

УДК 579.61:616-092.7

К ВОПРОСУ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ СЫРЬЕ

Шпичка А.И., Семенова Е.Ф., Кузнецова А.В.

ГОУ ВПО «Пензенский государственный университет», Пенза, e-mail: sef1957@mail.ru

Спектрально-кинетические исследования стабильности рибофлавина в водных растворах препаратов и культуральной жидкости продуцентов свидетельствуют о возможности использования спектрофотометрического метода для мониторинга уровня рибофлавина на разных этапах биотехнологического производства. Экспериментально подтверждена эффективность применения предложенного метода при определении содержания рибофлавина в динамике культивирования штаммов микромицетов

Ключевые слова: методы определения рибофлавина, спектрофотометрия, биотехнологическое сырье

ABOUT RIBOFLAVIN DEFINITION IN BIOTECHNOLOGICAL RAW MATERIAL

Shpichka A.I., Semenova E.F., Kuznetsova A.V.

The Penza State University, Penza, e-mail: sef1957@mail.ru

The opportunity of spectrophotometric method use for riboflavin monitoring at different stages of biotechnological manufacture was testified by spectral-kinetic researches of riboflavin stability in medicine and cultural liquid of an overproducer. The efficiency of method at definition of riboflavin level in dynamics of fungi strains cultivation is experimentally confirmed.

Keywords: methods of riboflavin definition, spectrophotometry, biotechnological raw material

В качестве биообъектов для биотехнологического производства рибофлавина используются микроорганизмы различной таксономической принадлежности, в основном, дрожжи и мицелиальные грибы. У флавиногенных дрожжей индукция рибофлавина происходит при iron starvation депрессии по железу. Аскомицеты *Eremothecium gossypii*, *Ashbya gossypii* (anamorph: *Eremothecium ashbyii*) [9, 10], *Candida famata* [8], *Pichia guilliermondii* [7] также являются продуцентами витамина В₂, который в организме фосфорилируется, превращаясь в коферменты – флавинмононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), участвует в окислительно-восстановительных процессах, входит в состав основных дыхательных ферментов, с помощью которых осуществляется тканевое дыхание. Применение большинства указанных микроорганизмов в промышленных целях позволяет получать биотехнологическое сырье с высоким содержанием витамина.

Развитие современной индустрии биотехнологического производства витаминов требует разработки методов мониторинга биосинтетических процессов. Контролируя концентрацию метаболита, можно не только исследовать биологические основы процесса, но и обеспечить более высокое качество целевого продукта.

Материалы и методы исследования

В работе исследовали штаммы *E. ashbyii* ВКМФ-124, ВКМФ-3009, *E.gossypii* ВКМФ-3276, ВКМФ-3296. Культуры выращивали при 28 °С в колбах емкостью 750 мл с 200 мл питательной среды на

качалке при 150 об./мин в течение 48 ч. Микромицеты культивировали на ферментационных средах (в г/л: глюкоза – 10, пептон – 3, дрожжевой экстракт – 0,5, янтарнокислый натрий – 1,5, мезоинозит – 140 мг), которые готовили на дистиллированной воде (№1) или 1/15 М фосфатном буфере (№2). Количество биомассы учитывали весовым методом после ее отделения от культуральной жидкости и высушивания при 100 °С до постоянной массы. Спектр поглощения и концентрация рибофлавина исследовался на спектрофотометре СФ-103 при длине волны 445 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

Для определения рибофлавина в культуральной жидкости используются различные аналитические методы. Несомненно, наиболее эффективен метод ВЭЖХ. После центрифугирования и отделения осадка определяется концентрация рибофлавина в супернатанте. При этом способе используется спектрофотометрическая детекция пиков при определенных длинах волн, отвечающих 2 максимумам поглощения – 223 и 445 нм. Однако, для серийных определений метод ВЭЖХ оказывается не совсем удобен, так как требует дорогостоящего оборудования и реактивов.

В связи с этим становится актуальной разработка простой и эффективной методики оценки рибофлавина в культуральной жидкости, субстанции и фармацевтическом препарате. Мы предлагаем спектрофотометрический метод контроля уровня рибофлавина, в котором практически отсутствует пробоподготовка – наиболее трудоемкая стадия процесса. При указанной идентификации вещества главную роль играет поло-

жение максимумов светопоглощения и их интенсивность. Положение полос поглощения вещества связано с его химической структурой и является характеристикой его подлинности.

В молекуле рибофлавина $C_{17}H_{20}N_4O_6$ (7,8-диметил-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-тетрагидрокси-пентил]бензо[*g*]птеридин-2,4(3*H*,10*H*)-диона) (рис. 1) наличие развитой системы сопряжения изоаллоксазинового фрагмента обуславливает поглощение в УФ-области, что было использовано нами при исследовании его спектра. Для более объективного качественного анализа целесообразно учитывать и другие факторы, например: расчет отношения оптических плотностей при двух максимумах поглощения.

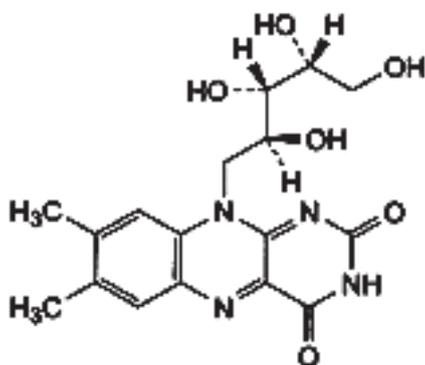


Рис. 1. Химическая структура рибофлавина

Спектр поглощения водного раствора рибофлавина регистрировали на Спектро-

фотометре СФ103 в интервале 210–500 нм в течение 4 суток (рис. 2). В качестве параметров спектра рассчитывали соотношение максимумов поглощения 373/267 и 444/267, как это предлагается в Фармакопее Великобритании (ВР-2007) [6]. При этом максимумы поглощения и соотношение максимумов 373/267 и 444/267 в течение 2 суток соответствовали требованиям ВР-2007 (373/267 – 0,31-0,33, 444/267 – 0,36-0,39). Это свидетельствует о стабильности рибофлавина в растворе и согласуется со сроком хранения экстемпоральных лекарственных форм [4].

Для количественного определения рибофлавина в субстанции был использован спектрофотометрический метод, предложенный Британской Фармакопеей [6]. При этом предлагается рассчитывать концентрацию рибофлавина по удельному поглощению при 444 нм ($E^{1\%}_{1\text{ см}} = 328$).

$$C, \% = \frac{D_{444}}{l \cdot E^{1\%}_{1\text{ см}}}$$

Все анализируемые жидкости (растворы) должны готовиться в склянках темного стекла, так как изоаллоксазиновый фрагмент чувствителен к свету.

Данный метод был апробирован на коллекционных и производственных штаммах продуцентов рибофлавина при различных режимах культивирования. Штаммы *E. ashbyi* и *E. gossypii* продуцируют витамин B_2 (рибофлавин) – до 150 мг/л культуральной жидкости и при этом различаются уровнем флавиногенеза [1].

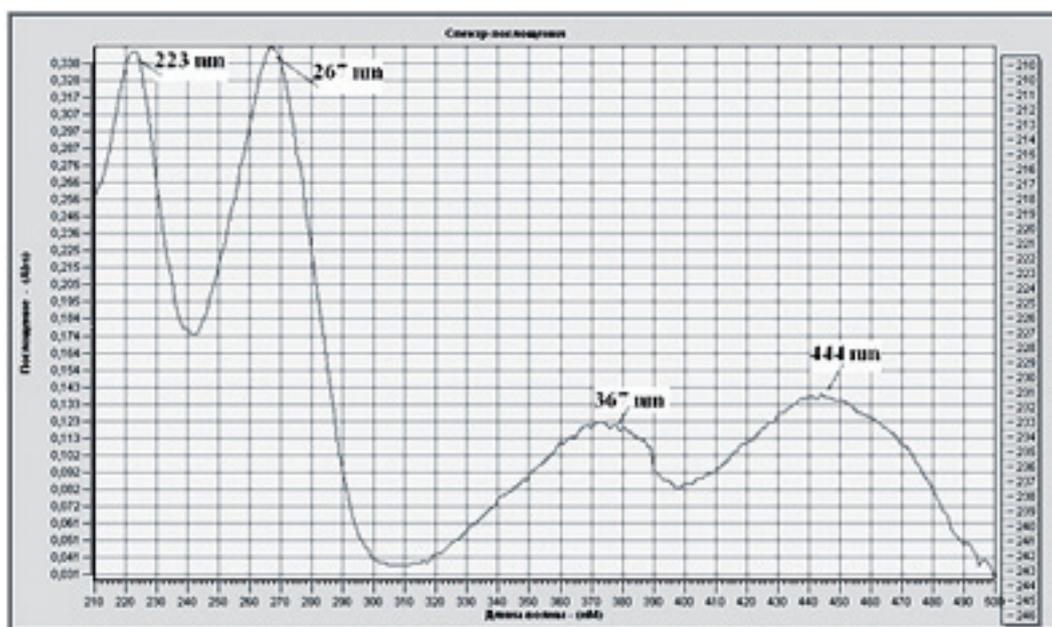


Рис. 2. Спектр поглощения рибофлавина

На рис. 3 представлена динамика накопления вторичного метаболита – рибофлавина культурой *E. ashbyi* в жидких питательных средах, различающихся компонентным составом. Содержание рибофлавина сохраняет тенденцию к увеличению

с возрастанием рН независимо от состава среды. Добавление в среду 0,5 г/л гидрофосфата калия не стимулирует биосинтетическую активность по изучаемому витамину, что согласуется с ранее полученными данными [2, 3, 5].

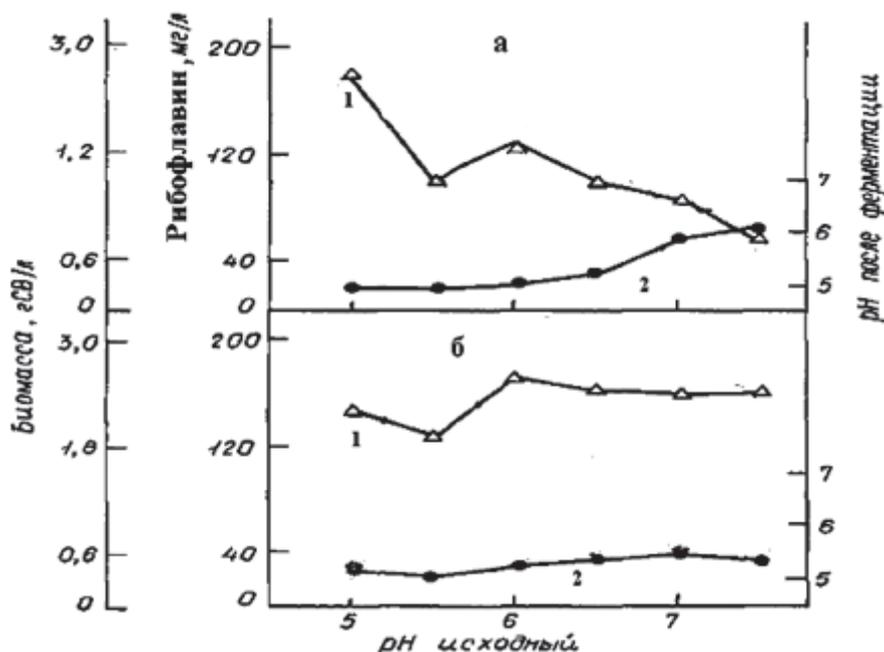


Рис. 3. Динамика накопления рибофлавина и биомассы при глубинном культивировании *E. ashbyi*: а – среда №2; б – среда №1 с 0,5 г/л гидрофосфата калия, 1 – биомасса; 2 – рибофлавин

Каждому максимальному показателю продуктивности гриба (накопление биомассы, синтез рибофлавина) соответствуют определенные значения рН, ионов калия и натрия, что необходимо учитывать при оптимизации условий культивирования.

Выводы

1. Предложен метод спектрально-кинетического исследования содержания рибофлавина в водных растворах фармацевтических субстанций и препаратов, культуральной жидкости продуцентов.

2. Опытные данные свидетельствуют о стабильности рибофлавина в растворе в течение 2 суток, что согласуется со сроком хранения экстемпоральных лекарственных форм.

3. Экспериментально подтверждена эффективность применения спектрофотометрического метода при мониторинге уровня рибофлавина, продуцируемого культурами микромицетов.

Список литературы

1. Бугорский П.С. Влияние ионов водорода, калия и натрия на продуктивность гриба *Eremothecium ashbyi* /

П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова, В.С. Родов // Микробиологический журнал. – 1990. – Т. 52, № 3. – С. 44-47

2. Миронов В.А., Цибульская М.И. Взаимосвязь процессов биосинтеза флавинов и стероидов у *Eremothecium ashbyi* // Прикл. биохимия и микробиология. – 1971. – Т. 7, № 5. – С. 604-606.

3. Миронов В.А., Цибульская М.И. Образование моно-терпенов аскомицетом *Eremothecium ashbyi* // Прикл. биохимия и микробиология. – 1982. – 18, № 3. – С. 343-345.

4. Приказ МЗ РФ №214 от 16.07.97. О контроле качества лекарственных средств, изготавливаемых в аптеках.

5. Цибульская М.И., Миронов В.А. Влияние пропионовой и лимонной кислот на флавиногенез *Eremothecium ashbyi* // Прикл. биохимия и микробиология. – 1973. – 9, №4. – С. 565-568.

6. British Pharmacopeia CD 2007, V.1,2, System Simulation Ltd. (2007).

7. Fedorovich D., Protchenko O., Lesuisse E. Iron uptake by the yeast *Pichia guilliermondii*. Flavinogenesis and reductive iron assimilation are co-regulated processes // Biometals. – 1999. – 12, №4. – P. 295-300

8. Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – 53, №5 – P. 509-516.

9. Tanner FWJ, Vojnovich C, Van Lanen JM: Factors affecting riboflavin production by *Ashbya gossypii* // Bacteriol. – 1949. – 58, №6. – P. 737-745.

10. The yeasts, a taxonomic study. Ed.: C.P. Kurtzman, Jack W. Fell. Fourth edition. – 1998. Elsevier Science. B.V. – P. 201-208.