

2. Vinderola G., et al. Effect of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity // Cytokine.- 2006.- vol. 36, № 5-6.- P.254-260.
3. Chabot S., et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and INF- γ in mouse splenocytes // Lait.- 2001.- vol. 81.- P.683-697.
4. Korakli M., Ganzle M.G., Vogel R.F. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis* // J. Appl. Microb. -2002. – vol. 92. – P. 958-965.
5. Hong S.H., Marshall R.T. Natural exopolysaccharides enhance survival of lactic acid bacteria in frozen dairy desserts // J. Dairy Sci.- 2001.- vol. 84.- P.1367-1374
6. Durlu-Özkaya F., Aslim B., Ozkaya M.T. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria // Food Sci. Tech.- 2007.- vol. 40, № 3.- P.564-568.
7. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. - 1960. - vol. 23, № 1. - P.130-135.
8. Cheirsilp B., et al. Interaction between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefiran production // J. Biosci. Bioengin. - 2003.- vol. 96, № 3.- P.279-284.
9. Томпсон А., Вольфром М.Л. Методы химии углеводов. - М., Мир. - 1967. - 512с.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical. Biochem.- 1976.- vol. 72, № 1.- P.248-254.

Резюме

Изучено влияние повышенного содержания сахарозы и лактозы в среде культивирования на продукцию экзополисахаридов бактериями *Lactobacillus sp.*, отобранными для включения в состав препарата пробиотического действия для сельскохозяйственных животных.

Вивчений вплив підвищеного вмісту сахарози і лактози в середовищі культивування на продукцію екзополісахаридів бактеріями *Lactobacillus sp.*, відібраними для включення до складу препарату пробіотичеського дії для сільськогосподарських тварин.

Effect of increased level of sucrose and lactose in the culture medium on production of exopolysaccharides by selected for probiotic preparations *Lactobacillus sp.* was studied.

ДМИТРУК О.В., ДМИТРУК К.В., ВОРОНОВСЬКИЙ А.Я., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України, відділ молекулярної генетики і біотехнології, Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова 14/16, e-mail: verba@cellbiol.lviv.ua

ЗМІНА КОФАКТОРНОЇ СПОРІДНЕНОСТІ КСИЛОЗОРЕДУКТАЗИ ТА ПОСИЛЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ КСИЛИТОЛДЕГІДРОГЕНАЗИ ПОКРАЩУЄ АЛКОГОЛЬНУ ФЕРМЕНТАЦІЮ КСИЛОЗИ У ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*

Рослинна біомаса має величезний потенціал як сировина для виробництва біопалива, зокрема, паливного етанолу. Основними складовими рослинної біомаси є глюкоза та п'ятиуглецевий цукор ксилоза. Досягти економічно вигідної ферментації ксилози можна, забезпечивши ефективність початкових етапів метаболізму цієї

пентози, котрі визначають і ефективність алкогольної ферментації в цілому. У ксилозоферментуючих дріжджів на перших етапах метаболізму цього цукру задіяні два фермента, що належать до класу оксидоредуктаз, НАДФН-залежна ксилозоредуктаза (КР) (ЕС 1.1.1.21.) і НАД-залежна ксилітолдегідрогеназа (КДГ) (ЕС 1.1.1.9.). Оскільки КР використовує в якості кофактора переважно НАДФН, а КДГ – НАД, то це призводить до виникнення дисбалансу нікотинамідних коферментів у клітині, що в свою чергу призводить до формування побічного продукту – ксиліту, замість етанолу.

Для підвищення рівня ферментації ксилози до етанолу у нашій лабораторії за допомогою сайт-специфічного мутагенезу було сконструйовано модифіковану форму КР *H. polymorpha* зі зміненою кофакторною спорідненістю. Для цього лізин в положенні 341 було замінено на аргінін, а аспарагін в положенні 343 - на аспарагінову кислоту. Було отримано рекомбінантні штами *H. polymorpha*, що надекспресують нативну та модифіковану форми КР у поєднанні з КДГ. Штами, які містили модифіковану КР характеризувалися зменшенням нагромадження ксиліту в середовищі та підвищенням виходу етанолу при ферментації ксилози.

Матеріали і методи

Штами мікроорганізмів та поживні середовища. У роботі використовували штам *H. polymorpha* CBS4732 *leu2-2*. Дріжджі вирощувалися на багатому середовищі YPD (0,5% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 2% глюкоза) або на мінімальному середовищі YNB (0,67% YNB (Yeast Nitrogen Base), 4% ксилоза або 2% глюкоза) при 37°C. Для забезпечення росту ауксотрофних мутантів до мінімального середовища додавався лейцин у концентрації 40 мг/мл.

Бактерійний штам *E. coli* DH5 α (Φ 80 $dlacZ\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169) вирощували при 37°C на багатому середовищі LB (0,5% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 1% NaCl). Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 50 мг/мл і зеоцин у концентрації 150 мг/л.

В роботі були використані стандартні молекулярно-генетичні методи (Sambrook *et al.*, 1989). Геномну ДНК *H. polymorpha* виділяли за допомогою Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції і лігазу використовувалися згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Виділення плазмідної ДНК з бактерій *E. coli* проводили за допомогою Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Полімеразні ланцюгові реакції (ПЛР) проводили на ампліфікаторі GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) з використанням Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) згідно з інструкцією виробника. Трансформацію дріжджів *H. polymorpha* проводили методом електропорації (Faber *et al.*, 1994).

Для визначення рівня алкогольної ферментації ксилози клітини дріжджів нарощували в багатому середовищі YPX (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 4% ксилоза) протягом двох діб. Біомасу (2 мг/мл клітин) переносили на мінімальне середовище YNB з 8% ксилози. Ферментацію проводили при температурах 37°C і 48°C за умов обмеженої аерації (140 обертів/хв.). Концентрацію етанолу в середовищі визначали за допомогою стандартного набору “Алкотест” (Gonchar *et al.*, 2001).

Результати і обговорення

2.1. Конструювання модифікованої КР *H. polymorpha* за допомогою методу сайт-специфічного мутагенезу. За допомогою методу сайт-специфічного мутагенезу в гені, що кодує КР *H. polymorpha* лізин в положенні 341 було замінено на аргінін, а аспарагін в положенні 343 - на аспарагінову кислоту. Для цього фрагменти величиною 1,044 т.п.н. і 0,166 т.п.н. було ПЛР ампліфіковано з геномної ДНК *H. polymorpha* використовуючи праймери HpX1for (CCC AAG CTT ATG CAC ACG CAG ATT AGC AAA AAT CTT G)/HpX1Mrev (CAG TCT CTC CTT TTG GTC GGA CCT TGG AAT

GAC CAA GAT G) і HpX1Mfor (CAT CTT GGT CAT TCC AAG GTC CGA CCA AAA GGA GAG ACT G) і HpX1rev (CGC AAG CTT TTA GAT AAA GGT TGG AAT TTC GTT CCA GGT CC) відповідно. В праймери HpX1Mfor і HpX1Mrev попередньо були внесені нуклеотидні заміни. Використовуючи одержані ПЛР продукти як матриці, за допомогою праймерів HpX1for і HpX1rev було одержано ПЛР продукт величиною 1,170 т.п.н., що являє собою модифіковану КР (ORF *XYL1-M*). Коректність замін нуклеотидів *XYL1-M* було перевірено секвенуванням.

2.2. Конструювання плазмід рX1N-Z і рX1M-Z. Плазмиди рX1N і рX1M були сконструйовані на основі плазмиди рUC57. На початку роботи з плазмиди рUC57 було видалено сайти рестрикції *NdeI* і *HindIII* шляхом лінеаризації цими рестриктазами з наступним затупленням Т4-ДНК-полімеразою і самолігуванням. Одержана плазіда отримала назву рUC57(-H-Nd). Конструкцію, що містить промотор *HpGAP* і термінатор *HpAOX* було отримано із плазмиди рKO8-GAPrg шляхом обробки рестриктазами *BamHI* і *SacI* та напрямлено клоновано в плазмиду рUC57(-H-Nd), отримана конструкція одержала назву рUC57(-H-Nd)-GAPrg-AOXtr. З плазмиди рUC57(-H-Nd)-GAPrg-AOXtr було видалено сайти рестрикції *NdeI* і *NotI*. ORF *XYL1-N* і ORF *XYL1-M* було ПЛР ампліфіковано із геномної ДНК CBS4732 *leu2-2*, оброблено ендонуклеазою рестрикції *HindIII* і клоновано у *HindIII*-лінеаризовану і дефосфорильовану плазмиду рUC57(-H-Nd)-GAPrg-AOXtr(-Nt-Nd), отримані конструкції назвали рX1N і рX1M. Фрагмент величиною 1,2 т.п.н., що несе ген резистентності до зеоцину було ПЛР ампліфіковано із плазмиди рPICZB (Invitrogen) використовуючи праймери Ko58 (CGG GGT ACC TG CAG ATA ACT TCG TAT AGC ATA C) і Ko59 (CGG GGT ACC TG CAG TAA TTC GCT TCG GAT AAC), оброблено рестриктазою *PstI* і клоновано у *PstI*-лінеаризовані і дефосфорильовані плазмиди рX1N і рX1M. Таким чином було сконструйовано плазмиди рX1N-Z і рX1M-Z, що містять ORF *XYL1-N* і ORF *XYL1-M*, відповідно, під контролем промотора гена *HpGAP*.

2.3. Конструювання плазмід рX1N-Z-X2 і рX1M-Z-X2. Промотор *HpGAP* було ПЛР-ампліфіковано із геномної ДНК CBS4732 *leu2-2* використовуючи праймери L1 (CTC GGA TCC CAA TTA TCA TTA ATA ATC) і Ko135 (CAG CAG AAG GAT TGT TCA TTT TGT TTC TAT ATT ATC). Фрагмент, що містить ORF *XYL2-A* і термінатор гена *XYL2-A* було ПЛР-ампліфіковано із геномної ДНК CBS4732 *leu2-2* використовуючи праймери Ko134 (GAT AAT ATA GAA ACA AAA TGA ACA ATC CTT CTG CTG) і Ko133 (ACA GGA TCC ATC CAT GAG AAA CG). За допомогою ПЛР, що перекривається, використовуючи праймери L1 і Ko133 було отримано фрагмент *HpGAP-XYL2-A*. Для проведення цієї ПЛР було одночасно використано дві матриці, отримані в попередніх реакціях (*HpGAP* і ORF *XYL2-A*). ПЛР-продукт *HpGAP-XYL2-A* було оброблено рестриктазою *BamHI* і клоновано у *BamHI*-лінеаризовані і дефосфорильовані плазмиди рX1N-Z і рX1M-Z. Таким чином було одержано конструкції рX1N-Z-X2 і рX1M-Z-X2, що містять ген *XYL1-N* або *XYL1-M* і ген *XYL2-A* під контролем промотора *HpGAP*.

2.4. Отримання штамів *H. polymorpha*, що містять гени *XYL1-N/XYL1-M* або *XYL1-N/XYL1-M* і *XYL2-A* під контролем промотора *HpGAP*. Штами що несуть гени *XYL1-N/XYL1-M* або *XYL1-N/XYL1-M* та *XYL2-A* було одержано шляхом трансформації вихідного штама *Δxyl1* (Voronovsky *et al.*, 2006) плазмидами рX1N-Z/рX1M-Z або рX1N-Z-X2/рX1M-Z-X2, попередньо лінеаризованими рестриктазою *SacI*. Після трансформації клітини висівали на селективне середовище YPD з зеоцином (150 мкг/мл). Колонії здатні рости на селективному середовищі з'являлися після 3 днів інкубації з частотою 20 трансформантів на 1 мкг ДНК. Наявність в одержаних трансформантів ORF *XYL1-N/XYL1-M* і/або ORF *XYL2-A* під контролем промотора *HpGAP*, а також гена резистентності до зеоцину була підтверджена за допомогою ПЛР.

2.5. Визначення спорідненості КР до нікотинамідних кофакторів та активності КДГ. Для визначення спорідненості нативної і модифікованої КР до

кофакторів (НАДН і НАД(Ф)Н) рекомбінантні штами вирощували в середовищі YNB з 4% ксилозою протягом двох діб. Активність КР визначали у безклітинних екстрактах, використовуючи чотири різні концентрації кофакторів. Було показано, що спорідненість модифікованої КР до НАД(Ф)Н зменшилася приблизно в 17 рази порівняно з нативною КР, тоді як спорідненість до НАДН залишилась практично незмінною. Рекомбінантні штами з надекспресією КДГ характеризувалися підвищенням активності цього фермента в 2-2.1 рази (табл. 1).

Таблиця 1

Вихід етанолу, кількість ксиліту та активності КР і КДГ у штамів *H. polymorpha*

Штам	Етанол, г/л	Ксиліт, г/л	Активність U/мг білка		
			КР		КДГ
			НАДРН/К _М (μМ)	НАДН/К _М (μМ)	
<i>XYLI-N</i>	0,153	0,087	0,091/9	0,016/100	0,551
<i>XYLI-M</i>	0,237	0,077	0,019/152	0,014/112	0,504
<i>XYLI-N+XYL2</i>	0,288	0,074			1,3
<i>XYLI-M+XYL2</i>	0,442	0,038			1,485
<i>CBS4732 leu2-2</i>	0,181	0,102	0,034/7	0,012/85	0,697

2.6. Визначення рівня алкогольної ферментації ксилози та кількості ксиліту у рекомбінантних штамів *H. polymorpha*. Рівень алкогольної ферментації ксилози у штамів, в яких було надекспресовано модифіковану КР підвищився в 1,3 рази порівняно з *CBS4732 leu2-2*. У штамів, які окрім модифікованої КР надекспресували ще й КДГ, вихід етанолу підвищився в 2,4 рази в порівнянні з *CBS4732 leu2-2* (табл. 1). Завдяки зміні кофакторної специфічності КР кількість ксиліту у штамів з надекспресією модифікованої КР та КДГ зменшився приблизно в 2.6 рази в порівнянні зі штамом дикого типу *CBS4732 leu2-2* (табл. 1).

Висновки

В результаті проведеної роботи було сконструйовано рекомбінантні штами *H. polymorpha*, які надекспресують нативну та модифіковану форми КР і ксилітолдегідрогеназу. Було показано, що у штамів, які надекспресують модифіковану КР рівень формування ксиліту зменшився приблизно в 1,3-2 рази порівняно з вихідним штамом *CBS4732 leu2-2*; в рекомбінантних штамів, що надекспресують КР зі зміненою кофакторною специфічністю, а також власну КДГ рівень алкогольної ферментації ксилози підвищився в 2,4 рази в порівнянні з *CBS4732 leu2-2*.

Література

1. *Gonchar MV, Maidan MM, Sibirny AA* (2001) A new oxidase-peroxidase kit “Alcotest” for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol Biotechnol* 39: 37–42.
2. *Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
3. *Voronovsky AY, Ryabova OB, Verba OB, Ischuk OP, Dmytruk KV, Sibirny AA*. Expression of *xylA* genes encoding xylose isomerases from *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res* 2005; 5:1055-62.

Резюме

Для підвищення рівня ферментації ксилози до етанолу в інституті біології клітини НАН України було сконструйовано рекомбінантні штами *H. polymorpha*, які надекспресують нативну та модифіковану форми КР у поєднанні з КДГ. Штами, які містили модифіковану КР характеризувалися зменшенням кількості ксиліту і підвищенням виходу етанолу при алкогольній ферментації ксилози.

Для улучшения уровня алкогольной ферментации ксилозы в институте биологии клетки НАН Украины были сконструированы рекомбинантные штаммы *H. polymorpha* с усиленной экспрессией нативной и модифицированной форм КР в сочетании с КДГ. Штаммы с модифицированной формой КР характеризовались уменьшением количества ксилита и повышением выхода этанола при алкогольной ферментации ксилозы.

To improve the level of xylose fermentation to ethanol the recombinant strains with overexpression of native and mutated versions of XR together with the native XDH were constructed in the Institute of cell biology the NAS of Ukraine. The strains which overexpressed of mutated XR possessed decreased amount of xylitol formation and increased level of ethanol during xylose fermentation.

ЕГОРОВА А.В.

Одесская национальная академия пищевых технологий

Украина, 65039, Одесса, ул. Канатная, 112, e-mail: bogdan@onaft.odessa.ua

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗЛАКТОЗНОГО ЗЕРНОВОГО ПРОДУКТА

Биотехнологические методы находят все большее применение при производстве пищевых продуктов, особенно продуктов специального назначения. Так, например, из-за возрастающего распространения непереносимости лактозы в последнее время возросло производство аналогов кисломолочных продуктов. К преимуществам таких продуктов в первую очередь относят отсутствие лактозы, молочных белков и жиров, доступность сырьевых ресурсов. В качестве основных компонентов используют растительное сырье, например, соевые белковые изоляты, модифицированный крахмал и др. Однако такие технологии отличаются сложностью и высокой стоимостью конечных продуктов.

Цель данной работы заключалась в разработке биотехнологических основ получения аналога кисломолочного продукта на основе зерна ячменя.

Материалы и методы

Исследования проводили с использованием свежеразмолотого шелушенного зерна ячменя. Вначале проводили ферментативный гидролиз в течение 3600 с при pH 5,9 – 6,0. Концентрация ферментного препарата амилосубтилина Г10х составляла 0,1 %, гидромодуль – 1 : 6, температура среды 65 – 70 °С. Эффективность подготовки субстратов оценивали по накоплению клеток молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus*, которые культивировали на протяжении 24 ч при температуре 40 °С.

Результаты и обсуждение

В ходе предварительных исследований пробных посевов *Lactobacillus acidophilus* и бифидобактерий в ферментализат ячменя было установлено, что зерновой гидролизат ячменя представляет собой достаточно питательную среду для культивирования этих бактерий. Однако количество клеток было меньшим, чем при использовании молочной питательной среды. Нами были проведены исследования по усовершенствованию условий культивирования микроорганизмов с целью получения максимально обогащенного ими пищевого продукта. Эффективность процесса культивирования микроорганизмов оценивали по количеству клеток или по накоплению биомассы (по изменению оптической плотности культуральной жидкости). Продолжительность культивирования составляла 72 ч. Кривая роста имела четко выраженную лаг-фазу (I), которая характеризуется практически полным отсутствием роста, логарифмическую или экспоненциальную фазу (II), в которой наблюдается