

СТВОРЕННЯ НАДПРОДУЦЕНТІВ РИБОФЛАВІНУ ШЛЯХОМ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ІЗОЦИТРАТЛІАЗИ *EREMOTHECIUM GOSSYPII*

Шопова З.С., Поліщук В.Ю.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, zssshopova@gmail.com



Abstract

Eremothecium gossypii, a filamentous hemiascomycete, is a natural overproducer of riboflavin, which protects its spores from UV radiation. Riboflavin acts as an antioxidant and a precursor for flavoenzymes, crucial for eukaryotic growth and metabolism. Optimizing its cultivation and selecting robust strains through mutagenesis and antimetabolite influence are vital for enhancing productivity.

Keywords: *Eremothecium gossypii*, riboflavin, itaconate, mutagenesis, antimetabolite.

Вступ. Міцеліальний гриб *Eremothecium gossypii* відомий своєю здатністю продукувати значні кількості водорозчинного вітаміну В₂, який також називається рибофлавін [1]. Безумовна необхідність рибофлавіну для живих організмів полягає у нейтралізації вільних радикалів, які утворюються під час ультрафіолетового випромінювання за рахунок взаємодії електромагнітних хвиль з біологічними молекулами, особливо ДНК [2]. Окрім антиоксидантної активності, яка допомагає грибу захищати спори від шкідливої дії ультрафіолету, вітамін В₂ бере участь в окисно-відновних реакціях в якості прекурсора флавокоензимів флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), що функціонують як міцно зв'язані простетичні групи дегідрогеназ. В таких біохімічних реакціях ізоалоксазинове кільце рибофлавіну стає проміжним переносником атомів Н⁺, які відщеплюються від молекули субстрату. Рибофлавін займає важливе місце в реакціях бета-окиснення жирних кислот; дезамінування амінокислот, а отже – є необхідним складовим в ліпідному, вуглеводному та білковому обміні. Звідси випливає, що вітамін В₂ є надважливим фактором росту та розвитку еукаріотів.

Світовий ринок вітаміну В₂ за останні майже 20 років виріс більше ніж удвічі і зараз складає близько 3000 т/рік. Проте удосконалення технології отримання та підвищення виходу рибофлавіну є актуальною задачею на сьогодні, оскільки в порівнянні з хімічним методом, ферментація є більш екологічним та економічним способом отримання вітаміну В₂ за рахунок відсутності складних стадій синтезу за використанням агресивних реагентів та жорстких умов проведення реакції у хімічному синтезі [3].

Одним із способів збільшення ефективності технології отримання рибофлавіну є модифікація продуцента з метою покращення його характеристик. Існує кілька основних методів створення надпродуцентів у промисловому виробництві: направлений мутагенез, генетична інженерія, тощо.

Метою даної роботи є пошук оптимальних умов для проведення мутагенезу та відбору штамів *E. gossypii* шляхом додавання антиметаболіту ізоцитратліази ітаконату до поживного середовища; дослідження продукції

рибофлавіну в порівнянні з вихідним штамом для оцінки ефективності процесу мутагенезу.

Матеріали та методи. Аналіз проводився на основі опублікованих наукових робіт у сфері створення надпродуцентів рибофлавіну *E. gossypii* шляхом вирощування модифікованих штамів на поживних середовищах з додаванням антиметаболітів ізоцитратліази. Було використано системний підхід до аналізу інформації з вивченням біохімічних процесів досліджуваного організму на основі опублікованих статей у базах даних PubMed Central®, NCBI та Microbiology Society.

Результати та обговорення. Важливим етапом створення надпродуцентів є відбір перспективних штамів, який може здійснюватися шляхом посіву на модифіковане середовище зі специфічною сполукою, що повинна пригнічувати ріст колоній без бажаної характеристики. Особливу цікавість представляє використання антиметаболітів для відбору більш активних штамів.

Початок створення мутантних штамів включає опромінення спор *E. gossypii* ультрафіолетовим випромінюванням, після чого проводиться посів на спеціально підготовлені агаризовані середовища з додаванням ітаконату. Утворені колонії, які мають характерне жовте забарвлення, свідчать про продукцію рибофлавіну, і вони далі піддаються культивуванню на середовищі з високим вмістом ліпідів за умов лімітування по джерелу карбону, внаслідок чого відбувається підвищений синтез рибофлавіну.

Ізоцитратліаза КФ 4.1.3.1 – фермент, що відноситься до класу ліаз. Відповідає за розщеплення проміжного продукту циклу трикарбонових кислот ізоцитрату на сукцинат та гліюксилат (рис. 1).

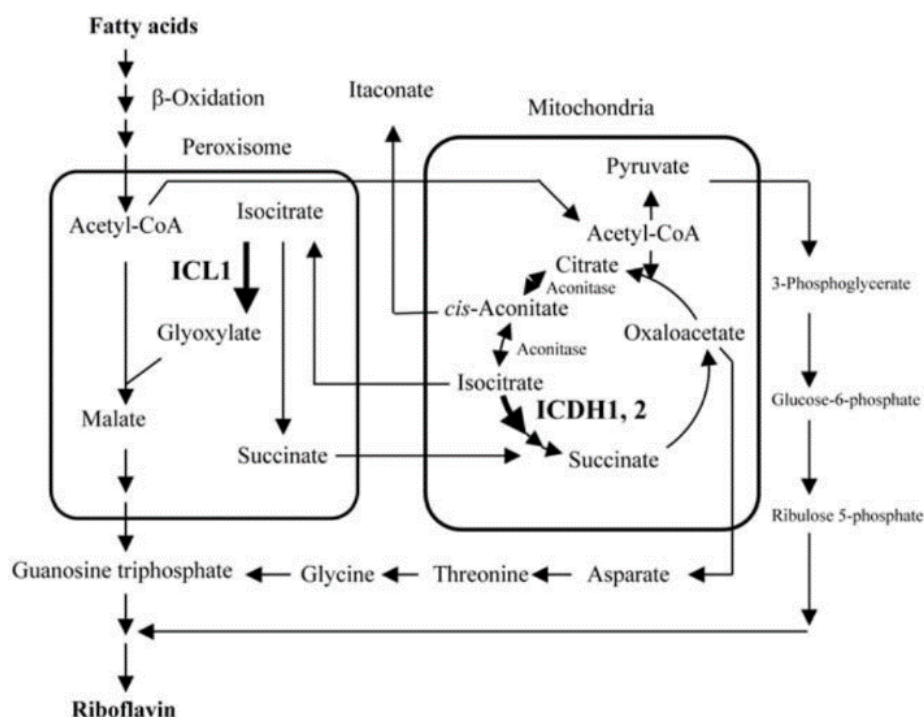


Рис. 1. Один з можливих варіантів впливу ізоцитратліази на біосинтез рибофлавіну [4]

Антиметаболіти ізоцитратліази, а саме ітаконат та оксалат, здатні інгібувати її активність, а мутанти, стійкі до ітаконату, виробляють підвищені рівні рибофлавіну завдяки перенаправленню потоку карбону з циклу Кребса через гліюксилатний шунт. Цей перерозподіл стає можливим завдяки використанню рослинної олії як єдиного джерела вуглецю. Ізоцитратліаза здатна каталізувати розщеплення ізоцитрату до гліюксилату та сукцинату, що забезпечує відведення ізоцитрату через карбон-зберігаючий шлях і, відповідно, захищає його від використання у циклі Кребса. Оскільки попередниками рибофлавіну є ГТФ, гліюксилатний шунт відіграє важливу роль у біосинтезі вітаміну В₂ через виведення продуктів діяльності ізоцитратліази з циклів перетворення вуглеводів.

Метод створення надпродуцента вітаміну В₂ у дослідженні з *E. gossypii* при культивуванні стійкого до ітаконату мутанта на соєвій олії, дозволив збільшити специфічну активність ферменту ізоцитратліази на 15% та збільшення виходу рибофлавіну в 25 разів порівняно з диким штамом. З іншого боку, експерименти з ростом на глюкозі призвели до восьмикратного збільшення виходу рибофлавіну, але показали зменшення специфічної активності ізоцитратліази на 33%. Ці результати підтверджують ідею про те, що ізоцитратліаза займає одне з ключових місць при надсинтезі рибофлавіну продуцентом *E. gossypii*, коли в якості субстрату використовується рослинна олія [5].

При дослідженні штаму *E. gossypii*, що був оброблений N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином та мав підвищену активність каталази і стійкість до перекису водню, було визначено, що активність ізоцитратліази у мутантного штаму була вищою в 2,6 рази у порівнянні з диким штамом. Це свідчить про більш ефективне використання вуглецевого потоку від циклу трикарбонних кислот до гліюксилатного, що призводить до підвищеного виробництва рибофлавіну. Крім того, мутант проявив вшестеро вищу специфічну активність каталази всередині клітин після 3 діб культивування. У присутності 40 мМ пероксиду водню виробництво рибофлавіну зменшилося лише на 16% для мутанта, тоді як для дикого штаму воно спадало на 56 % [6].

В іншому дослідженні, стійкий до оксалату штам гриба *E. gossypii* був природно виявлений серед спор, вирощених на середовищі з додаванням оксалату на оптимізованому для підвищення виробництва рибофлавіну середовищі. Виробництво рибофлавіну стійким до антиметаболіту штамом було втричі вище, ніж у дикого при культивуванні у колбах. Після оптимізації складу середовища, вихід рибофлавіну збільшився до 5 г/л, що в п'ять разів вище, ніж у дикого штаму [7].

У випадку пригнічення інших ферментів, що беруть участь у гліюксилатному циклі, наприклад, малатсинтази, спостерігається зниження виробництва рибофлавіну в 10 разів, а споживання рослинної олії – в 2 рази. Навпаки, стимуляція гену ACR268C, що кодує малатсинтезу, призводить до вищої активності ферменту і до 1,7-кратного збільшення виходу вітаміну В₂. Результати в цьому випадку досягались за рахунок введення *E. gossypii* плазмиди з геном ACR268C та геном стійкості до канаміцину. Як наслідок спостерігався підвищений біосинтез як малатсинтази, так і рибофлавіну [8].

Результати даних досліджень свідчать про ефективність використання регуляції активності ізоцитратліази шляхом вирошування продуцента *E. gossypii* на середовищі з додаванням ітаконату або оксалату для збільшення виходу рибофлавіну до 25 разів через перенаправлення вуглецевого потоку з циклів обміну вуглеводів до біосинтезу вітаміну B₂.

Висновки. За результатами описаних досліджень було визначено перспективність використання мутантних штамів *E. gossypii* для промислового виробництва рибофлавіну. Штами, отримані при обробці фізичними або хімічними мутагенами, які стійкі до впливу ітаконату або оксалату, мають більший вихід вітаміну B₂ за рахунок перенаправлення потоку карбону з цикла трикарбонових кислот через гліюксилатний шунт. Таким чином, досягається збільшення кількості отриманого рибофлавіну до 25 разів [5], коли субстратом була рослинна олія. При використанні оксалату в якості метаболіту концентрація рибофлавіну в порівнянні з диким штамом зросла в 5 разів і досягла значення 5 г/л [7].

Список використаної літератури:

1. Averianova, L. A., Balabanova, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., & Tekutyeva, L. A. Production of Vitamin B₂ (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020. Vol. 8. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>
2. Silva, R., Aguiar, T. Q., Oliveira, R., Domingues, L. Light exposure during growth increases riboflavin production, reactive oxygen species accumulation and DNA damage in *Ashbya gossypii* riboflavin-overproducing strains. *FEMS yeast research*. 2018. Vol. 19, No. 1. URL: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy114>
3. Liu, S., Hu, W., Wang, Z., & Chen, T. Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. *Microbial cell factories*. 2020. Vol. 19, No. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01302-7>
4. Shin Kanamasa, Satoshi Tajima, Enoch Y. Park. Isocitrate Dehydrogenase and Isocitrate Lyase are Essential Enzymes for Riboflavin Production in *Ashbya gossypii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2007. Vol. 12. P. 92–99.
5. Schmidt G., Stahmann K. P., Kaesler B., Sahm H. Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology*. 1996. Vol. 142. P. 419–426. URL: <https://doi.org/10.1099/13500872-142-2-419>
6. 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 Biotechnology*. 2009. Vol. 108. P. 325–329. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.04.021>
7. Sugimoto, T., Morimoto, A., Nariyama, M., Kato, T., & Park, E. Y. Isolation of an oxalate-resistant *Ashbya gossypii* strain and its improved riboflavin production. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 2010. Vol. 37, No. 1. P. 57–64. URL: <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0647-3>
8. Sugimoto, T., Kanamasa, S., Kato, T., Park, E. Y. Importance of malate synthase in the glyoxylate cycle of *Ashbya gossypii* for the efficient production of riboflavin. *Applied microbiology and biotechnology*. 2009. Vol. 83, No. 3. P. 529–539. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1972-1>