

В.Ю. Яцишин¹, М. Ключ², Д.В. Федорович¹, А.А. Сибірний^{1,2}

¹ Інститут біології клітини НАН України, Львів

² Ряшівський університет, Польща

СТВОРЕННЯ ПРОДУЦЕНТІВ ТА РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ НА ОСНОВІ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMILATA*



Сконструйовано штами дріжджів *C. famata*, що містили 5–6 копій гена *FMN1* (кодує рибофлавінокіназу), і досліджено умови, оптимальні для синтезу флавінмононуклеотиду (ФМН) при періодичному та постійному підживленні культивуванні. Оптимізовано склад поживного середовища, а також інші параметри культивування для максимального виходу цільового продукту – ФМН.

Ключові слова: флавінмононуклеотид (ФМН), дріжджі, *Candida famata*, надсинтез, штами-продуценти.

Рибофлавін (РФ, вітамін В₂) біологічно активний лише у вигляді коферментних похідних – ФМН та ФАД [1, 2, 3]. Відомі сотні флавопротеїнів, і кожного року описують нові флавіномісні білки [4]. Від 1 до 3 % генів бактерійних та еукаріотичних геномів кодують білки, що містять флавіни [5]. Флавоензими, що містять ФМН та ФАД як простетичні групи, каталізують реакції, надзвичайно важливі для основних метаболічних процесів (фотосинтез, аеробне та анаеробне дихання, денітрифікація). Зараз виявлено нові, раніше невідомі функції флавінів [4, 6]. Флавіни, задіяні у фоторепарацію ДНК та регуляцію каспазонезалежного апоптозу, є важливим компонентом фоторецепторів (криптохромів), що реагують на блакитне світло, залучених у регуляцію біологічних годинників та у генерацію світла при бактерійній біоломінесценції.

Оскільки флавіни беруть участь у метаболізмі багатьох сполук, а також у процесах гене-

рації енергії, порушення в обміні флавінових коферментів призводять до серйозних змін на клітинному та тканинному рівнях [7].

При недостатньому забезпеченні флавінами у ссавців погіршується апетит, припиняється ріст, знижується ефективність засвоєння кормів, розвиваються ураження слизових оболонок, порушується сутінковий зір, а також функції печінки і травного тракту.

Важлива роль флавопротеїнів у обміні речовин обумовлює широке використання препаратів вітаміну В₂ у медичній практиці. Як лікарський засіб ФМН використовують для лікування захворювань серцево-судинної системи, печінки, кишківника, а також для нормалізації діяльності центральної нервової системи. Флавінові нуклеотиди застосовуються у вигляді ін'єкцій при арибофлавінозі, різноманітних дерматозах, захворюваннях очей, а також як підтримуючий засіб при порушеннях харчування [1, 8]. Компонент мультивітамінних сумішей – ФМН має у 200 разів кращу розчинність у воді, ніж РФ [9, 10], що дозволяє застосовувати його парентерально. Крім того,

терапевтичний потенціал ФМН при лікуванні деяких захворювань вищій, ніж у РФ [11].

Різноманітність функцій флавопротейнів, потреба людей і тварин у флавінах, здатність деяких мікроорганізмів до надсинтезу цього вітаміну вказує на важливе значення з'ясування закономірностей утворення флавінів та механізмів регуляції процесу флавіногенезу не лише для розкриття фундаментальних проблем біології, а й для сучасної біотехнології виробництва флавінів медичного призначення та білково-вітамінних препаратів для використання як кормових добавок у тваринництві та птахівництві [12].

5'-ФМН у промислових масштабах отримують шляхом фосфорилування РФ хімічними агентами (хлороксид фосфору, пірофосфорна кислота і суміш фенолу, хлороформу та фосфорного ангідриду), при цьому утворюються побічні продукти: ізомерні форми ФМН (2'-ФМН і 4'-ФМН), РФ-динуклеотиди (5',4'-ФДН і 5',3'-ФДН), а також РФ-поліфосфати. Очистка 5'-ФМН від цих сполук є доволі важкою процедурою [9]. Окрім того, препарати ФМН, отримані хімічним способом, досить дорогі, що знижує можливості їх практичного застосування. Спроби отримати штами мікроорганізмів, здатні до утворення значних кількостей ФМН, із використанням класичних генетичних методів не мали успіху.

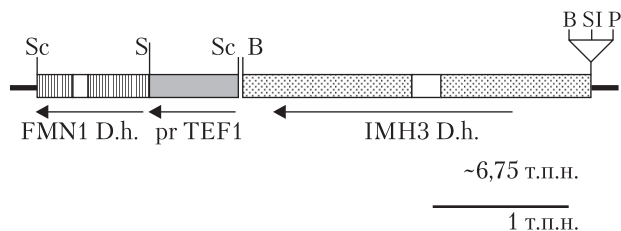
Сконструйовано рекомбінантні штами бактерії *Corynebacterium ammoniagenes*, які можуть продукувати значні кількості ФМН та ФАД внаслідок надекспресії гена, що кодує РФ кіназу/ФАД-синтетазу [13], однак середовище для культивування містило надзвичайно дорогі складники, зокрема 24 г/л АТФ [14].

Доброю моделлю для дослідження генетичного контролю біосинтезу флавінових нуклеотидів та перспективними для отримання надсинтетиків ФМН є дріжджі *S. famata*, які володіють величезним потенціалом як продуценти РФ [3, 15]. Використання дріжджових продуцентів для промислового виробництва ФМН має ряд переваг: не потребує дорогих

попередників, відсутність побічних продуктів, короткий час культивування, можливість використання відходів та напівпродуктів харчової промисловості. Нами розроблено схему генно-інженерного конструювання та вперше отримано штами дріжджів *S. famata*, здатні до нагромадження в культуральній рідині ФМН [16, 17, 18]. Заміна нативного промотора клонованого гена *FMN1* дріжджів *Debaryomyces hansenii* на сильний промотор *TEF1* (фактора елонгації трансляції $\alpha 1$) *S. famata* викликає підвищення (до 200 разів) питомої активності РФ-кінази (каталізує реакцію фосфорилування РФ) та зростання вмісту ФМН (до 1000 разів) у культуральній рідині рекомбінантних штамів *S. famata*. Показано, що рівень синтезу ФМН може бути підвищений за рахунок введення додаткових копій гена *FMN1*. Для забезпечення РФ-кінази достатньою кількістю субстрату (РФ) ген *FMN1* було введено у штами дріжджів *S. famata* – стабільний надсинтетик РФ. Проте продуктивність синтезу ФМН сконструйованими штамами є недостатньою для промислового виробництва цього нуклеотиду. Раніше ми показали, що оптимізація лише складу середовища призводить до зростання продукції ФМН у 30 разів [19]. У роботі наведено дані про конструювання штаму *S. famata*, що містить 5–6 копій гена *FMN1*, та досліджено умови, оптимальні для синтезу ФМН при періодичному та неперіодичному з підживленням культивуванні. Оптимізовано склад поживного середовища, а також інші параметри культивування (перемішування, температура, *pH*) для продукції ФМН сконструйованим штамом.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Нами використовувався штама дріжджів *Candida famata*, здатний до надсинтезу ФМН Т-ОР 13-76, що містив 3–4 копії гена *FMN1* під контролем промотора *TEF1* *S. famata* [18]. Дріжджі вирощували при 28–30 °С у багатому середовищі YPD (2 % глюкоза, 1 % бактопептон, 0,5 % дріжджовий екстракт) та модифікованому мі-



Лінійна схема плазмиди pIMH3_TFMN1. Сайти рестрикції: Sc, SacI; B, BamHI; S, SalI; P, PstI.

неральному середовищі Беркгольдера (СБ) (сахара – 20; сечовина – 1; KH_2PO_4 – 5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 0,2; а також біотин – 1 мг/л; мікроелементи у кінцевій концентрації: 0,2 мкМ CuSO_4 ; 4,5 мкМ MnSO_4 ; 2,0 мкМ NaMoO_4 ; 0,75 мкМ H_3BO_3 ; 17,5 мкМ ZnSO_4) та промислових середовищах різного складу. Дріжджі культивували в колбах на круговій качалці при 220 об./хв або у біореакторах об'ємом 1,3 та 7 л (New Brunswick Scientific).

Генно-інженерні маніпуляції проводили за стандартною методикою, як описано в [20, 21].

Таблиця 1

Вміст флавінів у культуральній рідині рекомбінантних штамів *C. famata*, що містять додаткові копії гена *FMN1*

Штам	Флавіни культуральної рідини		
	ФМН, мг/л	Сумарна кількість флавінів, мг/л	ФМН, %
AF-4	4,0 ± 0,2	35,9 ± 2,8	11,1 ± 0,9
T-OP 13-76	26,0 ± 1,9	44,5 ± 3,3	58,4 ± 5,5
T-OPM 11	31,4 ± 2,4	48,7 ± 3,2	64,5 ± 5,5
T-OPM 12	34,4 ± 2,9	52,1 ± 3,1	66,0 ± 6,7
T-OPM 13	51,7 ± 1,9	138,3 ± 9,6	37,4 ± 3,2
T-OPM 14	62,2 ± 4,9	248,3 ± 8,3	25,1 ± 1,9
T-OPM 15	59,2 ± 2,1	82,3 ± 4,1	71,9 ± 6,8
T-OPM 16	100,0 ± 6,8	210,0 ± 4,0	47,6 ± 4,8
T-OPM 17	106,0 ± 5,3	226,0 ± 8,0	46,9 ± 2,1
T-OPM 18	89,7 ± 0,6	138,1 ± 9,9	65,0 ± 2,0
T-OPM 19	130,5 ± 7,7	208,2 ± 9,9	62,7 ± 1,9
T-OPM 20	81,0 ± 2,3	260,4 ± 8,9	31,1 ± 1,0

$P < 0,05$

Біомасу дріжджів визначали за оптичним поглинанням розведених суспензій шляхом фотометрування на спектрофотометрі Helios Gamma UVG-100105 при довжині хвилі 590 нм у кюветі шириною 1 см; перерахунок на суху вагу проводили за стандартною кривою. Вміст різних форм флавінів визначали на флюорометрі Turner Quantech Digital Filter Fluorometer FM109510-33 після хроматографічного розділення у 2,5 % гідрофосфаті натрію. Вміст глюкози в культуральному середовищі визначали ферментативним способом, використовуючи аналітичний набір «Діаглюк-2».

Для виявлення компонентів середовища, важливих для продукції ФМН, застосовувався аналіз Плакета–Бермана [22]. Для підбору концентрації досліджуваних компонентів середовища було застосовано центральний композиційний аналіз [23]. Статистичний аналіз математичних моделей здійснено за допомогою пакету статистики ANOVA. Для вищезгаданих процедур було використано програмний пакет Statistica® 6.0 Stat Soft, Inc.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ Конструювання продуцента ФМН

Для введення додаткових копій гена *FMN1* під контролем сильного промотора *TEF1* у генном сконструйованого нами рекомбінантного штаму T-OP 13-76 *C. famata* [18], який містив 3–4 копії гена *FMN1* і синтезував близько 25 мг/л ФМН, було сконструйовано плазмиду, що містила ген резистентності до мікофенольної кислоти (рисунок). Цією плазмидою, попередньо лінеаризованою рестриктазою *PstI*, методом електропорації трансформували реципієнтний штам-надсинтетик ФМН *C. famata* T-OP 13-76. Було отримано колекцію стабільних, резистентних до мікофенольної кислоти рекомбінантних штамів, які, за результатами Саузерн-блот аналізу, містили 5–6 копій гена *FMN1*. Отримані трансформанти мали вищу питому активність РФ-кінази (до 17 мОд/мг білка) і нагромаджували більшу кількість ФМН у культуральній рідині (понад 130 мг/л), порівняно

зі штамом дикого типу та реципієнтним штамом (табл. 1). Найбільш активний штам *S. famata* ІМВ У-5028 було запатентовано [24] та використано для подальшої роботи.

Оптимізація умов культивування для максимального виходу ФМН

За умов періодичного культивування при засіві 0,10 мг/л тривалість культивування, яка забезпечує утворення ФМН, становить 48–60 год. Для скорочення часу культивування для максимального нагромадження ФМН вирішили застосувати інкубацію густої суспензії клітин. Густину культури, найбільш сприятливу для синтезу ФМН штамом *S. famata* ІМВ У-5028, визначали при інкубації клітин у рідкому модифікованому СБ. Частота перемішування становила 220 об./хв, температура – 28 °С, час інкубації – 21 год. Виявлено, що синтез ФМН за умов інкубації помітно залежить від початкової концентрації клітин у середовищі (табл. 2). Сумарний вміст флавінів зростає відповідно до зростання густини суспензії, однак вміст ФМН був максимальним при інкубації 3 мг/мл клітин протягом 21 год. При цьому відсотковий вміст ФМН також був найвищим при інкубації 3 мг/л клітин.

Встановлено, що температура культивування має суттєвий вплив на рівень синтезу ФМН. Найкращою для продукції ФМН є температура 24–28 °С. Зниження синтезу ФМН при вищих значеннях температури культивування, імовірно, пов'язане із суттєвим пригніченням росту досліджуваного штаму ІМВ У-5028 *S. famata* при температурі, вищій, ніж 30 °С (дані не наведено). Вплив *pH* на синтез ФМН не є настільки суттєвим, як вплив температури. Оптимальним значенням *pH* виявилось 5,5.

Досліджено вплив окремих компонентів середовища та їх концентрацій на нагромадження ФМН сконструйованим рекомбінантним штамом. Для цього застосовано методи математичного моделювання експериментів, зокрема аналіз Плакета–Бермана. Для аналізу було

взято компоненти середовища СБ та деякі мікроелементи, що, за даними літератури, впливають на біосинтез РФ флавіногенними мікроорганізмами та фосфатазну активність [25]. Зокрема, використано 15 різних компонентів середовища: сахарозу, сечовину, KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, ZnSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , CoCl_2 , сіль Мора як джерело заліза, цитрат натрію, BeSO_4 , NaF , дріжджовий екстракт. Згідно зі статистичним аналізом, факторами, що достовірно позитивно впливають на синтез ФМН, виявились: KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, BeSO_4 та дріжджовий екстракт. Подальшу оптимізацію середовища та можливі взаємодії між компонентами, що впливають на синтез ФМН, оцінювали за допомогою аналізу «на поверхні відзиву». Для перевірки даних центрального композиційного аналізу 3 мг/мл клітин дріжджів інкубували у 100 мл колбах, що містили 10 мл середовища оптимізованого складу (згідно з прогнозованими даними моделі) (г/л): сахароза – 20; сечовина – 1; KH_2PO_4 – 4,999; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 2,600; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,240; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,0013; дріжджовий екстракт – 2,198; а також біотин – 1 мг/л; мікроелементи у кінцевій концентрації: 0,2 мкМ CuSO_4 ; 4,5 мкМ MnSO_4 ; 2,0 мкМ NaMoO_4 ; 0,75 мкМ H_3BO_3 ; 17,5 мкМ ZnSO_4 . Частота перемішування становила 220 об./хв, температура – 28 °С, час інкубації – 21 год, *pH* – 5,5.

Результати, отримані в трьох окремих експериментах, були близькими до прогнозова-

Таблиця 2

Вміст флавінів у культуральній рідині рекомбінантного штаму ІМВ У-5028 *S. famata* при різних початковій густині клітин

Густина клітин, мг/мл	Сумарний вміст флавінів, мг/л	ФМН, мг/л	ФМН, %
2,0	155,6 ± 0,55	83,9 ± 0,22	53,9 ± 5,03
3,0	332,5 ± 0,53	195,5 ± 0,41	58,8 ± 2,38
5,0	328,7 ± 0,98	188,0 ± 0,81	57,2 ± 1,39
7,5	376,4 ± 1,00	176,9 ± 0,55	47,0 ± 4,73

$P < 0,05$

них. Передбачувана продукція ФМН становила 328,25 мг/л, тоді як експериментально отримано $318,2 \pm 7,411$ мг/л ФМН. Це підтверджує достовірність теоретичної моделі.

Таблиця 3

Синтез ФМН та вміст глюкози в середовищі при періодичному типі вирощування штаму *C. famata* ІМВ У-5028 у ферментері

Час інкубації, год	Середовище інкубації			
	– Cu ²⁺ та МоО ₂₄ ²⁻		+ Cu ²⁺ та МоО ₂₄ ²⁻	
	ФМН, мг/л	Глюкоза, %	ФМН, мг/л	Глюкоза, %
0	–	2,00	–	2,00
13,5	177,6	0,12	124,7	0,11
19,0	169,8	0,13	124,0	0,11
22,0	186,0	0,13	176,7	0,11
38,0	200,4	0,14	275,3	0,14
43,0	204,6	0,15	242,7	0,14
48,0	190,2	0,16	292,0	0,15
60,0	183,0	0,16	188,0	0,18

Таблиця 4

Ріст, синтез ФМН та вміст глюкози в середовищі при періодичному та періодичному з підживленням глюкозою типах вирощування штаму *C. famata* ІМВ У-5028 у ферментері

Час інкубації, год	Тип культивування					
	Періодичний			Періодичний із підживленням		
	Біомаса, мг/мл	ФМН, мг/л	Глюкоза, %	Біомаса, мг/мл	ФМН, мг/л	Глюкоза, %
0	5,00	–	2,00	5,00	–	2,00
9,0	6,20	93,6	0,17	6,50	119,4	0,15
22,0	7,20	177,0	0,20	7,30	228,6	0,20
24,0	6,90	197,4	0,19	6,90	240,0	0,97
28,0	6,90	213,6	0,18	7,80	314,4	0,27
32,0	6,50	237,0	0,23	7,80	318,6	0,27
46,0	6,51	271,2	0,18	8,21	351,6	0,23
48,0	6,41	258,6	0,18	8,42	361,2	1,70
52,0	6,51	264,6	0,21	8,45	340,2	1,47
56,0	6,56	249,0	0,21	8,57	345,0	1,02
73,0	6,83	271,2	0,25	8,91	426,0	0,29

Оптимізація умов культивування штаму *C. famata* ІМВ У-5028 в біореакторах

Для роботи було використано ферментери об'ємом 1,3 та 7 л (New Brunswick Scientific). Для культивування у біореакторі об'ємом 1,3 л початкова густина інокуляту становила 4–5 мг/мл. Режим перемішування у ферментері підтримувався на рівні 600 об./хв; температура – 26 °С. Для забезпечення потрібної оптичної густини культури інокуляту вирощували у колбах в середовищі оптимізованого складу протягом 24–30 год, осаджували центрифугуванням при 2,5 тис. об./хв і вносили у ферментаційне середовище. Встановлено, що іони Cu²⁺ та МоО₂₄²⁻ стимулюють ріст та синтез ФМН штамом-надпродуцентом *C. famata*.

Найвищого рівня синтез ФМН досягав на 48-ій годині інкубації у середовищі оптимізованого складу з додаванням солей міді та молібдату і становив 292,0 мг/л (табл. 3), однак вміст глюкози у середовищі був критично низьким, що, безперечно, негативно впливало на подальший ріст культури і, як наслідок, могло негативно впливати на синтез ФМН. Тому наступні ферментації велися у режимі періодичного культивування з підживленням (підживлення вели 50%-им розчином глюкози; її концентрацію підтримували на рівні 0,5–1,5 %), що стимулювало ріст і біосинтез ФМН культурою штаму-надпродуцента *C. famata* ІМВ У-5028 (табл. 4). За таких умов на 73-ій годині інкубації було досягнуто синтезу 426 мг/л ФМН. У наступних експериментах було здійснено підживлення культури не лише джерелом вуглецю, але й концентрованим середовищем культивування. Для цього під час інкубації у ферментер вносили окрім глюкози (50 %) компоненти оптимізованого середовища з кінцевою концентрацією (г/л): сечовина – 5; КН₂РО₄ – 25; MgSO₄·7H₂O – 1; (NH₄)₆Мо₇О₂₄ × 4H₂O – 1,25; CuSO₄·5H₂O – 0,0065; дріжджовий екстракт – 11; а також біотин – 5 мг/л; мікроелементи у кінцевій концентрації: CuSO₄ – 1 мкМ; MnSO₄ – 22,5 мкМ; NaMoO₄ – 10 мкМ; H₃BO₃ – 3,75 мкМ; ZnSO₄ – 87,5 мкМ. Вста-

новлено, що при підживленні культури джерелом вуглецю та концентрованим середовищем культивування рівень ФМН залишається стабільно високим від 44-ої години інкубації (більше 420 мг/л) і досягає максимуму – 485 мг/л на 104-ій годині інкубації.

Зменшення густини засіву з 5 мг/л до 2 мг/л у ферментерах об'ємом 7 л призводило до зниження виходу ФМН (324 мг/л після 73 год культивування).

Проведено масштабування процесу отримання ФМН за допомогою високоактивного стабільного продуцента у промислових умовах згідно з договором із приватним акціонерним товариством «Ензим» (м. Ладижин Вінницької обл.). Склад середовища (г/л): вода технічна, цукор неочищений – 30, дріжджовий автолізат (виготовлений на підприємстві «Ензим») – 2,2, KH_2PO_4 – 5; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 2; карбамід – 1; біотин – 1 мкг; суміш мікроелементів: CuSO_4 – 2 мкМ; MnSO_4 – 4,5 мкМ; NaMoO_4 – 2,0 мкМ; H_3BO_3 – 0,75 мкМ; ZnSO_4 – 17,5 мкМ. Умови вирощування в біореакторі: засів – 1,3 г клітин/л, рН середовища – 5–6, температура – 25 °С. Режим перемішування у ферментері підтримувався на рівні 250 об./хв. За цих умов нагромадження ФМН в культуральній рідині не перевищувало 180 мг/л.

ВИСНОВКИ

За допомогою методів метаболічної інженерії отримано штами дріжджів, здатні до надсинтезу ФМН внаслідок введення додаткових копій гена *FMN1* під контролем промотора *TEF1* у штам-надсинтетик ФМН. Підбрано умови максимального виходу цільового продукту – ФМН – при вирощуванні селекціонованих штамів у лабораторних умовах. У ферментері, при використанні середовища оптимізованого складу та підібраних умов культивування при підживленні культури джерелом вуглецю та концентрованим середовищем, вдалося досягнути синтезу 463–485 мг/л ФМН. Результати проведеної роботи по масштабуванню процесу біосинтезу ФМН на ПрАТ «Ензим» свідчать,

що подальші зусилля повинні бути спрямовані на адаптацію штамів до промислових умов, що дасть можливість налагодити економічно вигідне виробництво препаратів ФМН.

ЛІТЕРАТУРА

1. Rivlin R.S. Riboflavin // Present Knowledge in Nutrition / Ed by E.K. Ziegler and L.J. Filer, International Life Sciences Institut, 1996. – P. 167–173.
2. Burgess C.M., Smid E.J., van Sinderen D. Bacterial vitamin B₂, B₁₁ and B₁₂ overproduction: An overview // Intern. J. Food Microbiol. – 2009. – Vol. 133, № 1–2. – P. 1–7.
3. Abbas C.A., Sibirny A.A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. Microbiol // Mol. Biol. Rev. – 2011. – Vol. 75, № 2. – P. 321–360.
4. Massey V. The chemical and biological versatility of riboflavin // Biochem. Soc. Trans. – 2000. – 28. – P. 283–296.
5. DeColibus L., Mattevi A. New frontiers in structural flavoenzymology // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2006. – Vol. 16, № 4. – P. 722–728.
6. Яцишин В.Ю., Федорович Д.В., Сибирний А.А. Микробний синтез флавинових нуклеотидів (обзор) // Прикл. біохім. мікробіол. – 2009. – Т. 45, № 2. – С. 133–142.
7. Powers H.J. Riboflavin (vitamin B₂) and health // Amer. J. Clin. Nutr. – 2003. – Vol. 77, № 6. – P. 1352–1360.
8. Борзенко И.А. Клинико-фармацевтические аспекты применения рибофлавина и рибофлавиновых коферментов // Врачеб. дело. – 1983. – Т. 10, № 1. – С. 4–8.
9. Березовский В.М. Химия витаминов. – М.: Пищевая пром., 1973. – 632с.
10. Kroschwitz J.I., Howe-Grant M., Kirk R.E., Othmer D.F. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology: [in 27 volumes]. – New York: J. Wiley, 1998. – V. 25: Vitamins to zone refining. – 1998. – P. 74–83.
11. Хамидова М.Х. Рибофлавиномононуклеотид в глазной практике // Вестн. офтальмологии. – 1973. – Т. 1, № 2. – С. 41–42.
12. Сибирний А.А., Федорович Д.В., Борецький Ю.Р., Вороновський А.Я. Микробний синтез флавінів. – Київ: Наук. думка, 2006. – 191с.
13. Hagihara T., Fujio T., Aisaka K. Cloning of FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its application to FAD and FMN production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1995. – Vol. 42, № 5. – P. 724–729.
14. Pat. 5514574 US, C12N 009/12; C12N 009/02; C12P 021/06; C12P 019/30. Method of producing flavine nucleotides / K. Kitatsuji, S. Ishino, S. Teshiba, M. Arimoto – Filing date 25.07.1994; Publication date 07.05.1996.

15. *Stahmann K.P., Revuelta J.L., Seulberger H.* Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 2000. – Vol. 53, № 5. – P. 509–516.
16. *Іщук О.П., Яцишин В.Ю., Дмитрук К.В. та ін.* Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – Т. 78, № 5. – С. 63–69.
17. *Вороновський А.Я., Дмитрук К.В., Іщук О.П. та ін.* // Пат. 87684 Україна, МПК С 12 Р 25/00, С 12 N 15/00. Спосіб отримання флавінонуклеотиду (5'-ФМН); заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. – № а200612203; заявл. 20.11.2006; опубл. 10.08.2009, бюл. № 15.
18. *Yatsyshyn V. Y., Ischuk O. P., Voronovsky A. Y. et al.* Production of flavin mononucleotide by metabolically engineered yeast *Candida famata* // *Metabol. Eng.* – 2009. – Vol. 11, № 3. – P. 163–167.
19. *Yatsyshyn V.Y., Fedorovych D.V., Sibirny A.A.* Medium optimization for production of flavin mononucleotide by the recombinant strain of the yeast *Candida famata* using statistical designs // *Biochem. Eng. J.* – 2010. – Vol. 49, № 1. – P. 52–60.
20. *Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
21. *Voronovsky A.A., Abbas C.A., Fayura L.R., Kshanovska B.V. et al.* Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata* // *FEMS Yeast Research.* – 2002. – Vol. 2, № 3. – P. 381–388.
22. *Plackett R.L., Burman J.P.* The design of optimum multifactorial experiments // *Biometrika.* – 1946. – Vol. 33, № 4. – P. 305–325.
23. *Montgomery D. C.* *Design and Analysis of Experiments.* – [4-th edn.]. – NY: Wiley, 1997. – 196 p.
24. *Пат. 42499* Україна, МПК С 12 N 1/19. Штам дріжджів *Candida famata* ІМВ У-5028 – продуцент флавінонуклеотиду (5'-ФМН) / А.А. Сибірний, В.Ю. Яцишин, Д.В. Федорович, О.П. Іщук, А.Я. Вороновський; заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. – № у 2009 00725; заявл. 02.02.2009; опубл. 10.07.2009, бюл. № 13.
25. *Струговицкова Л.П., Федорович І.П., Шавловський Г.М.* Виявлення і деякі властивості фосфатаз *Pichia guilliermondii*, які гідролізують флавінонуклеотид // *Укр. біохім. журн.* – 1973. – Т. 45, № 2. – С. 198–203.

В.Ю. Яцишин, М. Клюз,
Д.В. Федорович, А.А. Сибірний

СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ФЛАВИНОНУКЛЕОТИДА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA FAMATA*

Сконструированы штаммы дрожжей *C. famata*, содержащие 5–6 копий гена *FMN1* (кодирует рибофлавінкіназу), и исследованы условия, оптимальные для синтеза флавінонуклеотида (ФМН) при периодическом и периодическом с подпиткой культивировании. Оптимизирован состав питательной среды, а также другие параметры культивирования для максимального выхода целевого продукта – ФМН.

Ключевые слова: флавінонуклеотид (ФМН), дрожжи, *Candida famata*, сверхсинтез, штаммы-продуценты.

V.Yu. Yatsyshyn, M. Kluz, D.V. Fedorovych, A.A. Sibirny

CONSTRUCTION OF THE OVERPRODUCERS AND DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR FLAVIN MONONUCLEOTIDE PRODUCTION BASED ON YEAST *CANDIDA FAMATA*

The strains of the yeast *Candida famata* containing 5-6 copies of *FMN1* gene (encoding riboflavin kinase) were constructed. The optimal conditions for flavin mononucleotide (FMN) synthesis under batch and feed-batch cultivation were investigated. The medium components and cultivation conditions for maximal accumulation of product – FMN were optimized.

Key words: flavin mononucleotide (FMN), yeast, *Candida famata*, oversynthesis, overproducers.

Стаття надійшла до редакції 06.02.12