

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

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

✉ shulga5@i.ua, (067) 440-05-31

## ОТРИМАННЯ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТУ *BACILLUS SUBTILIS* ІЗ ПІДВИЩЕНИМ НАКОПИЧЕННЯМ РИБОФЛАВІНУ

**Мета.** Метою роботи було підвищення накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом *Bacillus subtilis* IMB В-7797 за допомогою хімічного мутагенезу. **Методи.** Для досягнення мети використовували метод оброблення штам-продуценту хімічним мутагеном N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідинином із подальшим культивуванням отриманого клону та визначенням накопичення рибофлавіну. **Результати.** В результаті дії хімічного мутагену на *B. subtilis* IMB В-7797 отримано мутантний штам *B. subtilis* IFBG NTG2, який за морфологічними ознаками (колір, розмір, форма колоній) і накопиченням рибофлавіну відрізнявся від вихідної культури. **Висновки.** В результаті дії хімічного мутагену на *B. subtilis* IMB В-7797 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/дм<sup>3</sup>), ніж вихідний штам (13,9 г/дм<sup>3</sup>). Штам *B. subtilis* IFBG NTG2 в подальшому пропонується для використання в промисловій технології рибофлавіну і створення на його основі рекомбінантного штаму для надсинтезу рибофлавіну.

**Ключові слова:** *Bacillus subtilis*, штам-продуцент, рибофлавін, хімічний мутагенез.

Рибофлавін (вітамін В<sub>2</sub>) – водорозчинна сполука, яка синтезується рослинами та мікроорганізмами. Рибофлавін відіграє важливу роль у багатьох клітинних функціях. Рибофлавін використовують у медицині, фармацевтиці, харчовій промисловості та комбікормах [1; 2]. Рибофлавін у світовому промисловому виробництві (в Україні відсутнє) отримують трьома способами: хімічним синтезом, мікробіологічним синтезом та змішаним, який передбачає мікробіологічний синтез рибози з наступною хімічною модифікацією рибози в рибофлавін [3; 4]. Хімічний син-

тез рибофлавіну проходить у декілька стадій з усіма можливими недоліками та складнощами, на відміну від мікробіологічного способу, який дозволяє виробляти рибофлавін в одну стадію. Для біотехнологічного виробництва рибофлавіну використовують організми різних таксономічних груп. Рибофлавін за мікробіологічного способу отримують із клітин промислових штамів грибів *Ashbya gossypii*, *Candida famata* var. *flasheri* та бактерій *Bacillus subtilis*, досягаючи титру 15, 20 та 18 г/дм<sup>3</sup> відповідно [1; 5]. Світовий ринок виробництва рибофлавіну збільшився більш ніж удвічі з 4000 т/рік (2002 р.) до 9000 т/рік (2015 р.) [2] і постійно зростає. Приблизно 70% рибофлавіну в основному використовується як кормова добавка, а близько 30% – як харчова добавка і в фармацевтиці [1; 2].

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 [1; 2; 6]. Для підвищення продуктивності штамів використовують методи індукованого мутагенезу [7; 8; 9] і генної інженерії [5; 10]. У промисловому виробництві рибофлавін в основному отримують за використання аскоміцета *A. gossypii* та бактерії *B. subtilis*. [11; 12]. Біосинтез рибофлавіну детально вивчався на прикладі непатогенної бактерії *B. subtilis*, яка стала модельним організмом для промислових рибофлавін-продукуючих штамів у зв'язку зі здатністю виділяти за короткий час (68–72 години культивування) продукт безпосередньо в середовище [13].

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

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

асортименту субстратів для виробництва вітаміну з дешевших джерел вуглецю, зокрема таких, як лігноцелюлоза або крохмаль.

Метою роботи було підвищити накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом *B. subtilis* ІМВ В-7797 за допомогою методу хімічного мутагенезу.

### Матеріали і методи

*Об'єктом* дослідження була зміна накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом *Bacillus subtilis* ІМВ В-7797 із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за використання мутагену.

*Умови культивування та середовища.* Для вирощування штаму-продуцента рибофлавіну використовували поживне 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 дм<sup>3</sup>, рН 7,2±0,1. Колонії мікроорганізмів вирощували за температури 38±1°C протягом 72 год. Усі колонії, які виростили на твердих середовищах, відбирали для культивування та перевірки накопичення рибофлавіну. Для вирощування інокуляту використовували середовище такого складу: м'яса – 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 дм<sup>3</sup>. 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 дм<sup>3</sup>. Культивування проводили протягом 72 годин у шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) за температури 38°C та швидкості 240 об/хв (рис. 1).

*Хімічний мутагенез.* Для отримання мутантів методом хімічного мутагенезу добуву культуру *B. subtilis*, вирощену на L-середовищі протягом 24 год, було відцентрифуговано (3000 g) протягом 15 хв. Осаджені клітини промивали стерильним фізіологічним розчином. Клітини після центрифугування переносили на свіже L-середовище, яке містило 50 мкг N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину (NTG). Після інкубації протягом 15, 20, 25, 30, 35 хв клітини відмивали стерильним фізіологічним розчином для видалення залишків NTG. Отримані клони пе-

реносили на середовище L-агар для культивування протягом 48 год.



Рис. 1. Культивування штамів *B. subtilis* у шейкері-інкубаторі.

Через дві доби колонії, навколо яких була найбільша зона з жовтим забарвленням (культури з найбільшою активністю), переносили в пробірки зі скошеним агаром для подальшого культивування.

Визначали вплив мутагену на життєздатність клітин бактерій [14]. Кількість клітин, які виживали, визначали за кількістю колоній штамів, що виростили на середовищі L-агар.

Цитологічні дослідження проводили за допомогою мікроскопа «Laboval 4» («Carl Zeiss», ФРН). Фотографії робили за допомогою фотоапарата «Canon Power Shot A640» (Японія). рН культурального середовища визначали за допомогою рН-метрів рН – 150 в пробі. Ріст штамів-продуцентів рибофлавіну на твердих живильних середовищах оцінювали візуально за наявністю росту та зміною забарвлення середовища у жовтий колір навколо колонії, що свідчить про продукцію рибофлавіну. Кількість синтезованого рибофлавіну визначали за допомогою спектрофотометра Specol 1500 UV VIS (ФРН).

*Статистична обробка даних* була виконана за допомогою програми Microsoft Excel. Усі дослідження проводили в трьох повтореннях. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною за  $P < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Для надання необхідних властивостей штамам-продуцентам вносять зміни в геном мікроорганізмів класичною селекцією, мутагенезом або за допомогою генетичної інженерії [1; 2; 5]. Після таких маніпуляцій з культурою необхідно перевірити життєздатність та стабільність отриманих штамів і біосинтетичну активність накопичення рибофлавіну.

Вихідний штам *B. subtilis* ІМВ В-7797 [15] накопичував 13,9 г/дм<sup>3</sup> рибофлавіну. Для збільшення накопичення рибофлавіну було проведено обробку мутагеном вихідної культури і визначено вплив хімічного мутагенезу на життєздатність клітин бактерій. Кількість клітин, які виживали, визначали за кількістю колоній *B. subtilis*, що виростили на середовищі L-агар.

Життєздатність клітин за дії NTG змінювалася залежно від терміну дії мутагену. За дії NTG в концентрації 50 мкг/дм<sup>3</sup> через 35 хвилин не залишалася жодних життєздатних клітин (рис. 2). Біологічні ефекти від оброблення мутагеном залежали лише від тривалості дії мутагену, всі інші умови досліді (зокрема такі, як фізіологічний стан бактерій, хімічний склад та рН середовища, концентрація мутагену) були незмінними.

Оптимальний час оброблення мутагеном – 30 хв. За час оброблення кількість загинлих бактерій склала майже 99%.

Після висівання живих клітин на середовище L-агар було отримано колонії різного забарвлення та розмірів (рис. 3). Було виділено 16 незалежних клонів *B. subtilis* з різною морфологією:

- типові колонії – світло-жовті;
- неправильної форми та колонії амебоподібної форми жовто-коричневого кольору;
- білі напівпрозорі колонії амебоподібної форми;
- світло-жовті колонії з темно-коричневою серединкою амебоподібної форми.

Розщеплення на типи колоній відбулося у співвідношеннях, показаних на рис. 4.

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

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/дм<sup>3</sup>. Для визначення стабільності культуру пересівали протягом двох місяців з інтервалом два тижні на тверде і рідке середовище з подальшим визначенням кількості накопиченого рибофлавіну. Показник накопичення рибофлавіну не змінювався від пересівів до пересівів.

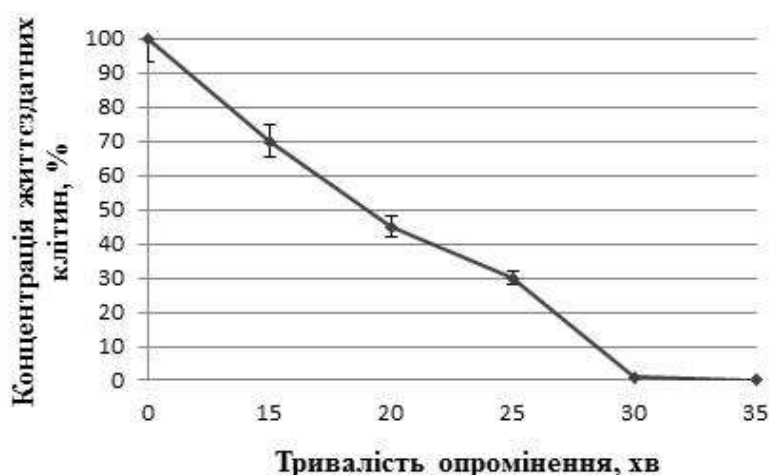


Рис. 2. Життєздатність клітин *B. subtilis* за дії мутагену (тут і далі \* –  $P < 0,05$ . Контролем слугував показник КУО (100%) в неопроміненій бактеріальній суспензії).

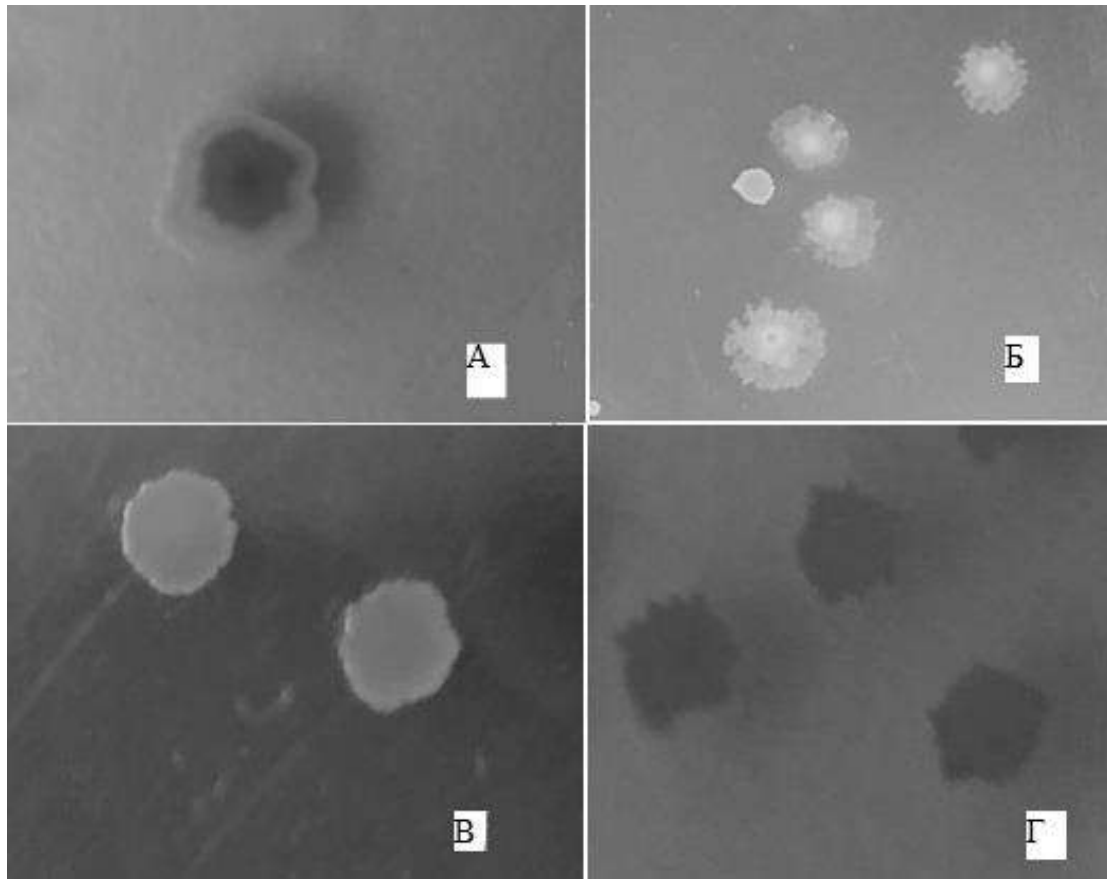


Рис. 3. Вигляд виділених колоній *B. subtilis*: А – світло-жовті колонії з темно-коричневою серединкою амєбоподібної форми; Б – білі напівпрозорі колонії амєбоподібної форми; В – матові колонії – світло-жовтого кольору; Г – неправильної форми та колонії амєбоподібної форми жовто-коричневого кольору.

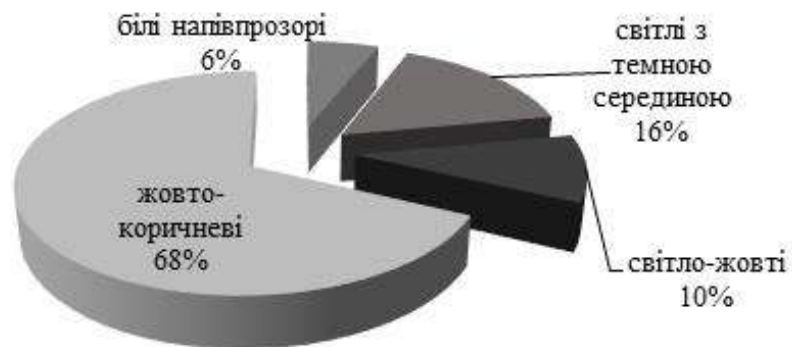


Рис. 4. Співвідношення різних типів колоній *B. subtilis*, які вирости на L-агарі після проведення мутагенезу.

Таблиця. Накопичення рибофлавіну мутантними клонами

№ клону	Пігмент	Кількість рибофлавіну, г/дм <sup>3</sup>
1	Жовто-коричневий	12,6±0,16
2	Жовто-коричневий	13,9±0,35
3	Жовто-коричневий	12,8±0,14
4	<i>Жовто-коричневий</i>	<i>14,8±0,14</i>
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 (вихідний штам)	темно-жовтий	13,9±0,21

### Висновки

Проведено обробку мутагеном вихідної культури і визначено вплив хімічного мутагенезу на життєздатність клітин бактерій. У результаті дії хімічного мутагену на *B. subtilis* IMB B-7797 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/дм<sup>3</sup>), ніж вихідний штам (13,9 г/дм<sup>3</sup>). Штам *B. subtilis* IFBG NTG2 в подальшому пропонується для використання в промисловій технології рибофлавіну і створення на його основі рекомбінантного штаму для надсинтезу рибофлавіну.

*Робота виконувалася за фінансової підтримки НАН України проекту «Створення штамів напро-  
дцентів вторинних метаболітів (амінокислот,  
спиртів, вітамінів)» (№ держреєстрації  
0119U101489).*

### References

1. Revuelta J. L., Ledesma-Amaro R., Lozano-Martinez P., Díaz-Fernández D., Buey R.M., Jiménez A. Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2016. Vol. 44 (4–5). P. 659–665. doi: 10.1007/s10295-016-1842-7.
2. Schwechheimer S.K., Park E.Y., Revuelta J.L., Becker J., Wittmann C. Biotechnology of riboflavin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016. Vol. 100 (5). P. 2107–2119. doi: 10.1007/s00253-015-7256-z.
3. Survase S.A., Bajaj I.B., Singhal R.S. Biotechnological Production of Vitamins. *Food Technology and Biotechnology.* 2006. Vol. 44 (3). P. 381–396.
4. Revuelta J.L., Buey R.M., Ledesma-Amaro R., Vandamme E.J. Microbial biotechnology for the synthesis of (pro)vitamins, biopigments and antioxidants: challenges and opportunities. *Microbial biotechnology.* 2016. Vol. 9 (5). P. 564–567. doi: 10.1111/1751-7915.12379.
5. Lim S.H., Choi J.S., Park E.Y. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famata*: An overview. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 2001. Vol. 6. P. 75–88. doi: 10.1007/bf02931951.
6. You J., Pan X., Yang C., Du Y., Osire T., Yang T., Zhang X., Xu M., Xu G., Rao Z. Microbial production of riboflavin: Biotechnological advances and perspectives. *Metabolic Engineering.* 2021. Vol. 68. P. 46–58. doi: 10.1016/j.ymben.2021.08.009.
7. Stahmann K.P., Revuelta J.L., Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2000. Vol. 53 (5). P. 509–516. doi: 10.1007/s002530051649.
8. Tajima S., Itoh Y., Sugimoto T., Kato T., Park E. Y. Increased Riboflavin Production from Activated Bleaching Earth by a Mutant Strain of *Ashbya gossypii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2009. Vol. 108 (4). P. 325–329. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.04.021.
9. Schmidt G., Stahmann K. P., Kaesler B., Sahn H. Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology.* 1996. Vol. 142. P. 419–426. doi: 10.1099/13500872-142-2-419.

10. Jiménez A., Santos M. A., Pompejus M., Revuelta J. L. Metabolic Engineering of the Purine Pathway for Riboflavin Production in *Ashbya gossypii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71 (10). P. 5743–5751. doi: 10.1128/AEM.71.10.5743-5751.2005.
11. Bacher A., Eberhardt S., Fischer M., Kis K., Richter G. Biosynthesis of vitamin B2 (Riboflavin). *Annu. Rev. Nutr.* 2000. Vol. 20. P. 153–167. doi: 10.1146/annurev.nutr.20.1.153.
12. Massey V. The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochemical Society Transactions*. 2000. Vol. 28 (4). P. 283–296.
13. Averianova L.A., Balabanova L.A., Son O.M., Podvolotskaya A.B., Tekutyeva L.A. Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8. P. 570828. doi: 10.3389/fbioe.2020.570828.
14. Adrio Jose L., Demain Arnold L. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006. Vol. 30 (2). P. 187–214. doi: 10.1111/j.1574-6976.2005.00009.x.
15. Radchenko M.M., Tigunova O.O., Zelena L.B., Beiko N.Ye., Andriash H.S., Shulga S.M. Phylogenetic analysis of the *Bacillus subtilis* IFBG MK-2 strain and riboflavin production by its induced clones. *Cytol Genet.* 2021. Vol. 55 (2). P. 145–151. doi: 10.3103/S0095452721020134.

**RADCHENKO M.M., ANDRIASH H.S., BEIKO N.Y., TIGUNOVA O.O., SHULGA S.M.**

*Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a*

**BACILLUS SUBTILIS STRAIN PRODUCER PREPARATION WITH INCREASED ACCUMULATION OF RIBOFLAVIN**

**Aim.** The increasing of riboflavin accumulation by chemical mutagenesis of *Bacillus subtilis* IMB B-7797 strain producer was the aim of this work. **Methods.** We used the method of treating the strain producer with a chemical mutagen N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine to achieve this goal and followed by culturing the resulting clone and determining the accumulation of riboflavin. **Results.** *B. subtilis* IFBG NTG2 mutant strain producer which differed in morphological characteristics (color, size, colony shape) and riboflavin accumulation from the original culture as a result of chemical mutagen action on *B. subtilis* IMB B-7797 was obtained. **Conclusions.** *B. subtilis* IFBG NTG2 mutant strain producer as a result of action on *B. subtilis* IMB B-7797 by chemical mutagen and which differed in morphological features (color, size, colony shape) and riboflavin accumulation from the original culture. was obtained, *B. subtilis* IFBG NTG2 strain producer, which produced riboflavin amount of 14.8 g/dm<sup>3</sup>, which is 9% more than produced by the original *B. subtilis* IMB B-7797 strain producer was obtained by chemical mutagenesis. *B. subtilis* IFBG NTG2 strain producer is further proposed for use in industrial technology of riboflavin and creation of a recombinant strain producer for synthesis of riboflavin.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, producer strain, riboflavin, chemical mutagenesis.