Л. П. СТРУГОВЩИКОВА

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВІНІВ У КЛІТИНАХ ДРІЖДЖІВ*

Рибофлавін (вітамін B_2) широко розповсюджений в живих істотах. В клітинах частина його знаходиться у формі нуклеотидів — флавінмононуклеотиду (ФМН) і флавінаденіндинуклеотиду (ФАД). Властивості рибофлавіну та його нуклеотидів детально описані в ряді оглядів і монографій (4, 10, 15, 19). Успішне вивчення ролі флавінів в обміні речовин в значній мірі залежить від розробки методів їх визначення, тому за останній час вони стали об'єктом численних досліджень.

Найбільш розповсюдженими методами визначення рибофлавіну є різні модифікації мікробіологічного та флюорометричного методів. Для якісного та кількісного визначення окремих форм флавінів можна застосовувати електрофорез і різні види розподільчої хроматографії. Були запропоновані також колориметричний та полярографічний методи.

У зв'язку з тим, що в літературі описана велика кількість різних модифікацій методів визначення рибофлавіну, більшість дослідників для одержання точних даних порівнює показники декількох методів.

Серед мікроорганізмів, і зокрема дріжджів, були знайдені культури, які в процесі своєї життєдіяльності можуть утворювати і виділяти в середовище значну кількість рибофлавіну (2).

Визначення рибофлавіну в клітинах мікробів — «надсинтетиків» вітаміну B_2 — пов'язане з деякими методичними труднощами, які не зустрічаються при роботі з іншими мікроорганізмами, і тому вимагає більш детальної розробки і вдосконалення.

В даній роботі висвітлюється дослідження деяких методів визначення флавінів і можливість їх застосування для аналізу рибофлавіну та його нуклеотидів в дріжджових клітинах.

Досліди проводили з культурою Candida guilliermondii (ATCC-9058), яка характеризується підвищеним синтезом рибофлавіну. Дріжджі вирощували на синтетичному середовищі Беркхольдера (9) з глюкозою і глікоколом при 30°С. Кількість рибофлавіну визначали флюорометрично на флюорометрі ЕФ-3.

Дріжджі C. guilliermondii синтезують від 400 до 20 000 *мг* рибофлавіну на 1 *г* сухої ваги клітин. Більшу частину його вони виділяють у культуральну рідину. В умовах підвищеного синтезу рибофлавіну частина виділеного вітаміну може викристалізовуватись. При відокремлюванні клітин від культуральної рідини кристали вітаміну попадають у дріжджову масу і заважають визначенню флавінів в клітинах.

---

* Науковий керівник — канд. біол. наук Г. М. Шавловський.

Ми встановили, що кількість кристалічного рибофлавіну може бути досить велика — до 1000 *µг* на 100 *мл* культуральної рідини.

Для його видалення дріжджі промивали рівними порціями розчинів таких солей: 0,15 *М* KH_2PO_4, 0,15 *М* NaCl і 0,03 *М* Na_2HPO_4 з різними значеннями pH.

Як видно з рис. 1, відмивання клітин лужним розчином (pH 7, 8) супроводжується видаленням значно більшої кількості рибофлавіну, ніж кислим (pH 5—6). В той же час зникає кристалічний рибофлавін, що пов'язано з його кращою розчинністю в лужних розчинах (15).

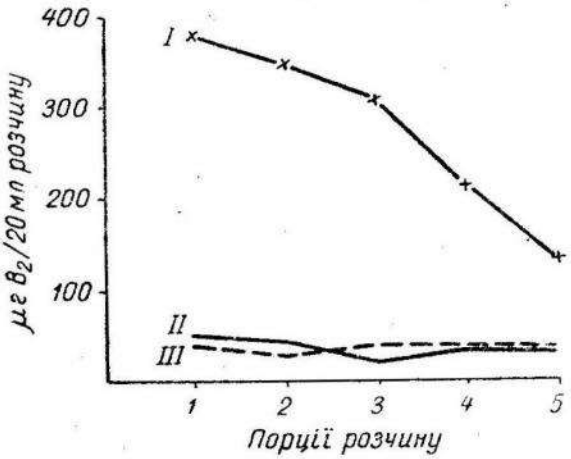

Рис. 1. Відмивання клітин C. guilliermondii розчинами різних солей.

I — 0,03 *М* Na_2HPO_4 (pH 7, 8); *II* — 0,15 *М* KH_2PO_4 (pH 5,0); *III* — 0,15 *М* NaCl (pH 5,8). Культуральна рідина містить кристалічний рибофлавін; для аналізу взято по 1 *г* сирої ваги клітин.

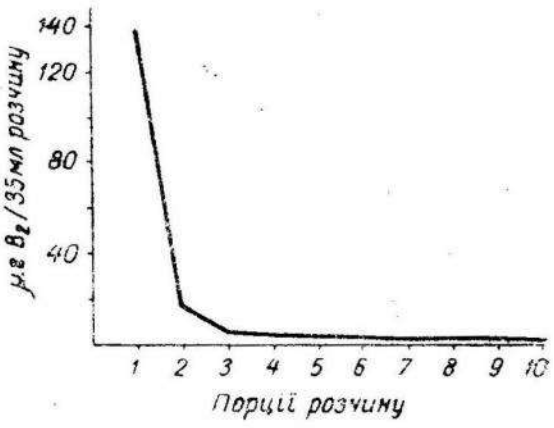

Рис. 2. Відмивання клітин C. guilliermondii 0,15 *М* KH_2PO_4.

Концентрація рибофлавіну в культуральній рідині — 15,96 µ *г*/*мл*; для аналізу взято по 2,5 *г* сирої ваги клітин.

Таким чином, кристалічний рибофлавін можна видалити промиванням клітин лужним розчином, для чого необхідно не менше п'яти порцій розчину солі.

Якщо дріжджі синтезують менше рибофлавіну, відмивання може бути коротшим (рис. 2).

Більш тривале відмивання приводить до екстракції внутріклітинного рибофлавіну і перш за все — вільного рибофлавіну. За допомогою хроматографії на папері було показано, що добре відмиті клітини містять тільки нуклеотидні форми.

1. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ВМІСТУ ФЛАВІНІВ

а) Флюорометричний метод. Цей метод включає такі основні пункти: 1) екстракцію зразка; 2) видалення заважаючих речовин; 3) визначення вітаміну в одержаному екстракті.

В літературі описані різноманітні способи екстракції флавінів з природних джерел. В нашій роботі були використані такі: 45-хвилинна екстракція 0,1 N H_2SO_4 на киплячій водяній бані (1), 15-хвилинна екстракція 5-проц. трихлороцтовою кислотою (ТХОК) на холоду (12), екстракція гарячою дистильованою водою при 80°С (20) і протеоліз за допомогою панкреатину (8).

Одержані екстракти, особливо після протеолізу і екстракції гарячою водою, містять багато речовин, що маскують флюоресценцію рибофлавіну. Для їх видалення зразки обробляли за методом Кошара (1)

$KMnO_4$, $SnCl_2$ і $Na_2S_2O_4$. Після очистки екстракти ставали більш прозорими, проте флюоресценція побічних речовин залишалась все ж таки значною. Якщо клітини утворювали багато порфіринів, які переходять в екстракт, останні вимивали розчином етиловий ефір—оцтова кислота (16).

Для того, щоб визначити, в якій мірі забруднення змінює показники при визначенні флавінів, до досліджуваного зразка після попереднього виміру інтенсивності його флюоресценції додавали відому кількість чистого рибофлавіну, яку визначали флюорометрично. Вводячи відповідний коефіцієнт поправки, визначали вміст рибофлавіну в екстракті за формулою:

$$\frac{F_1-F_3'}{F_2'-F_1}\times C \quad /13/.$$

Досвід роботи показав, що без введення цього коефіцієнта можна допустити при визначенні рибофлавіну велику похибку (більше 30%).

Результати дослідів по визначенню загального вмісту рибофлавіну в клітинах подані в таблиці 1.

Таблиця 1

Визначення загального вмісту рибофлавіну за допомогою різних методів екстракції

№ п. п.	Методи екстракції	Рибофлавін		ФАД	
		мг/1 г сух. в.	%	В мг B_2 на 1 г сух. в.	%
1	0,1 N H_2SO_4, 45-хвилинне кип'ятіння	30,60	89,3	—	—
2	5% ТХОК, 15 хвилин на холоду:				
	а) 10-хвилинне кип'ятіння	28,45	83,2	13,07	46,05
	б) 37°С, 20 год.	28,00	81,8	12,55	45,70
3	Дистильована вода. 3-х по 15 хвилин при 80°С з наступним кип'ятінням в 0,1 N H_2SO_4	34,20	100,0	18,1	53,00
4	Протеоліз з наступним кип'ятінням у 0,1 N H_2SO_4	32,23	94,2	—	—
5	Протеоліз:				
	а) прогрівання при 80°С 15 хв.	32,90	96,2	—	—
	б) кип'ятіння в 0,1 N H_2SO_4 30 хв.	31,80	93,0	—	—

Як видно з таблиці 1, найбільше рибофлавіну було відкрито при екстракції гарячою водою (100%) і після протеолізу (93—96%). Менший процент відкриття відмічаємо при екстракції 0,1N H_2SO_4 і 5% ТХОК.

Для перевірки можливості неповноти розщеплення ФАД проведено гідроліз чистого препарату в 5% ТХОК 10-хвилинним кип'ятінням і витримуванням при 37°С протягом 20 год., а також 30- і 40-хвилинний

гідролів в 0,1 N H_2SO_4 на киплячій водяній бані. Виявилось, що за вказані проміжки часу відбувається повний гідроліз ФАД, що збігається з літературними даними (13).

Виходячи з цього, можна було б припустити, що при екстракції флавінів з клітин за допомогою 0,1 N H_2SO_4 ФАД також повністю гідролізується. Проте послідуюча обробка отриманого екстракту фосфатазою виявила додаткову кількість рибофлавіну (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив фосфатазної обробки на відкриття рибофлавіну після екстракції 0,1 N H_2SO_4

Вміст рибофлавіну в *мг/г* сух. в. клітин		% додатково відкритого рибофлавіну
Без обробки фосфатазою	Обробка фосфатазою	
8,43	10,45	19,3
14,06	22,44	30,4

б) Мікробіологічний метод. За індикаторну культуру при визначенні рибофлавіну використовували Lactobacillus casei. Стандартну криву будували за методом Поволоцької та ін. (7), а також Снелла і Стронга (18).

На рис. 3 показані стандартні криві, одержані за допомогою вказаних вище методів.

Вони свідчать про те, що при однакових концентраціях рибофлавіну ріст L. casei на середовищі, виготовленому за методом Снелла і Стронга, значно кращий, ніж на модифікованому середовищі Поволоцької та ін.

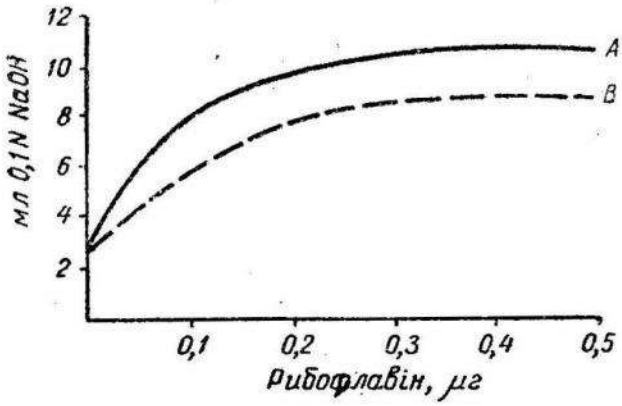

Рис. 3. *A* — стандартна крива, одержана на середовищі Снелла і Стронга. *B* — стандартна крива, одержана на модифікованому середовищі Поволоцької та ін.

Виходячи з літературних даних (11) і результатів власних спостережень, нами було зроблено припущення, що незалежно від наявності в середовищі «В» максимальних кількостей рибофлавіну для відповідного росту бактерій невистачає якихось інших ростових речовин. Додавання до середовища дріжджової води і дріжджового автолізату значно стимулювало ріст мікробів. Ці дані наводять на думку, що при визначенні рибофлавіну в досліджуваних екстрактах із клітин дріжджів може бути неспецифічна стимуляція росту бактерій за рахунок інших, ніж рибофлавін, речовин екстракту, тому можна одержати завищення результатів досліду.

Кількість рибофлавіну, відкритого в клітинах мікробіологічним методом за Снеллом і Стронгом, дещо нижча, ніж при визначенні флюорометричним методом (табл. 3).

Таблиця 3

Порівняння флюорометричних і мікробіологічних визначень рибофлавіну в клітинах дріжджів

Рибофлавін в *мг/г* сух. в.		„а" в % від „в"
Мікробіологічним методом „а"	Флюорометричним методом „в"	
9,59	12,35	78,6
18,83	21,69	86,7

На думку деяких авторів (6), розходження ±20% при порівнянні хімічного та біологічного методів можна вважати цілком допустимим.

2. ВИЗНАЧЕННЯ ОКРЕМИХ ФОРМ ФЛАВІНІВ

Кількість окремих форм флавінів та їх співвідношення визначали флюорометрично безпосередньо в одержаних екстрактах і після їх розділення за допомогою хроматографії на папері (14).

Флавіни екстрагували за методом Бессі та ін. (12), Ягі (20), а також Поволоцької та ін. (8). Як видно з таблиці 1, при екстракції 5% ТХОК відкривається менше ФАД, ніж за допомогою екстракції гарячою водою. При порівнянні результатів визначення флавінів в екстрактах, одержаних шляхом кип'ятіння клітин в 01, N H_2SO_4 і нагрівання в дистильованій воді 80°С, виявилось, що вони не співпадають (табл. 4).

Таблиця 4

Визначення нуклеотидних форм рибофлавіну в клітинах C. gulliermondii

Метод	Вміст нуклеотидних форм рибофлавіну в *мг* B_2 на 1 *г* сух. в.	ФМН		ФАД	
		мг	%	*мг*	%
40-хвилинне кип'ятіння в 0,1 N H_2SO_4 з наступною обробкою фосфатазою	10,45	8,43	80,7	2,02	19,3
Екстракція гарячою водою, з наступним кип'ятінням в 0,1 N H_2SO_4 30 хв.	14,57	3,90	26,8	10,67	73,2

Попередніми дослідами було показано (табл. 2), що в умовах екстракції 0,1 N H_2SO_4 ФАД руйнується повністю або частково. Фосфатазна обробка виявляє меншу частину нуклеотиду, тому за методом Поволоцької та ін. ми одержуємо дуже змінені дані, а саме — більший процент ФМН.

Кількість визначення рибофлавіну та його нуклеотидів і їх співвідношення проводили слідуючим способом Дріжджі суспензували в дистильованій воді до конц. 50—100 *мг* сирої ваги в 1 *мл;* по 1— 2 *мл* відбирали для визначення сухої ваги, і флавіни тричі екстрагували нагріванням на водяній бані при 80°С так, щоб кінцеве розведення було

1 : 40 або 1 : 80. Клітини відокремлювали центрифугуванням, екстракти зливали разом і доводили до мітки. Після цього в частині екстракту визначали: а) загальну кількість рибофлавіну; б) ФАД — після 30-хвилинного гідролізу екстракту в 0,1 N H_2SO_4 по формулі:

$$\text{ФАД} = \frac{B-A}{0{,}86} \quad (13),$$

де B — вміст рибофлавіну після гідролізу ФАД;
A — вміст рибофлавіну до гідролізу ФАД;
0,86 — коефіцієнт поправки в зв'язку з тим, що флюоресценція ФАД до гідролізу становить 14% флюоресценції рибофлавіну, і в) суму вільного рибофлавіну та ФМН по формулі:

$$B_2 + \text{ФМН} = \text{Рибофлав. заг.} - \text{ФАД}$$

Співвідношення ФАД і B_2 + ФМН виражали в процентах.

Другу частину екстракту концентрували під вакуумом при 30—37° і насичували $(NH_4)_2SO_4$. Флавіни екстрагували фенолом, а потім переводили в 0,5—1,0 *мл* дистильованої води.

Певну кількість екстракту («а») наносили на хроматографічний папір і хроматографували в системі *н*-бутанол-оцтова кислота—вода (4 : 1 : 5). Хроматограми підсушували, промивали ефіром для видалення залишків фенолу; плями з флавінами вирізали і елюювали тричі дистильованою водою. Елюати об'єднували, доводили до мітки; ФАД гідролізували в 0,1N H_2SO_4, і після цього зразки визначали на флюорометрі.

В той же час в «а» *мл* фенольного екстракту визначали загальну кількість рибофлавіну і співвідношення окремих форм. Результати досліду наведені в таблиці 5. Вони показують, що істотних змін в співвідношенні окремих форм флавінів після обробки фенолом, а також елюції з хроматограми не відмічаємо.

Таблиця 5

Визначення співвідношення окремих форм флавінів за допомогою різних методів

Досліджуваний розчин	Загальний вміст рибофлавіну в *мг*	ФАД		B_2 + ФМН	
		мг	%	*мг*	%
Вихідний екстракт з 1 *г* сух. в. клітин	38,24	17,08	46,18	21,60	53,82
Фенольний екстракт, 0,2 *мл*	3,55	1,56	43,96	1,99	56,07
Елюат із хроматограми, 0,2 *мл*	3,054	1,26	46,65	1,78	54,35

Елюція флавінів з паперу становить 86%, як і для чистого рибофлавіну, визначення якого проводилось одночасово з досліджуваними зразками. Можливо, це пов'язано з частковою адсорбцією рибофлавіну кусочками хроматографічного паперу.

Порівняння різних модифікацій флюорометричного та мікробіологічного методів показало, що за допомогою перевірених методів в дріжджах відкривається неоднакова кількість рибофлавіну. Причини цих відхилень можуть бути різними. Так, у випадку екстракції ТХОК частина ФАД залишається в клітинах, що приводить до заниження результатів

досліду. Можливо, метод екстракції ТХОК дасть позитивні результати, якщо використати декількаразову обробку клітин кислотою.

Екстракцію 0,1 N H_2SO_4 можна застосувати для визначення загального вмісту рибофлавіну при умові обробки екстракту фосфатазою. Поволоцька та ін. запропонували екстракцію 0,1N H_2SO_4 для визначення ФАД; проте, як показали наші досліди, цей метод пов'язаний із значним гідролізом ФАД. Відомо (15), що флавінаденіндинуклеотид при нагріванні в кислих і лужних розчинах швидко руйнується, тому кількість його краще всього визначати після екстракції флавінів із клітин гарячою водою або холодною ТХОК.

Після протеолізу кількість рибофлавіну не збільшується. Можна думати, що досліджувані дріжджі характеризуються низьким вмістом сукциндегідрогенази, яка, за даними Поволоцької (5), Букіна (3), Сингер і Керні (17) та ін., містить міцно зв'язану з білком форму рибофлавіну. Поволоцька та ін. вважають, що дріжджі та гриби не містять цієї форми рибофлавіну. В той же час Сингер і Керні одержали сукциндегідрогеназу із мітохондрій дріжджів і дослідили, що не всі флавіни, які звільнюються після її протеолізу, можна визначати звичайними методами. Тому питання визначення міцно зв'язаної з білком форми рибофлавіну вимагає дальшого дослідження.

Проведені експерименти дають також можливість сказати, що флюорометричний метод має значну перевагу над мікробіологічним: він більш точний, вимагає значно менше часу і може бути застосований для визначення не тільки загального вмісту рибофлавіну, але і окремих його форм.

ВИСНОВКИ

1. Перевірено п'ять модифікацій флюорометричного методу визначення рибофлавіну в клітинах дріжджів. Найбільша кількість рибофлавіну відкривається при екстракції гарячою водою та після протеолізу.

2. Екстракти флавінів, одержані за допомогою протеолізу і нагрівання клітин при 80°С, вимагають додаткової очистки від побічних речовин.

3. Співвідношення флавінів не можна визначати після екстракції їх в 0,1N H_2SO_4 в зв'язку з гідролізом ФАД.

4. Мікробіологічний метод в порівнянні із флюорометричним дає дещо занижені результати.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биохимия и физиология витаминов, методы определения витаминов, сб. 5. ИЛ, 1952.

2. Бродильные производства. Под ред. Л. А. Андеркофлера и Р. Дж. Хиккея, т. II. Пищепромиздат, М., 1959.

3. Букин В. Н. О новой, прочно связанной с белком форме рибофлавина. Доклад на III Международном биохимическом конгрессе, Брюссель, 1—6 августа, 1955. Изд-во АН СССР, М., 1955.

4. Михлин Д. М. Биологическое окисление. Изд-во АН СССР, М., 1956.

5. Поволоцкая К. Л. «Биохимия», 1953, № 18.

6. Поволоцкая К. Л. и Скоробогатова Е. П. «Биохимия», 1953, № 18.

7. Поволоцкая К. Л., Скоробогатова Е. П. и Зайцева Н. И. Витаминные ресурсы и их использование. Изд-во АН СССР, т. 3, 1955.

8. Поволоцкая К. Л., Зайцева Н. И. и Скоробогатова Е. П. Витаминные ресурсы и их использование. Изд-во АН СССР, т. 3, 1955.

9. Прескот С. и Дэн С. Техническая микробиология. ИЛ. 1952.

10. Труфанов А. В. Биохимия и физиология витаминов и антивитаминов. Сельхозгиз, 1959.
11. Barton-Wright E. C. The microbiological assay of the witamin B-complex and amino acid, L., 1952.
12. Bessey O. A., Lowry O. H. and Love R. H. J. Biol. Chem., 1949, 180(2).
13. Burch H. B., Bessey O. A., Lowry O. H. J. Biol. Chem., 1948, 175(1),
14. Crammer J. Z., Nature, 1948, 161.
15. The Enzymes, sec. edition, ed. by P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck. V. 2, Acad. Press, N.-Y. a. L., 1960.
16. Schaeffer P. Biochim. et Biophys. acta, 1952, 9.
17. Singer T. P., Kearney E. B., Massey V. Advances in enzymology, 1957, 18.
18. Snell E. E. and Strong F. M. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 1939, 11.
19. The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology, ed. by W. H. Sebrell, Jnr. R. S. Harris. v. III, Acad. Press, N.-Y., 1954.
20. Jagi K. Bull. soc. Chim. France, 1957, 11—12.

Л. П. СТРУГОВЩИКОВА

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВИНОВ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

Резюме

Проверено пять модификаций флюорометрического метода определения рибофлавина в клетках дрожжей Candida guilliermondii. Наибольшее количество рибофлавина открывается при экстракции флавинов горячей водой и после протеолиза. Экстракты флавинов, полученные при помощи протеолиза и нагревания клеток при 80°С, требуют дополнительной очистки от посторонних веществ.

Соотношение флавинов нельзя определять после экстракции их в 0,1 н. H_2SO_4 в связи с гидролизом ФАД.

Микробиологический метод по сравнению с флюорометрическим дает несколько заниженные результаты.