b

74. Fischer, M. and Bacher, A., 2006. Fischer M. Biosynthesis of vitamin B2 in plants. *Physiologia Plantarum*, 126, pp.267–278. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00607.x>

75. Food and Nutrition Board Riboflavin. Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, folate and choline, 1998. Washington: The National Academies Press.

76. Förster, C., Santos, M.A., Ruffert, S., Krämer, R. and Revuelta, J.L., 1999. Physiological consequence of disruption of the VMA1 gene in the riboflavin overproducer *Eremothecium gossypii*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14). pp.9442-9448.

77. Gerhardt, S., Haase, I., Steinbacher, S., Kaiser, J.T., Cushman, M., Bacher, A., Huber, R. and Fischer, M., 2002. Lumazine Synthase from *Candida albicans* as an Anti-fungal Target Enzyme: STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL BASIS FOR DRUG DESIGN. *Journal of Molecular Biology*, 318(5). pp.1317-1329. DOI: 10.1074/jbc.M701724200

78. Harale, B., Kidwai, S., Ojha, D., Singh, M., Chouhan, D. K., Singh, R., Khedkar, V., & Rode, A. B. 2021. Synthesis and evaluation of antimycobacterial activity of riboflavin derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 48, pp. 128-236. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128236>

79. Heefner, D.L., Weaver, C.A., Yarus, M.J., Burdzinski, L.A., Gyure, D.C. and Foster, E.W., 1988. Biosynthesis of flavocoenzymes. *PCT Int. Appl.*, pp.54.

80. Hemberger, S., Pedrolli, D.B., Stolz, J., Vogl, C., Lehmann, M. and Mack, M., 2011. RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. *BMC Biotechnology*, 2(11), pp.119. DOI: [10.1186/1472-6750-11-119](https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-119)

81. Henry, C.S., Zinner, J.F., Cohoon, M.P. and Stevens, R.L., 2009. iBsu1103: a new genome-scale metabolic model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations. *Genome Biology*, 10(6), p.69. DOI: [10.1186/gb-2009-10-6-r69](https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r69)

82. Higashitsuji, Y., Angerer, A., Berghaus, S., Hobl, B. and Mack, M., 2007. RibR, a possible regulator of the *Bacillus subtilis* riboflavin biosynthetic operon, in vivo interacts with the 5'-untranslated leader of *rib* mRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 274(1), pp. 48-54. DOI: [10.1111/j.1574-6968.2007.00817.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00817.x)
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.863690>

83. Hughes, M., 2017. Ward. *Molecular Aspects of Medicine*, 53, pp.2-9. DOI: [10.1016/j.mam.2016.10.002](https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.10.002)

84. Insińska-Rak, M., Sikorski, M., & Wolnicka-Glubisz, A. 2023. Riboflavin and Its Derivates as Potential Photosensitizers in the Photodynamic. *Treatment of Skin Cancers. Cells*, 12(18), 2304. <https://doi.org/10.3390/cells12182304>

85. Institute of Medicine, 1998. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press.
86. Jeong, B.-Y., Wittmann, C., Kato, T. and Park, E.Y., 2015. Comparative metabolic flux analysis of an *Ashbya gossypii* wild type strain and a high riboflavin-producing mutant strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(1). pp.101-106. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.014>
87. Jiménez, A., Santos, M. A., Pompejus, M. and Revuelta, J.L., 2005. Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), pp.5743-5751. doi: 10.1128/AEM.71.10.5743-5751.2005
88. Kalingan, A.E. and Liao, Ch.-M., 2002. Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Eremothecium ashbyi* NRRL 1363. *Bioresource Technology*, 82, pp. 219-224. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00194-8
89. Kato, T. and Park, E. Y., 2012. Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Biotechnology Letters*, 34(4), pp.611-618. DOI: 10.1007/s10529-011-0833-z
90. Knorr, B., Schlieker, H., Hohmann., H.-P. and Weuster-Botz, D., 2007. Scaledown and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 33(3), pp.263-274. DOI: [10.1016/j.bej.2006.10.023](https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.023)
91. Kumar, S. R., Tyagi, F. and Hasija, Y. 2023. In-Silico medication of vitiligo by targeting 6AAH protein and riboflavin Ligand. *2nd International Conference on Smart Technologies and Systems for Next Generation Computing, Villupuram, India 2*. pp. 1-4, <https://doi.org/10.1109/ICSTSN57873.2023.10151565>
92. Ledesma-Amaro, R., Kerkhoven, E.J., Luis Revuelta, J. and Nielsen, J., 2014. Genome scale metabolic modeling of the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(6), pp.1191-1199. DOI: 10.1111/1751-7915.12379

93. Ledesma-Amaro, R., Serrano-Amatriain, C., Jimenez, A. and Revuelta, J.L., 2015. Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbya gossypii* through pathway optimization. *Microbial Cell Factories*, 14(1), pp.163. DOI: 10.1186/s12934-015-0354-x
94. Lee, K., Park, Y., Han, J., Park, J. and Choi H., 2004. Microorganism for producing riboflavin and method for producing riboflavin using the same. US. Pat.
95. Liu, S., Hu, W., Wang, Z. ta Chen, T. 2020. Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. *Microbial Cell Factories*. 19(1). Doi: 10.1186/s12934-020-01302-7
96. Lin, Z.Q., Xu, Z.B., Li, Y.F., Wang, Z.W., Chen, T. and Zhao, X.M., 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of riboflavin. *Microbial Cell Factories*, 13, pp.104. DOI: 10.1186/s12934-014-0104-5
97. Lozano-Martinez, P., Buey, R.M., Ledesma-Amaro, R., Jimenez, A. and Revuelta, J.L., 2017. Engineering *Ashbya gossypii* strains for de novo lipid production using industrial by-products. *Microbial Biotechnology*, 10(2), pp.425-433. DOI: 10.1111/1751-7915.12487
98. Mack, M., van Loon, A. and Hohmann, H.P., 1999. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by ribC. *Journal of Bacteriology*, 180(4), pp.950-955. DOI:10.1128/jb.180.4.950-955.1998
99. Mack, M., van Loon, A. P. and Hohmann, H. P., 1998. *Journal of Bacteriology*, 180(4), pp.950-955.
100. Malzahn, R.C., Phillips, R.F. and Hanson, A.M., 1959. Riboflavin process. US. Pat. 2.
101. Man, Z.-w., Rao, Z.-m., Cheng, Y.-p, Yang, T.-w., Zhang, X., Xu, M.-j. and Xu, Z.-h., 2014. Enhanced riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RF1 through the optimization of agitation speed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), pp.661-667. DOI: 10.1007/s11274-013-1492-0

102. Massey, V., 2000. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions*, 28, pp.283-296.
103. Masuda, T., 1956. Isolation of a green fluorescent substance produced by *Eremothecium ashbyii*. *Pharmaceutical Bulletin*, 4(1), pp.71-72.
104. Mateos, L., Jiménez, A., Revuelta, J.L. and Santos, M.A., 2006. Purine biosynthesis, riboflavin production, and trophic-phase span are controlled by a Myb-related transcription factor in the fungus *Ashbya gossypii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), pp.5052-5060 DOI: 10.1128/AEM.00424-06
105. McNulty, H., Strain, J.J., Hughes, C.F. and Ward, M., 2017. Riboflavin, MTHFR genotype and blood pressure: A personalized approach to prevention and treatment of hypertension. *Molecular Aspects of Medicine*, 53, pp.2-9. DOI: 10.1016/j.mam.2016.10.002
106. Tamura, K., Stecher, G. and Peterson D. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013. 30. P. 2725-2729.
107. Merrill A.H. and McCormick, D.B. 2020. Riboflavin. Present knowledge in nutrition. *London: Elsevier*. P.189—207. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-66162-1.00011-1>.
108. Ming, H., Pizarro, A.V.L. and Park, E.Y., 2003. Application of waste activated bleaching earth containing rapeseed oil on riboflavin production in the culture of *Ashbya gossypii*. *Biotechnology Progress*, 19(2). DOI: 10.1021/bp0257325.
109. Mitra, S., Thawrani, D., Banerjee, P., Gachhui, R. and Mukherjee, J., 2012. Induced biofilm cultivation enhances riboflavin production by an intertidally derived *Candida famata*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(8), pp.1991-2006. DOI: 10.1007/s12010-012-9626-7
110. Monschau, N., Sahm, H. and Stahmann, K.P., 1998. Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhanced riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11). DOI: 10.1128/aem.64.11.4283-4290.1998

111. Nielsen, P.P. and Bacher, A., 1981. Biochim. *Biochimica et Biophysica Acta*. 662(2), pp.312-317.

112. Northrop-Clewes, C.A. and Thurnham, D.I., 2012. The discovery and characterization of riboflavin. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(3), pp.224-230. DOI: 10.1159/000343111.

113. Oh, Y.-K., Palsson, B.O., Park, S.M., Schilling, C.H. and Mahadevan, R., 2007. Genome-scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), pp.28791-28799.

114. Olfat, N., Ashoori, M. and Saedisomeolia, A. 2022. Riboflavin is an antioxidant: a review update. *Br. J. Nutr.* 9, pp.22 <https://doi.org/10.1017/S0007114521005031>.

115. Özbas, M. T., 1992. Microbial production of vitamin B2. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 38, pp. 259–262. Doi: 10.3177/jnsv.38.special_259

116. Park, E.Y., Ito, Y., Nariyama, M., Sugimoto, T., Lies, D. and Kato, T., 2011. The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), pp.1315-1326. DOI: 10.1007/s00253-011-3325-0

117. Pedrolli, D.B., Kühm, C., Sévin, D.C., Vockenhuber, M.P., Sauer, U., Suess, B. and Mack, M., 2015. A dual control mechanism synchronizes riboflavin and sulphur metabolism in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 112 (45), pp.14054-14059. DOI: 10.1073/pnas.1515024112

118. Peng, H., Xie, M., Zhong, X., Su, Y., Qin, X., Xu, Q., & Zhou, S. 2023. Riboflavin ameliorates pathological cardiac hypertrophy and fibrosis through the activation of short-chain acyl-CoA dehydrogenase. *European journal of pharmacology*, 954, 175849. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175849>

119. Pérez-García, F., Klein, V.J., Brito, L.F. and Brautaset T. 2022. From brown seaweed to a sustainable microbial feedstock for the production of riboflavin. *Front. Bioeng. Biotechnol* 10. P. 863690.

120. Perkins, J.B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chatterjee, N.P., Williams, V., Rufo, G.A., Hatch, R. and Pero, J., 1999. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(1), pp.8-18.

121. Pisoschi, Aurelia Magdalena, Pop, Aneta, Iordache Florin, Stanca, Loredana, Ionut, Geicu Ovidiu, Bilteanu, Liviu, and Serban, Andreea Iren. 2022. Antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory roles of vitamins in COVID-19 therapy <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114175>.

122. Pržić Dejan S, Ružić Nenad Lj, Petrović Slobodan DLYophilization: The process and industrial use. *Hemijska Industrija*, 2004, 58(12), p. 552-562. DOI: 10.2298/HEMIND0412552P

123. Radchenko, M., Andriiash, H., Beyko, N. and Pryiomov S., 2019 Staine-producer of riboflavin *bacillus subtilis* antibiotic resistance investigation XIV *Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів БІОТЕХНОЛОГІЯ XXI СТОЛІТТЯ. С. 52.*

124. Radchenko, M., Andriiash, H., Beyko, N., Tigunova, O. O. and Shulga, S. M., 2020. Optimization of the cultivation conditions of the riboflavin strain producer. *Biotechnologia Acta*, 13 (2), P. 48-55. DOI: 10.15407/biotech13.02.048

125. Radchenko, M.M., Beiko, N.E., Tigunova, O.O., Andriiash, G.S., Priyomov, S.G. and Shulga, S.M., 2022 Improvement of *Bacillus subtilis* strain producer for riboflavin accumulation increased. *All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*, June 15-17, p. 104.

126. Radchenko, M.M., Tigunova, O. O., Zelena, L. B., Beiko, N. Ye., Andriiash, H. S. & Shulga, S. M. 2021. Phylogenetic Analysis of the *Bacillus subtilis* IFBG MK-2 Strain and Riboflavin Production by Its Induced Clones. *Cytol Genet.* 55 (2), pp. 145–151. DOI: 10.3103/S0095452721020134.

127. Edwards, K., Logan, J. and Saunders, N. 2004. Real-time PCR: An essential guide. *UK: Horizon Bioscience*, 346 p.

128. Revuelta, [José Luis, Ledesma-Amaro, Rodrigo, Lozano-Martinez, Patricia, Díaz-Fernández, David, Buey, Rubén M. and Jiménez, Alberto. 2017.](#) Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27696023/>.

129. Richter, G., Fischer, M., and Bacher, A., 1997. Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 179(6), pp.2022-2028. doi: 10.1128/jb.179.6.2022-2028.1997

130. Rindler, V., Luneberger, S., Schwindke, P. Heschel, I. and Rau G.1999. Freeze-drying of red blood cells at ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 38, p. 2–15. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2143>

131. Rudge, R. H. Maintenance of bacteria by freeze-drying. In “Maintenance of Microorganisms”. *Academic Press, London* 2nd ed., pp. 31–44

132. Rühl, M., Zamboni, N. and Sauer, U., 2010. Dynamic flux responses in riboflavin overproducing *Bacillus subtilis* to increasing glucose limitation in fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(4), pp.795-804. DOI: 10.1002/бнт.22591

133. Russo, P., Capozzi, V., Arena, M.P., Spadaccino, G., Teresa Duenas, M., Lopez, P., Fiocco, D. and Spano, G., 2014. Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), pp.3691-3700. DOI: 10.1007/s00253-013-5484-7

134. Saliaj, A., Zahaj, M. and Xhindoli, J., 2023. International-Journal-of-Ecosystems-and-Ecology-Science-(IJEES)-Volume-13-1,-2023.html. *International journal of ecosystems and ecology science* 13(1), pp. 287–298. Doi: 10.31407/ijeess13.138

135. Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P. and Takors, R. 2013. Riboflavin (vitamin B2). *Industrielle Mikrobiologie. Springer-Verlag: BerlinHeidelberg.*

136. Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J.E., Hochuli, M., Szyperski, T. and Wüthrich, K., 1997. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnology*, 15(5), pp.448-452.

137. Schlösser, T., Wiesenburg, A., Gaetgens, C., Funke, A., Viets, U., Vijayalakshmi, S., Nieland, S. and Stahmann, K.P., 2007. Growth stress triggers riboflavin overproduction in *Ashbya gossypii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), pp.569-578.

138. Schmidt, G., Stahmann, K. P., Kaesler, B. and Sahm, H., 1996. Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology*, 142, pp.419-426.

139. Shi, [Shuobo](#), Chen, [Tao](#), Zhang, [Zhigang](#), Chen, [Xun](#), Zhao, [Xueming](#). 2009. Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19446032/>.

140. [Shi](#), Ting, [Wang](#), Yongcheng, [Wang](#) Zhiwen, [Wang](#) Guanglu, [Liu](#) Dingyu, [Fu](#) Jing, [Chen](#) Tao and [Zhao](#) Xueming. 2014. Deregulation of purine pathway in *Bacillus subtilis* and its use in riboflavin biosynthesis. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25023436/>.

141. Shi, S.B., Chen, T., Zhang, Z.G., Chen, X. and Zhao, X.M., 2009. Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production. *Metabolic Engineering*, 11(4–5), pp.243-252.

142. Stahmann, K. P., Arst, Jr. H. N., Althöfer, H., Revuelta, J. L., Monschau, N., Schlüpen, C., Gätgens, C., Wiesenburg, A. and Schlösser, T., 2001. Riboflavin overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environmental Microbiology*, 3(9), pp.545-550. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2001.00225.x

143. Stahmann, K.P., Revuelta, J. L. and Seulberger, H., 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), pp.509-516. DOI: 10.1007/s002530051649

144. Stitely, M. L., Harlow, K., & MacKenzie, E. 2019. Oral Riboflavin to Assess Ureteral Patency During Cystoscopy: A Randomized Clinical Trial. *Obstetrics and gynecology*, 133(2), pp. 301–307. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003063>

145. Sugimoto, T., Morimoto, A., Nariyama, M., Kato, T. and Park, E., 2010. Isolation of an oxalate-resistant *Ashbya gossypii* strain and its improved riboflavin production. *Microbial Biotechnology*, 37, pp.57-64. doi: 10.1007 / s10295-009-0647-3

146. Survase, S., Survase, A.S.A., Bajaj, I. B. and Singhal, R. S., 2006. Biotechnological Production of Vitamins. *Food Technology and Biotechnology*, 44, pp.381-396.

147. Schwechheimer, S. K. and Wittmann, C. B., 2018. Riboflavin production with *Ashbya gossypii* : a ¹³C high-resolution metabolic network analysis under industrial process conditions *Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek*. <http://d-nb.info/1173703144/34>

148. Tanner, J.F.W., Wickerham, L.J. and Van Lanen, J.M., 1948. Biological process for the production of riboflavin. *US. Pat.* 2,445,128.

149. Tännler, S., Zamboni, Z., Kiraly, C., Aymerich, S. and Sauer, U., 2008. Screening of *Bacillus subtilis* transposon mutants with altered riboflavin production. *Metabolic Engineering*, 10(5), pp. 16–226. DOI: 10.1016/j.ymben.2008.06.002

150. Tze, Yan Lee, Nuratiqah, Farah, Voon, Kin Chin, Chee Woei Lim, Pei Pei Chong, Rusliza Basir, Wai Feng Lim, Yan Shan Loo. 2023. Medicinal benefits, biological, and nanoencapsulation functions of riboflavin with its toxicity profile. A narrative review <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2023.08.010>

151. Vandamme, E. and Revuelta, J. 2016. Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants. *New York: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*.

152. Volk, R. and Bacher, A., 1991. Biosynthesis of riboflavin. Studies on the mechanism of L-3, 4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(31), pp.20610-20618.

153. Wang, G., Bai, L., Wang, Z., Shi, T., Chen, T. and Zhao, X., 2014. Enhancement of riboflavin production by deregulating gluconeogenesis in *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(6), pp.1893-1900. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.05.022

154. Yamanaka, G., Suzuki, S., Morishita, N., Takeshita, M., Kanou, K., Takamatsu, T., Morichi, S., Ishida, Y., Watanabe, Y., Go, S., Oana, S., & Kawashima, H. 2021. Experimental and Clinical Evidence of the Effectiveness of Riboflavin on Migraines. *Nutrients*, 13(8), 2612. <https://doi.org/10.3390/nu13082612>.

155. [You](#) Jiajia, [Du](#) Yuxuan, [Pan](#) Xuewei, [Zhang](#) Xian, [Yang](#) Taowei, and [Rao](#) Zhiming: 2022. Increased Production of Riboflavin by Coordinated Expression of Multiple Genes in Operons in *Bacillus subtilis*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35467340/>.

156. You Jiajia, Yang Chen, Pan Xuewei, Hu Mengkai, Du Yuxuan, Osire Tolbert, Yang Taowei, and Rao Zhiming. 2021. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for enhancing riboflavin production by alleviating dissolved oxygen limitation <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125228>.

157. Zhao G., Dong F., Lao X. and Zheng H. 2021. Strategies to increase the production of biosynthetic riboflavin. *Mol. Biotechnol.* 63. P. 909—918. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00318-7>

Додаток А

Список публікацій здобувача

Статті у періодичних виданнях.

1. Радченко, М.М., Тігунова, О.О., Андріяш, Г.С., Шульга, С.М. та Блюм, Я.Б., 2022. Особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *Bacillus subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з підживленням. *Доповіді Національної академії наук України*. 6, С. 79–84. <http://dspace.nbu.gov.ua/handle/123456789/187904>
2. Радченко, М.М., Андріяш, Г.С., Бейко, Н.Є., Тігунова, О.О. та Шульга С.М., 2022. Отримання штаму-продуценту *Bacillus subtilis* із підвищеним накопиченням рибофлавіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 31, С. 77-82. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v31.1488>
3. Radchenko, M. M., Tigonova, O. O., Zelena, L. B., Beiko, N. Y., Andriiash, H. S. and Shulga, S. M., 2021. Phylogenetic Analysis of the *Bacillus subtilis* IFBG МК-2 Strain and Riboflavin Production by Its Induced Clones. *Cytology and Genetics* . **55**(2), pp. 145–151. Doi: 10.3103/s0095452721020134 **Q3**
4. Radchenko, M. M., Andriiash H., Beyko N., Tigonova O. O., and Shulga S. M. 2020. Optimization of the cultivation conditions of the riboflavin strain producer. *Biotechnologia Acta* . 13(2), pp. 48–55. Doi: 10.15407/biotech13.02.048
5. Радченко, М.М., Бейко, Н.Є., Андріяш, Г.С., Тігунова, О.О. та Шульга С.М., 2019. Виділення та ідентифікація штаму-продуценту рибофлавіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 24, С. 154-159. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1094>

Тези доповідей у матеріалах конференцій

1. Radchenko, M.M., Beiko, N.E., Tigonova, O.O., Andriiash, G.S., Priyomov, S.G. and Shulga, S.M., 2022. Improvement of *Bacillus subtilis* strain producer for riboflavin accumulation increased. *All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*, June 15-17. Online. p. 104.
2. Радченко, М. М., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С., 2021. Вдосконалення штаму-продуценту рибофлавіну *Bacillus Subtilis* хімічним мутагенезом. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 23 квітня. Київ. Україна С. 81.
3. Метейко, Д.О., Радченко, М.М., Тігунова, О. О., та Андріяш Г. С., 2021. Визначення вмісту рибофлавіну в розчинах флуориметричним методом. *Topical issues of modern science. Society and education. Proceedings of the 3rd International scientific and practical conference*, 26-28 December. Kharkiv. Ukraine. p. 83-85.
4. Радченко, М. М., Бейко, Н. Є., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С., 2020. Виділення штаму-родуценту рибофлавіну з природних джерел. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 20 травня. Київ. Україна. С. 156.
5. Радченко, М. М., Бейко, Н. Є., Тігунова, О. О. та Андріяш, Г. С., 2020. Вплив джерела вуглецю на синтез біомаси та накопичення рибофлавіну штамом *Bacillus subtilis*. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 20 травня. Київ. Україна. С. 157.
6. Radchenko, M.M., Andriiash G.S., Beyko N.E., and Priyomov S.G., 2019. Staine-producer of riboflavin *Bacillus Subtilis* antibiotic resistance investigation. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XV

Всеукраїнської науково-практичної конференції, 19 квітня. Київ. Україна. С. 67.

7. Метейко, Д. О., Радченко, М. М., Тігунова, О. О. та Шульга С. М., 2019. Штами-надпродуценти рибофлавіну. *«Біотехнологія XXI століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, 19 квітня. Київ. Україна. С. 52.*
8. Радченко, М.М., Тігунова, О.О, Андріяш, Г. С., та Бейко Н. Є., 2018. Накопичення рибофлавіну штамом *Bacillus subtilis* за використання різної концентрації посівного матеріалу. *Біотехнологія: досвід, традиції та інновації: збірник наукових праць II міжнародної науково-практичної інтернет-конференції. 15 листопада. Київ. Україна. С. 82.*

Додаток Б

Довідка про непатогенність штаму

В-7791

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Інституту мікробіології і
вірусології НАН УкраїниВ.С.Підгорський
20 грудня 2018 р.

В И С Н О В О К

щодо дослідження вірулентності штаму
Bacillus subtilis IFCG MK-2 на моделі білих мишей

Штам *Bacillus subtilis* IFCG MK-2 надано для випробувань ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України" згідно договору № 152-2018.

Окремі види вказаного роду включено до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [1, 2, 3, 6, 10]. Рівень патогенності мікроорганізму базується на встановленні у гострих, субхронічних та хронічних дослідях ряду токсико-гігієнічних показників для двох видів теплокровних лабораторних тварин: вірулентності, токсичності, токсигенності, алергенності, імуноотоксичної, дисбіотичної та подразнюючої дії тощо [5, 7, 8, 9]. Для депонування даного штаму визначали рівень його безпеки за допомогою дослідження одного із показників патогенності – вірулентності бактерій у гострих дослідях на моделі білих мишей.

Для досліджень брали завісь клітин і спор у фізіологічному розчині концентрацією $2,6 \times 10^9$ і $2,6 \times 10^9$ у 1 мл. Дослідження проводили на безпородних білих мишах вагою 18 ± 2 г. Тварини були адаптовані протягом 15 діб до умов утримання [4]. Досліджуваний матеріал вводили перорально через зонд та внутрішньочеревинно за допомогою ін'єкцій. Нагляд за тваринами після затравки та ін'єкцій проводили щоденно протягом 14 днів.

Визначали вірулентність суспензії клітин, отриманих при культивуванні штаму в аеробних умовах протягом 2 діб. Для культивування використовували сесво-казеїновий агар (СКА) та температуру $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Суспензію готували на стерильному фізіологічному розчині, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту мутності з перерахунком концентрації клітин для виду *Bacillus subtilis* [11]. Критерієм авірулентності слугувала відсутність інфекційної патології та загибелі мишей протягом 14 діб. Контролювали поведінкові реакції та фізіологічний стан мишей. При внутрішньочеревинних ін'єкціях керувалися рекомендованими для непатогенних мікроорганізмів граничними концентраціями культури не менше 1 млрд./мишу (IV класу небезпеки) та не менше 10 млн./мишу для бактерій III класу небезпеки [7, 9]. При надходженні культури через шлунок керувалися рекомендованими для бактерій III групи небезпеки граничними концентраціями клітин з $\text{LD}_{50\text{per os}} > 100$ млн./мишу [5] або $\text{LD}_{50\text{per os}} > 1$ млрд./мишу [7, 8], а для авірулентних бактерій IV групи небезпеки $\text{LD}_{50\text{per os}} > 100$ млрд./мишу [7].

Інфективність (інвазивність) штаму визначали за можливих природних шляхів поступлення останніх в організм, а саме по спроможності клітин проникати всередину тканин органів тварин після перорального зараження. Мишам вводили одноразово *per os* активну культуру бактерій в максимальних дозах, які не призводили до загибелі тварин.

Через 14 діб після зараження і закінчення терміну спостережень тварин убивали дислокацією шийних хребців та проводили розтин і макроскопічне дослідження внутрішніх органів та висіви їх зразків на живильний агар (СКА) для виявлення ретрокультур. Для контролю паралельно висівали на СКА чисту культуру штаму.

В період спостереження після внутрішньочеревного вводу суспензії клітин бактерій у дозі 1,3 млрд. не встановлено зміни поведінкових реакцій тварин, всі тварини добре поїдали корм, змін з боку хутряного покриву не помічено. Була відсутня достовірна різниця в масі тіла дослідних і контрольних тварин. Миші були активними, фізіологічні відправлення у них

не порушувались, поведінкові реакції були звичайними. Клінічних ознак інфекційного ураження тварин не відмічено (Таблиця 1).

Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин через 14 діб після в/ч введення культури не виявили носійства спор чи вегетативних клітин у внутрішніх органах мишей: печінці, нирках. Ретрокультури при висіві зразків печінки чи нирок на СКА не виявлені, що вказує на те, що даний штам не розмножується в організмі досліджених теплокровних тварин.

Середньолетальні дози культури *Bacillus subtilis* IFCG MK-2 при в/ч введенні не були досягнуті, оскільки останні перевищували застосовані концентрації. Так, $LD_{50\text{ в/ч}} > 1,3$ млрд. клітин/мишу (таблиця). Отримані при в/ч введенні результати свідчать про можливість приналежності штаму по ступені небезпеки мікроорганізмів до 4-го класу, а саме "мало небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії" [7, 9].

Після перорального вводу бактерій у дозі 13 млрд. клітин встановлено загибель половини дослідних тварин на 5-7 добу після заправки. Клінічних ознак інфекційного ураження тварин та зміни поведінкових реакцій не відмічено. Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів виживши через 14 діб дослідних тварин не виявили носійства спор чи вегетативних клітин у внутрішніх органах мишей: печінці, нирках. Після закінчення досліді ретрокультури при висіві зразків печінки чи нирок на СКА не виявлені.

Таблиця 1. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУЛЕНТНОСТІ ШТАМУ
Bacillus subtilis IFCG MK-2*

Матеріал для введення	Кількість мишей штук	Доза		Шлях введення	Курс введення діб	Кількість мишей		
		мл	млрд. клітин			Захворіло штук	Загинуло штук	Вижило штук
Дослід:								
Суспензія 2-добової культури	10	0,5	1,3	в/ч	1	0	0	10
	10	0,5	13	per os	1	0	5-7доб	5
Контроль:								
Фізіологічний розчин	6	0,5	0	в/ч	1	0	0	6
	6	0,5	0	per os	1	0	0	6

*Примітка: в/ч - внутрішньочеревинні ін'єкції, per os - введення в шлунок з допомогою зонда.

Середньолетальна доза культури *Bacillus subtilis* IFCG MK-2 при пероральному введенні склала $LD_{50\text{ per os}} = 13 \times 10^9$ млрд. клітин/мишу. Ця середньолетальна пероральна доза є в межах рекомендованих граничних значення для непатогенних мікроорганізмів III класу небезпеки. Тобто штам відноситься до III класу небезпеки мікроорганізмів: «помірнонебезпечних (помірно токсичних), що мають слабку загальнотоксичну дію або алергенну дію» (4, 5, 7, 8), або до II групи ризику по класифікації ВООЗ (помірний індивідуальний ризик і обмежений ризик для населення в цілому) [7, 9].

Всі миші і контрольні в тому числі, які залишилися живими після закінчення терміну спостережень, були вбиті, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів. Відсутність інфекційної патології і ознак ураження дослідних тварин було підтверджено при макроскопічному вивченні внутрішніх органів. Результати розтину показали:

- * серце звичайної форми і розміру;
- * легені в об'ємі не збільшені, долі легко відокремлюються одна від одної, поверхні гладенькі, спаях не відмічено;
- * шлунок, петлі тонкого і товстого кишечника зовні є звичайними, на розрізі малюнок слизової незмінений;
- * печінка темно-червоного кольору, нормальної консистенції, середнього кровонаповнення, не збільшена, поверхня гладенька;
- * нирки звичайних розмірів і форми, поверхні гладенькі, на розрізі чіткий малюнок коркової і мозкової речовини;
- * селезінка не збільшена, консистенція туга, на розрізі пульпа помірно повнокровна і темного кольору.

Таким чином, культура *Bacillus subtilis* IFCG MK-2 згідно отриманих у гострих дослідях результатів та відповідних нормативних матеріалів належить до групи авірulentних мікроорганізмів що належать до III класу небезпеки мікроорганізмів: «*помірнонебезпечних (помірно токсичних), що мають слабку загальнотоксичну дію або алергенну дію*», або до II групи ризику по класифікації ВООЗ («*помірний індивідуальний ризик і обмежений ризик для населення в цілому*») [4, 5, 7, 8, 10]. Цей клас небезпеки і група ризику дозволені МОЗ України до використання у виробництві (8).

Дослідження проведені для депонування культури як первинна санітарно-гігієнічна оцінка штаму.

Література

1. Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності. Державні санітарні правила МОЗ України, ДСП 9.9.5.035.99. 1999р.
2. Директива 90/679 Ради Європейської економічної співдружності.
3. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів, видання 4-те, 1995.
4. Кожежанин Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. МОЗУ, Фармкомітет. Київ-2002. 156 С.
5. Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки МОЗ України. Київ, 2004.
6. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий группы *Bacillus subtilis-typhimuricus* из организма человека и животных. Киев: Наукова думка, 1980.
7. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов. Киев, 1982.
8. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды М., 1991.
9. Постановка исследований для обоснования предельно-допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны. Методические указания. М., 1983.
10. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. Киев: Наукова думка, 1982.
11. Шаповалова О.В. і ін. Стандартизація методу виготовлення суспензій мікроорганізмів // Збірка «Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях» Київ, «Знання України», 2004, стор.70-75.

Старший науковий співробітник, к.б.н.
Інженер

20 грудня 2018

Т.М. Головач
Л.І.Грома

Додаток В
Свідоцтво про первісне депонування

С В І Д О Ц Т В О

про первісне депонування штаму мікроорганізму в
Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології
НАН України

Кому надано: Шульга С.М., Бейко Н.Є., Тігунова О.О., Андріяш Г.С.,
Радченко М.М.
ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН
України"

Поштова адреса м. Київ 0413, вул. Осиповського 2а

Цим підтверджується, що штаму мікроорганізму:

Bacillus subtilis IFCG MK-2

первісно депонований в :

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Ресстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Bacillus subtilis IMB B-7797

Супроводжувальна документація від депозитара одержана:

паспорт, висновок про непатогенність, договір 152-2018

Дата первісного депонування: 20.12.2018

Директор Інституту
мікробіології
і вірусології НАН України



В.С. Ідрорський



19.12.2018

Адреса: 03143, Київ, вул. Заболотного, 154

www.imv.kiev.ua;

Golovacht@ukr.net

Додаток Г

Паспорт на штам

ЗАТВЕРДЖУЮ



ПАСПОРТ

штаму мікроорганізму, який передається
в Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Номер в депозитарії... *ІМВ Б-7797*
Дата надходження.....

1. Видова назва культури: *Bacillus subtilis*
2. Номер та назва культури: *Bacillus subtilis IFCG МК-2*
3. Родовід штаму: штам отримано методом багатоступінчатого відбору з природного субстрату
4. Ідентифікація штаму: була проведена Бейко Наталією Євгенівною, Тігуною Оленою Олександрівною, Андрієм Ганною Сергіївною та Радченко М.М в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України (ІХБГ)
5. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму: являє собою Грам-позитивну культуру, форма клітин – прями палички розміром (0,4–2,0*1,3-5,0) мкм. Колонії круглі, сірувато-білого кольору, пастоподібної консистенції. Край колонії рівенький.

Утворюють овальні спори, розташування спор в материнській клітині центральне, розтягування клітини не спостерігається.

Утворюють кислоту в середовищі з арабінози і манніту з відповідною заміною глюкози. Гідролізують крохмаль.

Засвоюють азот у вигляді солей амонію.

В середовищах різного складу, де джерелом вуглецю є глюкоза або цукроза клітини синтезують рибофлавін до 4,3 г/л

Аероб.

Зростає на L-агарі за температури від 35 до 40°C, оптимум складає 38°C;
за рН від 6 до 7,5; оптимум рН становить 7,0.

На основі культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних особливостей штаму культура була ідентифікована як *Bacillus subtilis* IFCG МК-2 (за «Кратким определителем бактерий Берджи» М. Мир, 1980)

Штам не є мутантним.

6. Галузь використання штаму: отримання рибофлавіну

7. Продукти, що синтезуються штамом: рибофлавін

8. Активність штаму: визначається флуорометричним або спектрометричним методами у культуральній рідині після 3 діб культивування за температури 38°C

9. Довгострокове зберігання штаму: штам може зберігатися на косяках з L-агаром в холодильнику за температури 4°C протягом 6 місяців, або під шаром вазелінової олії протягом року.

10. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму: штам культивується за температури 38°C, з доступом повітря, на середовищі наступного складу(г/л): , дріжджі хлібопекарські пресовані - 40,0 (або сушені - 10) ; цукор -120,0; кукурудзяний екстракт рідкий -10 (або сушений -5) ; магній сірчано кислий -0,5


11. Відомості про патогенність

12. Генетичні особливості штаму: штам не є мутантним; має чутливість до азитроміцину, не чутливий до еритроміцину, хлорамфеніколу

13. Причина депонування передача на депонування

14. Відомості про депозитора: ДУ «Інституті харчової біотехнології та геноміки» НАН України (ІХБГ); Шульга С. М., Бейко Н. Є., Тігунова О. О., Андріяш Г.С Радченко М.М.; вул. Осиповського 2 а, м. Київ, 04123, Україна
E-mail: shulga@ibg.gov.ua, +38 (044) 434-45-77

Дата

 Зав. відділом промислової та харчової біотехнології С. М. Шульга