



**К.В. Дмитрук, В.Ю. Яцишин,
А.Я. Вороновський, Д.В. Федорович, А.А. Сибірний**

Інститут біології клітини НАН України, Львів

КОНСТРУЮВАННЯ НАДПРОДУЦЕНТІВ РИБОФЛАВІНУ (ВІТАМІНУ В₂) ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA*



Шляхом введення додаткових копій гена позитивного регулятора біосинтезу рибофлавіну (РФ) у геном раніше селекціонованих штамів дріжджів *Candida famata*, здатних до надсинтезу РФ, отримано стабільні дріжджові штам-надпродуценти вітаміну В₂. Підбрано оптимальні середовища та умови культивування для максимального виходу цільового продукту – РФ.

Ключові слова: рибофлавін (вітамін В₂), дріжджі, *Candida famata*, надсинтез, штам-продуценти.

Рибофлавін (РФ) є одним із найважливіших ростових факторів людини і тварин. Добра потреба людини у вітаміні В₂ складає приблизно 2 мг. Дефіцит вітаміну В₂ виникає при інтенсивному рості організму, при вагітності, після тривалого лікування антибіотиками. РФ успішно застосовується при лікуванні мігрені та малярії [1]. Надзвичайно важливою передумовою росту тварин та птахів є достатня забезпеченість кормів вітаміном В₂. Дефіцит РФ у кормових раціонах веде до порушення обміну речовин, затримки росту, погіршення засвоєння амінокислот і жирів, послаблення зору, дерматозів, зниження продуктивності і використання поживних речовин у кормах та їжі. Введення РФ у склад преміксів, комбікормів і кормосумішей для тварин і птиці підвищує їх приріст, покращує виживання молодняка, збільшує продуктивність, знижує затрати кормів на одиницю продукції.

В Україні виробництво препаратів РФ відсутнє. У світі виробляється близько 6,5 тис.

тон РФ. Приблизно 60 % загального виробництва РФ використовується в сільському господарстві як додаток до кормів, решта 40 % – в медицині як компонент полівітамінних сумішей та лікарських препаратів [2, 3]. РФ протягом десятків років синтезують хімічним способом. Проте в останні роки спостерігається заміщення хімічного синтезу РФ біотехнологічним із застосуванням аскоміцетного гриба *Ashbya gossypii*, генно-інженерних штамів бактерії *Bacillus subtilis* та дріжджів *Candida famata* [4, 5, 6, 7]. Мікробний синтез дозволяє заощадити майже половину коштів, зменшити енергетичні затрати та уникнути забруднення навколишнього середовища [8].

Позитивним у виробництві РФ з використанням дріжджів є здатність цих мікроорганізмів рости на простих живильних середовищах, напівпродуктах та відходах харчової промисловості. Крім того, дріжджова біомаса є цінним джерелом збалансованого за амінокислотним складом кормового білка. Серйозним недоліком промислового штаму *C. famata*, який використовувався американською біотехнологічною фірмою Archer Daniels Midland, є його

© К.В. ДМИТРУК, В.Ю. ЯЦИШИН,
А.Я. ВОРОНОВСЬКИЙ, Д.В. ФЕДОРОВИЧ,
А.А. СИБІРНИЙ, 2009



генетична нестабільність і реверсія до штамів, які втрачають здатність до надсинтезу вітаміну B_2 . Створення стабільних дріжджових продуцентів із підвищеною ефективністю синтезу РФ дасть можливість налагодити виробництво препаратів цього вітаміну.

У наших попередніх дослідженнях [9] було ідентифіковано та клоновано ген *SEF1*, що кодує позитивний регулятор біосинтезу РФ дріжджів *C. famata*. З'ясовано, що цей механізм регуляції біосинтезу РФ є універсальним для інших видів дріжджів, здатних до надсинтезу вітаміну B_2 . У даній роботі представлено конструювання високопродуктивного стабільного дріжджового штаму — продуцента РФ — шляхом введення додаткових копій гена *SEF1* та підбір умов для ефективної продукції вітаміну B_2 .

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дріжджі вирощували у колбах та пробірках у багатому середовищі YPD (глюкоза — 20 г/л; пептон — 10 г/л; дріжджовий екстракт — 5 г/л), мінімальному середовищі Беркгольдера (сахароза — 20 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3 г/л або сечовина — 1 г/л; KH_2PO_4 — 0,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 г/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 г/л; біотин — 1 мкг/л; мікроелементи (0,5 мл/л): B^{3+} — 0,01 мг/л, Cu^{2+} — 0,01 мг/л, Mn^{2+} — 0,01 мг/л, Mo^{4+} — 0,01 мг/л, Zn^{2+} — 0,07 мг/л) та в промислових середовищах різного складу на качалці (200 об./хв.) при 28 °С протягом 2–6 діб. Для засіву використовували 1–2-добову культуру дріжджів, вирощену на агаризованому YPD.

Біомасу дріжджів визначали турбідиметричним методом на концентраційному фотоелектричному колориметрі КФК-2МП ($\lambda = 540$ нм, кювета — 3 мм), розраховуючи суху вагу за калібрувальною кривою. Вміст флавінів у культуральній рідині визначали флуориметрично на флуориметрі Turner Quantech Digital Fiiter Fluorometere FM109510-33, використовуючи як стандарт синтетичний РФ.

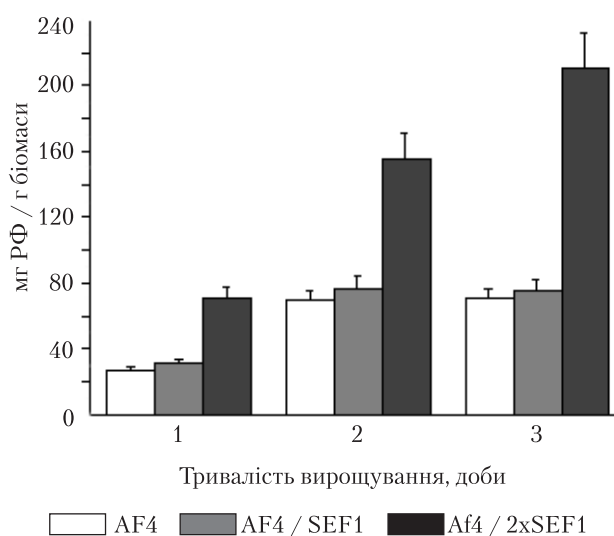
Електротрансформацію дріжджів *C. famata* проводили, як описано раніше [10]. Виділення

сумарної ДНК із клітин *C. famata* здійснювали за допомогою комерційного набору DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Німеччина). Виділення та очистку плазмідної ДНК, підготовку та трансформацію компетентних клітин *E. coli*, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюцію фрагментів ДНК з агарозного гелю, розщеплення ДНК рестриктазами, дефосфорилювання “липких” кінців ДНК, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК, ампліфікацію фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) здійснювали згідно з [11]. При ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР використовували синтетичні олігонуклеотидні праймери фірми “IDT Technologies” (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Конструювання стабільного надсинтетика РФ полягало у введенні додаткової копії гена *SEF1 Debaryomyces hansenii* у геном штаму AF4 *C. famata*, селекціонованого в нашій лабораторії за допомогою класичного мутагенезу колекційного штаму *C. famata* ВКМ Y-9, та використанні селективних середовищ [12]. Відбір флавіногенного штаму методами класичної селекції включав 6 етапів. Як мутаген використовували ультрафіолет, нітрозогуанідин та етилметансульфонат. Протягом кожного етапу селекції перевіряли здатність відібраних флавіногенних мутантів до росту в середовищі з етанолом як єдиним джерелом вуглецю та енергії і відбирали для подальшого покращення лише ті штами, які здатні утилізувати етанол. Це давало можливість уникнути небезпеки реверсії флавіногенних штамів за ознакою здатності рости на етанолі, що корелює у промислового продуцента РФ, штаму АТСС 20849, із втратою здатності до надсинтезу вітаміну B_2 . Найбільш флавіногенним серед перевірених виявився штам AF4, що нагромаджував до 688 мг РФ/л за 4 доби культивування в колбах на круговій качалці при 200 об./хв.

Для ведення в геном мутанта AF4 додаткової копії гена *SEF1 D. hansenii* його трансфор-



Продуктивність флавіногенезу штамів AF4, AF4/SEF1, AF4/2xSEF1

мували плазмідую рTDhSEF1 [9], що містила, окрім гена *SEF1*, ген *ble Staphylococcus aureus*, котрий забезпечує резистентність до флеоміцину. Відбирали штами, здатні до росту на селективному середовищі, і за допомогою ПЛР підтверджували наявність у них плазміди.

Нами було відібрано штам AF4/SEF1, який нагромаджує при вирощуванні в колбах у цукрово-мінеральному середовищі більше 1 г РФ/л (див. рисунок). Цей штам отримав назву *Candida famata* IMB Y-5034 [12]. Продуктивність флавіногенезу (кількість утвореного РФ в перерахунку на одиницю біомаси) сконструйованого штаму *C. famata* IMB Y-5034 на 3-ю добу культивування у 3 рази вища, ніж у вихідного штаму *C. famata* AF4. Продуктивність біосинтезу РФ у промислового штаму *C. famata* ATCC 20849 при вирощуванні у такому ж середовищі не перевищує 30 мг РФ/г біомаси.

Проведено аналіз стабільності за ознакою «надсинтез РФ» у отриманого штаму. Як контрольні були використані штами *C. famata* IMB Y-5033 та AF4. Частота реверсії для раніше отриманого штаму — надсинтетика РФ *C. famata* IMB Y-5033 становить $13,8 \times 10^{-6}$, а штаму AF4 — $0,4 \times 10^{-6}$. Сконструйований штам *C.*

famata IMB Y-5034 характеризується високою стабільністю: після 14 днів культивування він не утворює нефлавіногенних клонів, здатних до утворення білих, великих за розміром, колоній при рості на середовищі з етанолом.

З метою підвищення флавіногенної активності отриманого рекомбінантного штаму в його геном було введено другу додаткову копію гена *SEF1* дріжджів *D. hansenii*. Введення генетичної інформації у геном реципієнта вимагає селективного маркера, завдяки якому можна відібрати відповідні рекомбінантні штами. Для цього було сконструйовано плазмиду, яка містить новий домінуючий селекційний маркер для *C. famata* — ген *IMH3 D. hansenii*, що кодує інозинмонофосфат дегідрогеназу і визначає стійкість до мікофенолової кислоти [13].

Сконструйованою плазмідую трансформували кращий наявний штам — продуцент РФ *C. famata* IMB Y-5034 (AF4/SEF1). З окремих колоній отриманих трансформантів виділяли сумарну ДНК та аналізували її за допомогою ПЛР-аналізу на наявність селективного маркера — гена *IMH3*. В результаті було відібрано штам AF4/2xSEF1, в геномі якого міститься щонайменше дві копії гена *SEF1 D. hansenii*. У штаму AF4/2xSEF1 визначали рівень синтезу РФ та вираховували продуктивність флавіногенезу. Виявлено, що за продуктивністю синтезу РФ сконструйований штам перевищує вихідний штам AF4/SEF1 на 25% (див. рисунок).

Було досліджено флавіногенну активність низки рекомбінантних штамів, похідних AF4, які містили додаткову копію гена *SEF1*, при вирощуванні у середовищах різного складу (табл. 1). Найкращий ріст та нагромадження РФ дослідженими рекомбінантними штамами — похідними AF4, які містили додаткову копію гена *SEF1*, — забезпечувало середовище, що містило 0,5 % дріжджового екстракту. Максимальний вихід РФ (більше 1 г/л) спостерігався на 5-у добу вирощування. При цьому продуктивність флавіногенезу штамів, що містили додаткову копію гена *SEF1*, була в 2,5 рази вищою, ніж у штаму-реципієнта AF4.



Таблиця 1

Флавіногенна активність рекомбінантних штамів (похідних AF4), які містять додаткову копію гена *SEF1*, вирощених у середовищах різного складу (5 діб вирощування)

| Штам | СБ | | | СБ + 0,5% YE | | | YPD | | |
|------|-------------------|-------|-------|-------------------|---------------|-------|-------------------|-------|-------|
| | Біомаса, мг/мл | РФ | | Біомаса, мг/мл | РФ | | Біомаса, мг/мл | РФ | |
| | | мг/л | мг/г | | мг/л | мг/г | | мг/л | мг/г |
| AF4 | 1,23 | 107,7 | 87,6 | 5,93 | 528,6 | 89,1 | 7,16 | 375,8 | 52,5 |
| № 1 | 1,36 | 281,1 | 207,2 | 5,71 | 1176,8 | 206,2 | 3,37 | 464,4 | 137,6 |
| № 8 | 1,17 | 267,0 | 228,8 | 5,27 | 1189,9 | 225,9 | 5,08 | 909,3 | 179,1 |
| № 11 | 0,91 | 279,6 | 305,7 | 4,95 | 930,4 | 187,9 | 5,74 | 698,4 | 121,7 |
| № 12 | 0,88 | 277,1 | 313,7 | 5,49 | 1210,4 | 220,6 | 5,20 | 600,2 | 115,3 |

Таблиця 2

Нагромадження РФ (мг) штамом № 12 (AF4/SEF1) *S. fatata* у середовищах із різними джерелами азоту

| Органічне джерело | Неорганічне джерело | | | |
|--------------------|---------------------|---|--|----------------|
| | Немає | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,3 % | (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,3 % | Сечовина 0,1 % |
| YE, 0,5 % | 958,9 | 1295,5 | 1173,1 | 1377,1 |
| Пептон, 0,2 % | 326,4 | 754,9 | 622,3 | 999,7 |
| Сушло зернове, 1 % | 7,5 | 262,7 | 242,1 | 652,9 |
| Немає | — | 149,4 | 40,6 | 469,2 |

Нагромадження РФ в культурі залежало від джерела азоту. Максимальний вихід РФ для штаму № 12 (AF4/SEF1) отримано при вирощуванні в середовищі, що містило 0,5 % дріжджового екстракту та 0,1 % сечовини — 1377 мг/л (табл. 2). Флавіногенна активність штаму № 12 (AF4/SEF1) була нижчою при використанні відходів та напівпродуктів харчової промисловості (браги, сусла, меляси) та діамонію фосфату у різних співвідношеннях. Для рекомбінантного штаму AF4/2xSEF1, що містить дві копії гена *SEF1*, максимальний вихід РФ спостерігався і при вирощуванні в середовищі, що містило 0,5 % дріжджового екстракту.

Було досліджено також вплив концентрацій окремих компонентів середовища на синтез РФ сконструйованими штамми з використанням методів математичного планування експериментів (аналіз Плакета–Бермана). Додавання до середовища на 50 % вищої концентрації сахарози, іонів

марганцю, кобальту та цинку приводило до зростання флавіногенезу на 25, 20, 11 та 6 % відповідно. Підвищені концентрації іонів калію, заліза та міді знижують флавіногенну активність досліджуваних трансформантів на 9–17 %.

ВИСНОВКИ

За допомогою методів класичної та молекулярної генетики нами було сконструйовано штам-продуценти РФ, які мають втричі вищу продуктивність біосинтезу вітаміну B₂ внаслідок введення додаткових копій гена позитивного регулятора біосинтезу РФ *SEF1* у геном раніше селекціонованого штаму, здатного до надсинтезу РФ. Підбрано умови максимального виходу цільового продукту — РФ при вирощуванні сконструйованих штамів у лабораторних умовах. Отримані штамми мають найвищу продуктивність флавіногенезу з усіх відомих на сьогодні дріжджових надсинтетиків РФ.





Згідно з договором між Інститутом біології клітини НАН України і ЗАТ «Ладжин» Вінницької обл., який передбачає масштабування культивування продуцента, розпочато опрацювання технології промислового виробництва та очистки препарату вітаміну В₂. Забезпечення високих виходів біомаси при вирощуванні у ферментерах дасть змогу налагодити економічно вигідне виробництво вітаміну В₂.

ЛІТЕРАТУРА

1. Powers H.J. Riboflavin (vitamin B-2) and health // Amer. J. Clin. Nutr. — 2003. — Vol. 77. — P. 1352–1360.
2. Vandamme E.J., Soetaert W. 2006. Personal care products via fermentation and biocatalysis processes. In: Biotechnology in Personal Care. Lad, R. (ed.). New York, USA: Taylor and Francis. — P. 27–56.
3. Sanchez S., Demain A. Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites // Microbial Biotechnology. — 2008. — Vol. 1, № 4. — P. 283–319.
4. Stahmann K.P., Revuelta J.L., Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production // Microbiol. and Biotechnol. — 2000. — Vol. 53, № 5 — P. 509–516.
5. Lim S.H., Choi J.S., Park E.Y. Microbial Production of Riboflavin Using Riboflavin Overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: An Overview // Biotechnol. Bioprocess Eng. — 2001. — Vol. 6. — P. 75–88.
6. Сибірний А.А., Федорович Д.В., Борецький Ю.Р., Воронівський А.А. Мікробний синтез флавінів. Київ: Наукова думка, 2006. — 253 с.
7. Survase S.A., Bajaj I.B., Singhal R.S. Biotechnological Production of Vitamins // Food Technol. Biotechnol. — 2006. — Vol. 44, № 3. — P. 381–396.
8. Karos M., Vilarino C., Bollschweiler C., Revuelta J.L. A genome-wide transcription analysis of a fungal riboflavin overproducer // J. Biotechnol. — 2004. — Vol. 113. — P. 69–76.
9. Dmytruk K.V., Voronovsky A.Y., Sibirny A.A. Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments // Curr. Genet. — 2006. — Vol. 50, № 3. — P. 183–191.
10. Voronovsky A, Abbas C.A., Fayura L.R. et al. Development of a transformation system for the flavinogenic yeast. *Candida famata* // FEMS Yeast Res. — 2002. Vol. 2, № 3. — P. 381–388.
11. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
12. Патент України на корисну модель № 36164 від 10.10.2008 р., бюл. № 19.
13. Hyle J.W., Shaw R.J., Reines D. Functional distinctions between IMP dehydrogenase genes in providing mycophenolate resistance and guanine prototrophy to yeast // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, № 31. — P. 28470–28478.

К.В. Дмитрук, В.Ю. Яцишин,

А.Я. Воронівський, Д.В. Федорович, А.А. Сибірний

КОНСТРУИРОВАНИЕ СВЕРХПРОДУЦЕНТОВ РИБОФЛАВИНА (ВИТАМИНА В₂) ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA FAMATA*

Путем введения дополнительных копий гена позитивного регулятора биосинтеза рибофлавина (РФ) в геном селекционированных ранее штаммов дрожжей *Candida famata*, способных к сверхсинтезу РФ, получены стабильные дрожжевые штаммы-сверхпродуценты витамина В₂. Подобраны оптимальные среды и условия культивирования для максимального выхода целевого продукта — РФ.

Ключевые слова: рибофлавин (витамин В₂), дрожжи, *Candida famata*, сверхсинтез, штаммы-продуценты.

K.V. Dmytruk, V.Y. Yatsyshyn,

A.Y. Voronovsky, D.V. Fedorovich, A.A. Sibirny

CONSTRUCTION OF RIBOFLAVIN (VITAMIN В₂) OVERPRODUCERS OF THE YEAST *CANDIDA FAMATA*

The stable riboflavin (RF) overproducers were isolated by means of amplification of the gene encoding positive regulator of RF synthesis into selected earlier *C. famata* flavinogenic strains. The medium components and cultivation conditions were optimized for maximal accumulation of product (RF).

Key words: riboflavin (vitamin В₂), yeast, *Candida famata*, oversynthesis, overproducers.

Надійшла до редакції 17.04.09.

