

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.06.079>

УДК 604;579.2

М.М. Радченко, <https://orcid.org/0000-0003-4800-3991>

О.О. Тігунова, <https://orcid.org/0000-0002-1041-5723>

Г.С. Андріяш, <https://orcid.org/0000-0001-7647-4091>

С.М. Шульга, <https://orcid.org/0000-0003-1080-8583>

Я.Б. Блюм, <https://orcid.org/0000-0001-7078-7548>

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

E-mail: Radchenkomarina33@gmail.com, Tigunova@ukr.net, aa24121982@gmail.com,

Shulga5@i.ua, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *Bacillus subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з підживленням

Представлено академіком НАН України Я.Б. Блюмом

Рибофлавін відіграє важливу роль у широкому діапазоні біологічних процесів. Метою роботи було встановити особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *Bacillus subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі. Показано, що за культивування штаму в колбах об'ємом 1 дм³ накопичення рибофлавіну становило 13,9 г/дм³ на 66-ту годину культивування. Масштабування процесу культивування з підживленням проводили в біореакторі об'ємом 10 дм³. Встановлено, що оптимальний об'єм внесення підживлення становить 47 %, а кількість аміачної води, необхідної для стабілізації рН та накопичення рибофлавіну — 8 % об'єму середовища до інокуляції. Визначено, що конверсія глюкози становить 12%, накопичення рибофлавіну — 19,1 г/дм³ (за культивування з підживленням). Показано, що за умов культивування штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з періодичним підживленням істотно збільшується накопичення рибофлавіну (на 65 %) порівняно з накопиченням рибофлавіну в колбах.

Ключові слова: біореактор, рибофлавін, культивування, *Bacillus subtilis*.

Рибофлавін (вітамін В₂) відіграє вирішальну роль у широкому діапазоні біологічних процесів. Рибофлавін необхідний для забезпечення нормального обміну речовин, розвитку, живлення та здоров'я організму [1]. Основними джерелами рибофлавіну для людини є харчові продукти, а для тварин — збалансовані корми [2–4].

Після відкриття вітаміну В₂ було започатковано (1933 р.) розробку комерційної технології рибофлавіну хімічним методом. Наступним кроком у технології рибофлавіну було створення комбінованого хемоферментного процесу (1980 р.). На сьогодні мікробіологіч-

Цитування: Радченко М.М., Тігунова О.О., Андріяш Г.С., Шульга С.М., Блюм Я.Б. Особливості культивування штаму-продуцента рибофлавіну *Bacillus subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з підживленням. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2022. № 6. С. 79–84. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.06.079>

ний спосіб отримання рибофлавіну за культивування штаму гриба *Ashbya gossypii*, отриманого класичною селекцією та мутагенезом, практично повністю витіснив хімічний синтез [1, 5]. Нещодавно опубліковано результати досліджень з використанням мікроорганізмів *Escherichia coli* та *Lactobacillus* в технології рибофлавіну [1]. У промисловому виробництві в основному використовують мікроорганізми *Ashbya gossypii*, *Candida famata* і *Bacillus subtilis* [6]. Як правило, дикий тип *B. subtilis* не може надмірно накопичувати рибофлавін, тому вимагає певних модифікацій для надсинтезу і оптимізації умов культивування [7].

Мета дослідження полягала у встановленні особливостей культивування отриманого нового штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з підживленням.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження було культивування штаму-продуцента *B. subtilis* IFBG МК-1А з “Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології” ДУ “Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України” [8].

Умови та середовища культивування штаму в колбах. Для вирощування штаму-продуцента рибофлавіну використовували живильне середовище такого складу (L-агар): екстракт дріжджовий — 5,0 г; натрій хлористий — 5,0 г; пептон — 5,0 г; агар — 25,0 г; вода дистильована — до 1,0 дм³, рН 7,2 ± 0,1. Колонії мікроорганізмів вирощували за температури 38 ± 1 °С протягом 72 год. Усі колонії, які виростили на твердих середовищах, відбирали для культивування та перевірки накопичення рибофлавіну. Для вирощування інокуляту використовували середовище такого складу: меляса — 30,0 г; амоній сірчаноокислий — 4,0 г; магній сірчаноокислий — 0,5 г; кукурудзяний екстракт — 15,0 г; вода водопровідна — додавали до мітки 1,0 дм³. Культивування проводили протягом 24 год у шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) за температури 37 °С і швидкості 240 об/хв.

Як *ензиматичне* використовували середовище такого складу: глюкоза — 120,0 г; дріжджі хлібопекарські пресовані — 40,0 г; кукурудзяний екстракт — 10,0 г; магній сірчаноокислий — 0,5 г; вода дистильована — додавали до мітки 1,0 дм³. Культивування проводили протягом 72 год у шейкері-інкубаторі за температури 37 °С і швидкості 240 об/хв.

Культивування штаму-продуцента рибофлавіну в біореакторі.

Культивування проводили в біореакторі “Sartorius Biostat В TWIN” (ФРН) з лопатевою мішалкою і об'ємом колб 10 дм³.

Склад інокуляційного середовища: меляса — 30 г; амоній сірчаноокислий — 4 г; магній сірчаноокислий — 0,5 г; кукурудзяний екстракт — 15 г; гідрофосфат калію — 3,5 г, дегідрофосфат калію — 1,5 г; вода водопровідна — до 1 дм³; рН 7,2 ± 0,1. Культивування штаму проводили протягом 24 год у шейкері-інкубаторі за температури 37 ± 1 °С і швидкості 240 об/хв.

Склад ензиматичного середовища: дріжджі сухі — 23 г; кукурудзяний екстракт — 10 г; амоній сірчаноокислий — 3,5 г; магній сірчаноокислий — 1,0 г; гідрофосфат калію — 2,0 г, дегідрофосфат калію — 2,0 г; вода дистильована — до 1 дм³, рН 7,2 ± 0,1.

Склад вуглеводного підживлення (загальний об'єм 2,35 дм³): дріжджі сухі — 40 г; кукурудзяний екстракт — 50 г; глюкоза — 1500 г; вода дистильована. Бутиль із середовищем, забезпечений силіконовою трубкою і дренажним фільтром, стерилізували протягом 40 хв за температури 121 °С. Готове підживлення у скляних бутлях об'ємом 2 дм³ (“Simax”, Чехія) підключали до біореактора. Для підтримання рН використовували аміачну воду (25 %), як піногасник — “Пропінол Б400”, який стерилізували протягом 30 хв за температури 120 °С.

Інокулянт вносили в біореактор з ензиматичним середовищем у кількості 20 % за об'ємом. Початковий об'єм середовища в біореакторі 30 % (3,0 дм³) загального об'єму. Вуглеводне підживлення додавали залежно від падіння рівня глюкози.

Параметри культивування штаму-продуцента рибофлавіну *B. subtilis* IFBG МК-1А такі: температура — 37 ± 1 °С; подача повітря — 3,5 м³/год (1 об'єм/об'єм/хв); рН — $7,0 \pm 0,2$; частота обертання мішалки — 360–400 об/хв; тиск в апараті — 0,03–0,04 МПа.

Процес культивування завершували, коли знижувався рівень споживання глюкози і не відбувалося збільшення накопичення рибофлавіну (визначали накопичення рибофлавіну в двох пробах культуральної рідини поспіль, а рівень глюкози був сталий за відсутності додавання підживлення).

Цитологічні дослідження проводили за допомогою мікроскопа “Laboval 4” (“Carl Zeiss”, ФРН). Фотографічні знімки робили за допомогою фотоапарата “Canon Power Shot A640” (Японія). Кількість глюкози визначали з використанням розчинів Фелінга за методикою [9], кількість синтезованого рибофлавіну — флуориметричним методом за допомогою спектрофотометра SPEKOL 1500 UV VIS (ФРН).

Статистичне оброблення даних виконано за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в трьох повтореннях. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Штам-продуцент рибофлавіну *B. subtilis* IFBG МК-1А культивували в колбах об'ємом 1,0 дм³ у періодичному процесі без підживлення. У досліді з використанням середовища з глюкозою штам продукував рибофлавін у кількості 13,8–13,9 г/дм³ (рис. 1).

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 відбувалася поступова руйнація рибофлавіну. Рівень накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом *B. subtilis* IFBG МК-1А у колбах можна порівняти з результатами накопичення рибофлавіну [1, 10] у разі використання рекомбінантних штамів *B. subtilis* (16–24 г/дм³).

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.

Для одержання інокуляційного матеріалу штам-продуцент *B. subtilis* IFBG МК-1А висаджували на тверде середовище у чашки Петрі і перевіряли чистоту культури (рис. 2).

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, грампозитивні, 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 паличкоподібні клітини. Розташування спор у материнській клітині — центральне. Розтягування клітини не спостерігалось.

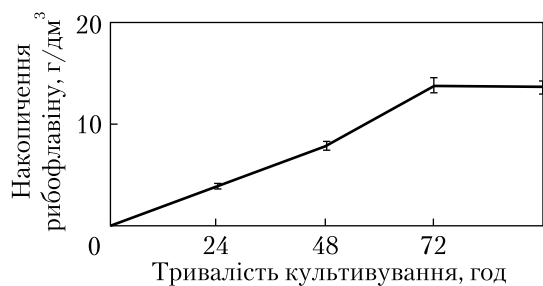


Рис. 1. Накопичення рибофлавіну в колбах

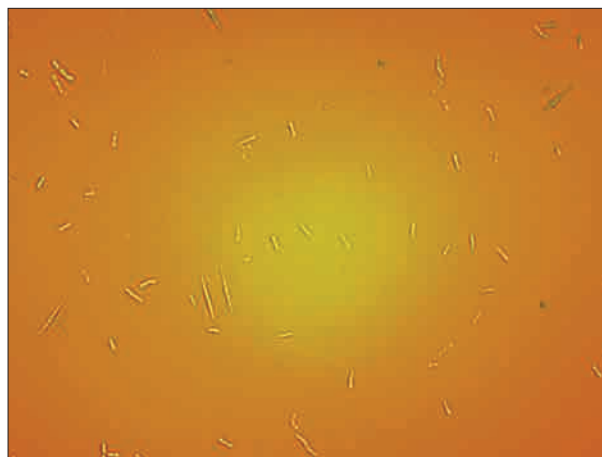


Рис. 2. Клітини штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А ▶ на середовищі L-агар (збільшення 90х)

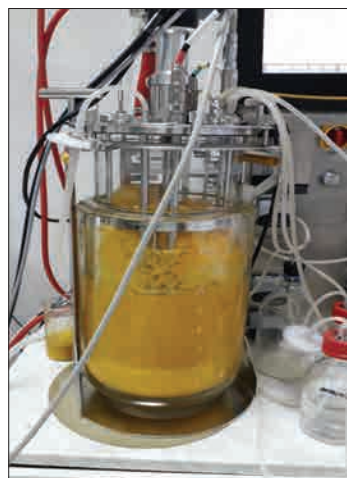


Рис. 3. Вигляд культуральної рідини штаму-продуцента *B. subtilis* IFBG МК-1А

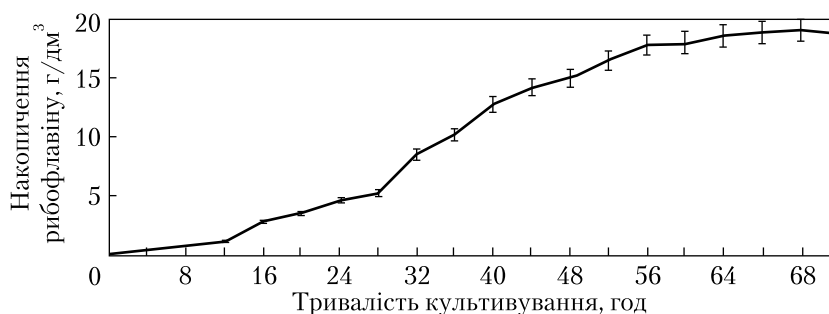


Рис. 4. Накопичення рибофлавіну залежно від тривалості культивування

Інокулят вирощували в колбах протягом 24 год, після чого проводили засів ензиматичного середовища в біореакторі. Біореактор з культуральною рідиною штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А показано на рис. 3.

У процесі культивування через кожні 4 год відбирали проби культуральної рідини для біохімічного та мікробіологічного контролю. Визначали накопичення рибофлавіну і вміст глюкози у культуральному середовищі. Різке 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). Вуглеводне підживлення та аміачну воду подавали з таким розрахунком, щоб підтримувати значення рН на рівні 7,0–7,2 і 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. Під час піноутворення для зни-

ження рівня піни в середовище вносили стерильний піногасник. Накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом залежно від тривалості культивування в біореакторі показано на рис. 4.

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.

Висновки. 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. 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 культивування в біореакторі з підживленням). За умов культивування штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А у біореакторі з періодичним підживленням накопичення рибофлавіну істотно збільшується (на 65 %) порівняно з накопиченням рибофлавіну в колбах.

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи “Створення штамів надпродуцентів вторинних метаболітів (амінокислот, спиртів, вітамінів)” (№ 0119U101489) за фінансової підтримки НАН України.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Zhao G., Dong F., Lao X., Zheng H. Strategies to increase the production of biosynthetic riboflavin. *Mol. Biotechnol.* 2021. **63**. P. 909–918. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00318-7>
2. Olfat N., Ashoori M., Saedisomeolia A. Riboflavin is an antioxidant: a review update. *Br. J. Nutr.* 2022. 9 p. <https://doi.org/10.1017/S0007114521005031>
3. Aljaadi A.M., Devlin A.M., Green T.J. Riboflavin intake and status and relationship to anemia. *Nutr. Rev.* 2022. nuac043. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuac043>
4. Bosch A.M. Riboflavin. *Principles of nutrigenetics and nutrigenomics*. London: Elsevier, 2020. P. 283–286. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804572-5.00037-9>
5. Merrill A.H., McCormick, D.B. Riboflavin. *Present knowledge in nutrition*. London: Elsevier, 2020. P. 189–207. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-66162-1.00011-1>
6. Pérez-García F., Klein V.J., Brito L.F., Brautaset T. From brown seaweed to a sustainable microbial feedstock for the production of riboflavin. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. **10**. 863690. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.863690>
7. Bretzel, W., Schurter, W., Ludwig, B., Kupfer E., Doswald S., Pfister M., van Loon A.P.G.M. Commercial riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis*: down-stream processing and comparison of the composition of riboflavin produced by fermentation or chemical synthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1999. **22**. P. 19–26. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900604>
8. Radchenko M.M., TGUNOVA O.O., Zelena L.B., Beiko N.Ye., Andriiash H.S., Shulga S.M. Phylogenetic analysis of the *Bacillus subtilis* IFBG МК-2 strain and riboflavin production by its induced clones. *Cytol. Genet.* 2021. **55**. P. 145–151. <https://doi.org/10.3103/S0095452721020134>
9. Остапченко Л.І., Компанець І.В., Скопенко О.В., Синельник Т.Б., Савчук О.М., Береговий С.М. Біоорганічна хімія. Практикум: навч. посіб. Київ: ВПЦ “Київський університет”, 2019. 400 с.
10. Stahmann K.-P., Revuelta J.L., Seulberger H. Three biotechnological processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *App. Microbiol. Biotechnol.* 2000. **53**, № 5. P. 509–516. <https://doi.org/10.1007/s002530051649>

Надійшло до редакції 26.09.2022

REFERENCES

1. Zhao, G., Dong, F., Lao, X. & Zheng, H. (2021). Strategies to increase the production of biosynthetic riboflavin. *Mol. Biotechnol.*, 63, pp. 909-918. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00318-7>
2. Olfat, N., Ashoori, M. & Saedisomeolia, A. (2022). Riboflavin is an antioxidant: a review update. *Br. J. Nutr.*, 9 p. <https://doi.org/10.1017/S0007114521005031>
3. Aljaadi, A. M., Devlin, A. M. & Green, T. J. (2022). Riboflavin intake and status and relationship to anemia. *Nutr. Rev.*, nuac043. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuac043>
4. Bosch, A. M. (2020). Riboflavin. In *Principles of nutrigenetics and nutrigenomics* (pp. 283-286). London: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804572-5.00037-9>
5. Merrill, A. H. & McCormick, D. B. (2020). Riboflavin. *Present knowledge in nutrition* (pp. 189-207). London: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-66162-1.00011-1>
6. Pérez-García, F., Klein, V. J., Brito, L. F. & Brautaset, T. (2022). From brown seaweed to a sustainable microbial feedstock for the production of riboflavin. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 10, 863690. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.863690>
7. Bretzel, W., Schurter, W., Ludwig, B., Kupfer E., Doswald S., Pfister M. & van Loon A. P. G. M. (1999). Commercial riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis*: down-stream processing and comparison of the composition of riboflavin produced by fermentation or chemical synthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 22, pp. 19-26. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900604>
8. Radchenko, M. M., Tигунова, 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, pp. 145-151. <https://doi.org/10.3103/S0095452721020134>
9. Ostapchenko, L. I., Kompanec, I. V., Skopenko, O. V., Synelnyk, T. B., Savchuk, O. M. & Berehovyi, S. M. (2019). *Bioorganic chemistry*. Kyiv: VOC "Kyiv University" (in Ukrainian).
10. Stahmann, K.-P., Revuelta, J. L. & Seulberger, H. (2000). Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, No. 5, pp. 509-516. <https://doi.org/10.1007/s002530051649>

Received 26.09.2022

M.M. Radchenko, <https://orcid.org/0000-0003-4800-3991>

O.O. Tигунова, <https://orcid.org/0000-0002-1041-5723>

H.S. Andriiash, <https://orcid.org/0000-0001-7647-4091>

S.M. Shulga, <https://orcid.org/0000-0003-1080-8583>

Ya.B. Blume, <https://orcid.org/0000-0001-7078-7548>

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: Radchenkamarina33@gmail.com, Tигунова@ukr.net, aa24121982@gmail.com,

Shulga5@i.ua, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

CULTIVATION FEATURES OF THE RIBOFLAVIN-PRODUCING STRAIN *BACILLUS SUBTILIS* IFBG MK-1A USING A BIOREACTOR WITH FEEDING

Riboflavin plays an important role in a wide range of biological processes. The aim of the work was to establish the peculiarities of the riboflavin-producing strain *Bacillus subtilis* IFBG MK-1A cultivation in a bioreactor. The article shows that riboflavin accumulation for 66 hours was 13.9 g/dm³ when strain-producer was cultivated in flasks with volume of 1 dm³. Scaling of strain producer process with feeding in a bioreactor with a volume of 10 dm³ was carried out. It was established that the optimal volume of feeding was 47 %, and amount of ammonia water required for pH stabilization and riboflavin accumulation was 8 % of medium volume before inoculation. Glucose conversion was 12 %, while riboflavin accumulation – 19.1 g/dm³. It was shown that the cultivation of *B. subtilis* IFBG MK-1A strain using a bioreactor with periodic feeding leads to a significant increase in the accumulation of riboflavin (by 65 %) compared to the accumulation of riboflavin in flasks.

Keywords: *bioreactor, riboflavin, cultivation, Bacillus subtilis.*