

ІНДУКУВАННЯ НАДСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ *EREMOTHECIUM ASHBYI* РЕГУЛЯЦІЄЮ МЕТАБОЛІЧНИХ ШЛЯХІВ

Шопова З.С., Поліщук В.Ю.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, zssshopova@gmail.com

Abstract

Eremothecium ashbyi is a natural producer of riboflavin, an essential water-soluble vitamin involved in redox reactions as a precursor of FMN and FAD. The study aimed to enhance riboflavin biosynthesis via UV irradiation and itaconate treatment. The highest yield of 531,61 mg/L was obtained on oil-based media, indicating the effectiveness of stress-induced stimulation and metabolic regulation.

Keywords: *Eremothecium ashbyi*, riboflavin, itaconate, UV-irradiation.

Вступ. Рибофлавін, також відомий як вітамін В₂, є незамінним компонентом клітинного метаболізму, де він функціонує як попередник флавінових коферментів, залучених до сотень біохімічних реакцій. Його значення виходить далеко за межі ролі харчової добавки – він необхідний для функціонування електронно-транспортного ланцюга, окиснення жирних кислот, метаболізму амінокислот і нейтралізації вільних радикалів. Молекулярна структура рибофлавіну дозволяє йому ефективно долучатися до редокс-процесів в основі коферментів флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), що забезпечують перебіг реакцій дегідрування. Завдяки здатності до перенесення атомів гідрогену Н⁺ рибофлавін бере участь у десатурації жирних кислот, метаболізмі холестерину, синтезі ефірних ліпідів у пероксисомах [1, 2], мітохондріальному катаболізмі амінокислот, окислювальному згортанні білків в ендоплазматичному ретикулумі [1, 3], відповідно вітамін В₂ залучений до усіх процесів білкового, ліпідного та вуглеводного обмінів. Окрім того, рибофлавін бере участь у біосинтезі ніацину з триптофану, опосередковано впливаючи на енергетичний баланс клітини. Таким чином, цей вітамін є фундаментальним для метаболічної цілісності еукаріотичних організмів.

Одним з природних суперпродуцентів рибофлавіну виступає аскоміцет *Eremothecium ashbyi* [4], який синтезує і акумулює вітамін наприкінці фази росту у міцелії. Саме відкладення кристалів рибофлавіну у вакуолях клітин зумовлює характерне інтенсивно-жовте забарвлення колоній цього гриба [5]. *E. ashbyi* демонструє посилений біосинтез ФАД, що зумовлює його потенційну цінність для фармацевтичної галузі [6–8]. Проте удосконалення технології отримання та підвищення виходу рибофлавіну досі залишається актуальним. До способів збільшення ефективності технології отримання рибофлавіну можна віднести модифікацію метаболічних шляхів вихідного штаму, а також фізичний мутагенез, наприклад, обробку ультрафіолетовим випромінюванням (УФ).

Біосинтез рибофлавіну у аскоміцетів є складним процесом, який охоплює цілий ряд біохімічних реакцій від β-окислення жирних кислот у пероксисомах через цикл трикарбонових кислот у мітохондріях до термінального біосинтезу рибофлавіну в цитозолі, які можуть відбуватись лише на багатому на поживні

речовини середовищі з рослинною олією, дріжджовим екстрактом, амінокислотами [9].

Ізоцитратліаза КФ 4.1.3.1 – унікальний для гліюксилатного метаболічного шляху фермент, який каталізує розщеплення ізоцитрату до гліюксилату та сукцинату, відводячи ізоцитрат через шлях збереження вуглецю і, отже, минаючи його утилізацію в циклі трикарбонових кислот. Кінцевим результатом анаплеротичної дії гліюксилатного шунта є перетворення жирів на вуглеводи [7, 10], що дозволяє використовувати рослинну олію як джерело карбону. Ітаконова та щавлева кислоти діють як антиметаболіти ізоцитратліази, блокуючи її активність. Однак у випадку мутантних штамів, що набули стійкості до цих інгібіторів, спостерігається зростання рівня синтезу рибофлавіну. Це пов'язано з тим, що внаслідок порушення роботи ізоцитратліази метаболічний потік вуглецю спрямовується не через цикл трикарбонових кислот, а через гліюксилатний шунт. Така адаптація відбувається особливо ефективно за умови, коли джерелом вуглецю є саме рослинна олія [9].

Оскільки попередники рибофлавіну, ГТФ і рибулозо-5-фосфат, походять від метаболізму вуглеводів, гліюксилатний цикл відіграє важливу роль у рості гриба та синтезі рибофлавіну на середовищах, що містять у своєму складі рослинну олію. Це відкриває можливість використання відходів олійно-жирової промисловості для комерційного виробництва рибофлавіну.

Метою дослідження було отримання штамів *E. ashbyi* з підвищеною здатністю до біосинтезу рибофлавіну на основі регуляції метаболічних шляхів.

Матеріали та методи. Вихідний штам *E. ashbyi* F-340 вирощували на глюкозо-пептоно-дріжджовому агаризованому середовищі (ГПДА) у термостаті при 28 °С 7 діб. Обробку спор ультрафіолетом проводили протягом 30 с на відстані 20 см від УФ-ламп. Опромінену суспензію у кількості 0,5 см³ висівали на ГПДА середовище, а також на ГПДА з додаванням ітаконової кислоти у різних концентраціях (25, 50, 75 і 100 мМ). Відбирали найбільш інтенсивно забарвлені колонії.

Для глибинного культивування використовували два середовища на основі ГПДА: склад першого: глюкоза 40 г/дм³, пептон 3 г/дм³, дріжджовий екстракт 5 г/дм³; і другого: глюкоза 10 г/дм³, пептон 3 г/дм³, дріжджовий екстракт 5 г/дм³, соняшникова макуха 30 г/дм³. Культивування проводили у колбах Ерленмеєра на 250 см³ (при заповненні середовищем 50 см³) протягом 7 діб при 28°C на роторних шейкерах з частотою обертів 150 об/хв.

Вихід рибофлавіну після глибинного культивування визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм у кюветі 1 см. Фільтрат культуральної рідини у кількості 1 см³ переносили у мірну пробірку на 5 см³, куди додавали 1 см³ 20 %-го розчину трихлороцтової кислоти для осадження білків та гідролізу ФАД до ФМН. Отриманий розчин залишали на ніч при температурі 37 °С. Біомасу висушували при 105 °С до сталої ваги, після чого заливали 0,02 N розчином HCl. Витримували у сушильній шафі при 121 °С 20 хв. Відбір проб здійснювали як описано вище.

Для видалення побічних жовтих пігментів додавали розчин перманганату калію до стабільного фіолетового забарвлення, після чого надлишок перманганату нейтралізували додаванням розчину пероксиду водню. Вміст пробірки доводили дистильованою водою до мітки 5 см³. Вміст рибофлавіну визначали за калібрувальним графіком.

Результати та обговорення. Отримані результати виходу рибофлавіну у досліджуваних штамів наведені на рисунку 1. Проведені дослідження виявили значний вплив як ітаконової кислоти, так і ультрафіолетового випромінювання на інтенсифікацію біосинтезу рибофлавіну у штамів *E. ashbyi*.

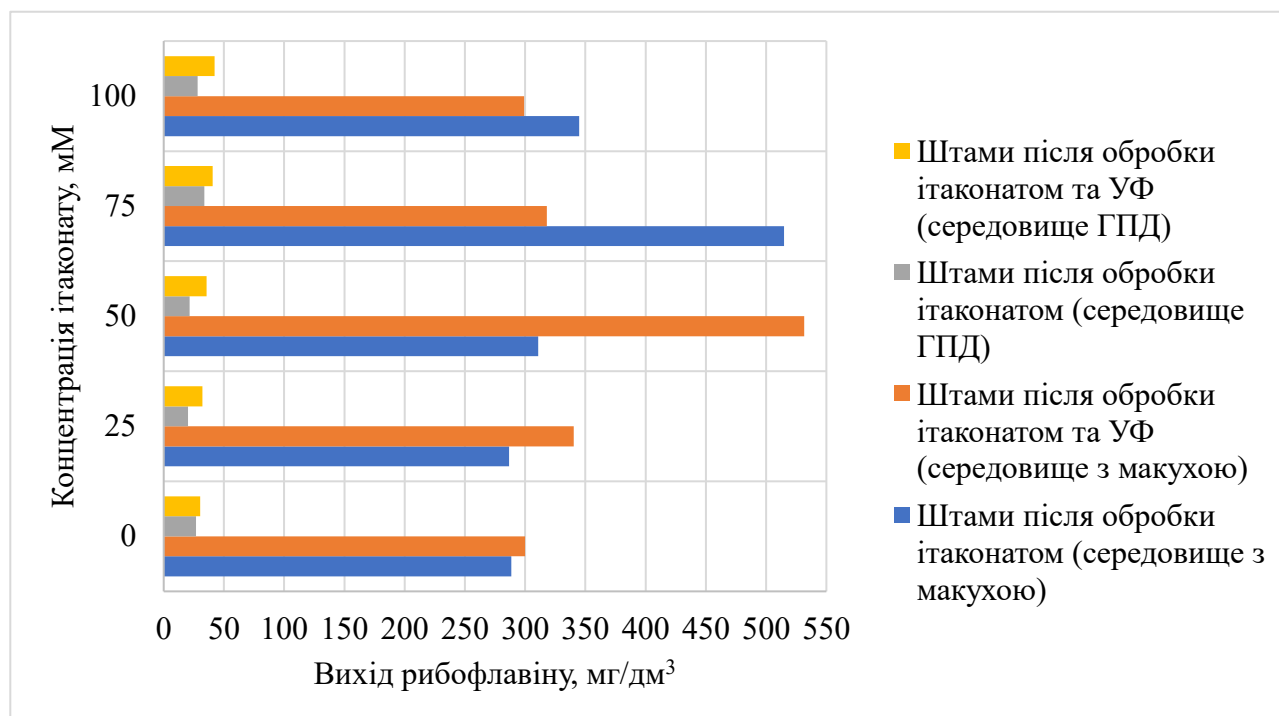


Рис. 1. Порівняння впливу ітаконової кислоти та ультрафіолетового випромінювання на рівень біосинтезу рибофлавіну у штаму *Eremothecium ashbyi* при культивуванні на звичайному середовищі ГПД та на середовищі ГПД з додаванням соняшникової макухи.

Аналіз результатів культивування на звичайному середовищі ГПД показав, що найбільший загальний вміст рибофлавіну (42,19 мг/дм³) досягнуто у варіанті з 100 мМ ітаконату в поєднанні з УФ-опроміненням, що перевищує контрольний показник (26,88 мг/дм³) на 57 %. Значно виразніші зміни спостерігалися при використанні соняшникової макухи як джерела рослинної олії. За таких умов у досліді з 50 мМ ітаконату та УФ-опроміненням загальний вихід рибофлавіну досягнув 531,61 мг/дм³, що майже у 20 разів перевищує контроль на середовищі ГПД (26,88 мг/дм³) і в 1,8 разів перевищує контроль з макухою (288 мг/дм³). Проте після впливу УФ-випромінювання кількість рибофлавіну у біомасі була набагато меншою, ніж за тих же умов без впливу ультрафіолету, що свідчить про підвищений біосинтез саме екзорибофлавіну для захисту культури від дії УФ.

Водночас надмірні концентрації ітаконату (100 мМ) в умовах УФ-впливу спричинили зниження загального виходу рибофлавіну до 299,17 мг/дм³,

ймовірно через метаболічне перенавантаження або інгібування клітинного росту. Такі результати узгоджуються з попередніми даними щодо стресової дії високих концентрацій антиметаболітів. Таким чином, оптимальними умовами для стимуляції рибофлавіногенезу у *E. ashbyi* є попередня обробка культури ітаконовою кислотою з концентрацією 50 мМ та УФ-опроміненням при глибинному культивуванні на середовищі, що містить рослинну олію.

Висновки. Комбіноване застосування ітаконової кислоти та УФ-опромінення для культури *E. ashbyi* забезпечило суттєве збільшення виходу рибофлавіну у порівнянні з контролем – 531,61 мг/дм³, що майже в 20 разів перевищує контроль на середовищі ГПД (26,88 мг/дм³) і в 1,8 разів на ГПД з макухою (288 мг/дм³). Зростання продуктивності пояснюється перенаправленням метаболізму через гліоксилатний шунт та посиленням екзосекреції рибофлавіну під дією стресових чинників.

Список використаної літератури:

1. Lienhart W.-D., Gudipati V., Macheroux P. The human flavoproteome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2013. Vol. 535, no. 2. P. 150–162. URL: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.02.015>.
2. Pinto J. T., Cooper A. J. L. From cholesterologenesis to steroidogenesis: role of riboflavin and flavoenzymes in the biosynthesis of vitamin D. *Advances in Nutrition*. 2014. Vol. 5, no. 2. P. 144–163. URL: <https://doi.org/10.3945/an.113.005181>.
3. Kodali V. K., Thorpe C. Oxidative protein folding and the quiescin–sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. Vol. 13, no. 8. P. 1217–1230. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3098>.
4. Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: an overview / L. A. Averianova et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. Vol. 8. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>.
5. Aguiar T. Q., Silva R., Domingues L. *Ashbya gossypii* beyond industrial riboflavin production: a historical perspective and emerging biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33, no. 8. P. 1774–1786. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.001>.
6. Abbas C. A., Sibirny A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011. Vol. 75, no. 2. P. 321–360. URL: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00030-10>.
7. Kalingan A. E., Liao C.-M. Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* NRRL 1363. *Bioresource Technology*. 2002. Vol. 82, no. 3. P. 219–224. URL: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00194-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00194-8).
8. Shimizu S. Vitamins and related compounds: microbial production. *Biotechnology set*. Wiley-VCH, Weinheim. 2001. P. 322–326.
9. Metabolic flux analysis in *Ashbya gossypii* using ¹³C-labeled yeast extract: industrial riboflavin production under complex nutrient conditions / S. K. Schwechheimer et al. *Microbial Cell Factories*. 2018. Vol. 17, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1003-y>.
10. Stahmann K. P., Revuelta J. L., Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000. Vol. 53, no. 5. P. 509–516. URL: <https://doi.org/10.1007/s002530051649>.