

## АНАЛІЗ ПРОДУЦЕНТІВ ВІТАМІНУ В<sub>12</sub> ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

Гук К.Р.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, [guk.karina@iit.kpi.ua](mailto:guk.karina@iit.kpi.ua)

Вітамін В<sub>12</sub>, також відомий як ціанокобаламін, структурно належить до сімейства кобаламінових сполук, які складаються з коринового кільця і верхнього та нижнього ліганду. Кобаламін синтезується за двома механізмами: аеробним (за участю генів *cob* у бактерій роду *Pseudomonas*) та анаеробним (за участю генів *cbi*, присутніх у бактерій з роду *Bacillus* та *Salmonella*). Представники бактерій роду *Propionibacterium* потребують як анаеробних, так і аеробних умов (геном цих бактерій має гени *cbi* і *cob*) для ефективного синтезу вітаміну В<sub>12</sub>.

Найбільш ефективними продуцентами вітаміну В<sub>12</sub> є представники роду *Propionibacterium*. Природні штами бактерій продукують 1,0—8,5 мг/л, в той час як мутантні штами *Propionibacterium freudenreichii* синтезують до 206 мг/л кобаламіну.

Для оптимізації промислового виробництва ціанокобаламіну з метою створення високопродуктивних штамів зазвичай використовується мутагенез. Як правило, мутагенез здійснюється шляхом використання фізико-хімічних мутагенів та відбором штамів з практичними перевагами, такими як продуктивність, генетична стабільність, ефективні темпи росту та стійкість до високих концентрацій токсичних проміжних продуктів, присутніх у середовищі.

Структурні гени, необхідні для біосинтезу кобаламіну є мішенями для здійснення надмірної експресії генів з метою підвищення продукування цільового продукту. Так, для рекомбінантного штаму *P. freudenreichii*, який містить вектор експресії з генами *cobA*, *cbiLF* або *cbiEGH*, виробництво вітаміну В<sub>12</sub> збільшується в 1,7-, 1,9- та 1,5 рази відповідно, порівняно з *P. freudenreichii*, що містить вектор рРК705. Рекомбінантний штам *P. freudenreichii* IFO12426, отриманий шляхом конструювання векторів експресії з родинними генами *cob* та *cbi*, дозволяє підвищити вміст вітаміну В<sub>12</sub> до 1,46 мг/л.

Нещодавні дослідження виявили можливість використання нових продуцентів для промислового виробництва кристалічного кормового вітаміну В<sub>12</sub>. Так, *Streptomyces olivaceus*, який використовувався первинно для виробництва антибіотиків, продукує вітамін В<sub>12</sub> в якості побічного продукту. Збільшення виходу вітаміну (до 3 мкг/мл) досягається додаванням іонів Со<sup>2+</sup> та різних азотистих поживних речовин, таких як соєвий шрот.

*Pseudomonas denitrificans* є основним продуцентом вітаміну В<sub>12</sub> в промислових масштабах. Компанія Aventis (лідер виробництва вітаміну В<sub>12</sub>) використовує мутантний штам *P. denitrificans* для промислового виробництва кобаламіну. Поєднання генної інженерії з супутніми процедурами мутагенізації дозволило вченим з Rhône-Poulenc-Rorer отримати штам *P. denitrificans*, що продукує вітамін В<sub>12</sub> до 300 мг/л. Така продуктивність була досягнута шляхом

ампліфікації восьми генів оперону *cobF–cobM*, що призвело до 30% збільшення продукції кобаламіну. Подальше посилення біосинтезу метаболіту (на 20%) стало можливим за рахунок збільшення копій генів *cobA* і *cobE*.

З економічної точки зору, штам *Pseudomonas sp. PCSIR-B-99* є одним із найбільш перспективних, оскільки має здатність використовувати метанол як джерело вуглецю та володіє високим виходом вітаміну B<sub>12</sub> на модифікованому базальному середовищі. Максимум вироблення вітаміну B<sub>12</sub> (до 350 мг/л) спостерігався в середовищі, що містить 3,5% (об/об) метанолу, 1,0 мг/л Co<sup>2+</sup> і 200 мг/л ДМВ. Однак біосинтез кобаламіну у цього штаму ускладнений через тривалий процес ферментації (до 180 год) та відсутність відповідних генетичних методів для штамової інженерії.

Таким чином, виробництво вітаміну B<sub>12</sub> відбувається шляхом мікробного синтезу в основному продуцентами *P. denitrificans* (до 60 мг/л) і *P. freudenreichii* (до 206 мг/л). Серед досліджених продуцентів ціанокобаламіну найбільш доцільним для виробництва ціанокобаламіну в промислових масштабах є *Propionibacterium CICC 10019*, оскільки штам володіє високою продуктивністю (до 59 мг/л кобаламіну), є генетично стабільним та дозволяє одночасно продукувати як пропіонову кислоту, так і вітамін B<sub>12</sub> при використанні поживного середовища багатого на глюкозу в процесі ферментації.

### Список використаної літератури:

1. Piwowarek K, Lipińska E, Hać-Szymańczuk E, Kieliszek M, Ścibisz I. *Propionibacterium* spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(2):515-538.
2. Piwowarek, Kamil et al. "Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82." *Antonie van Leeuwenhoek* vol. 111,6 (2018): 921-932.
3. Piao Y, Yamashita M, Kawaraichi N, Asegawa R, Ono H, Murooka Y. Production of vitamin B12 in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. *J Biosci Bioeng.* 2004;98:167–73.
4. Balabanova, Larissa et al. "Microbial and Genetic Resources for Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthesis: From Ecosystems to Industrial Biotechnology." *International journal of molecular sciences* vol. 22,9 4522. 26 Apr. 2021,
5. Hall H.H, Benedict R.G., Wiesen C.F., Smith C.E., Jackson R.W. Studies on vitamin B12 production with *Streptomyces olivaceus*. *Appl Microbiol.* 1953;1(3):124-129.
6. Blanche F, Cameron B, Crouzet J, Debussche L, Thibaut D, Vuilhorgne M, Lepper FJ, Battersby AR. Vitamin B12: how the problem of its biosynthesis was solved. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1995;34:383–411.
7. Riaz, M.; Ansari, Z.A.; Iqbal, F.; Akram, M. Microbial production of vitamin B12 by methanol utilizing strain of *Pseudomonas* species. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.* 2007, 40, 5–10.