

Sposób wytwarzania ryboflawiny

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania ryboflawiny.

Ryboflawina, czyli 7,8-dimetylo-10-(1'-D-rybitylo)izoaloksazyna, nazywana witaminą B₂, jest prekursorem koenzymów flawinowych FAD oraz FMN, uczestniczących w reakcjach oksydoredukcyjnych organizmu, w tym za tlenowe oddychanie w komórkach. Ryboflawina z reguły nie ma bezpośrednich funkcji metabolicznych w żywej komórce, a służy jedynie jako prekursor do syntezy FMN oraz FAD (Abbas, Sibirny, 2011).

Ryboflawina jest szeroko rozpowszechniona we wszystkich komórkach i dlatego, znalazła szerokie zastosowanie jako dodatek do pasz (pokarmu zwierząt hodowlanych) oraz żywności. Jej głównymi źródłami są mleko oraz przetwory mleczne, mięso, jaja lub suche nasiona roślin strączkowych np. fasola. Dobrym źródłem są również zboża, tłuste ryby oraz niektóre owoce i warzywa, zwłaszcza ciemnozielone warzywa zawierają dość wysokie stężenia ryboflawiny.

Ryboflawina ma także swój udział w przemianie białka, węglowodanów i tłuszczu oraz w oddychaniu. Jest również odpowiedzialna za prawidłowe funkcjonowanie procesów oksydacyjno-redukcyjnych, przemianę aminokwasów i lipidów, a także układu nerwowego. Wraz z witaminą A uczestniczy w prawidłowym funkcjonowaniu śluzówki przewodu pokarmowego, nabłonka naczyń krwionośnych i skóry oraz błon śluzowych dróg oddechowych. Odgrywa również istotną rolę w procesie widzenia. Na niedobór witaminy B₂ narażeni są alkoholicy, dzieci i młodzież, diabetycy, ludzie w podeszłym wieku oraz kobiety w ciąży. Głównymi objawami niedoboru witaminy B₂ są zmiany w obrębie jamy ustnej, owrzodzenia i pęknięcia w kącikach warg, zapalenie śluzówki nosa i jamy ustnej. Mogą wystąpić także zmiany w narządzie wzroku, bezsenność czy zawroty głowy a nawet światłowstręt. Ze względu na ograniczoną zdolność wchłaniania witaminy B₂ z przewodu pokarmowego nie obserwuje się szkodliwych skutków jej przedawkowania (Abbas, Sibirny 2011; Gawęcki, 2002).

Ryboflawina jest w około 80%-ach stosowana w rolnictwie jako dodatek do pasz, a także w przemyśle spożywczym jako żółty barwnik (10%) i medycynie (10%).

W dniu dzisiejszym ryboflawina jest pozyskiwana w przemyśle wyłącznie poprzez syntezę mikrobiologiczną. Rynek ryboflawiny wynosi około 250 milionów US\$ rocznie. W ostatnich latach intensywnie rozwija się sektor biotechnologicznej produkcji ryboflawiny, który polega na wykorzystaniu genetycznie zmodyfikowanych bakterii i grzybów. W syntezie mikrobiologicznej wykorzystywane są wyselekcjonowane szczepy, których hodowla zoptymalizowana jest pod względem doboru składników pożywki oraz warunków hodowli. Substratami do hodowli i produkcji ryboflawiny są glukoza oraz tłuszcze, które generują duże koszty związane z produkcją ryboflawiny i wpływają na cenę gotowych preparatów. Zastosowanie wysokowydajnych szczepów mikroorganizmów z gatunków *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii* czy *Eremothecium* pozwala na przeprowadzenie fermentacji, jednocześnie znacznie redukując koszty produkcji i potencjalnego recyklingu substancji odpadowych. Perspektywicznymi producentami ryboflawiny są drożdże *C. famata* (Abbas and Sibimy, 2011).

Drożdże *C. famata* należą do grupy tzw. „drożdży flawinogennych”, zdolnych do nadprodukcji ryboflawiny w warunkach niedoboru żelaza. Niektóre szczepy *C. famata* należą do najbardziej aktywnych flawinogennych organizmów i do niedawna były wykorzystywane w przemysłowej produkcji ryboflawiny w USA. *C. famata* charakteryzuje się wysoką tolerancją na zasolenie, przy stężeniach NaCl do 2,5 M. Stosunkowo niedawno nastąpił rozwój podstawowych narzędzi do inżynierii metabolicznej *C. famata*, takich jak system transformacji, markery selekcyjne, mutageneza insercyjna, system reporterowy i inne. Opracowane narzędzia wykorzystuje się do klonowania i identyfikacji genów strukturalnych oraz regulatorowych syntezy ryboflawiny. Umożliwia to konstrukcję ulepszonych szczepów drożdży wytwarzających ryboflawinę, FMN i FAD, w oparciu o przemysłowe szczepy wytwarzające ryboflawinę (Dmytruk, Sibimy, 2012; Dmytruk et al., 2011, 2014; 2020).

Przez wiele lat drożdże *C. famata* uważano za anamorficzną odmianę *Debaryomyces hansenii*. Odróżniała je m. in. zdolność do nadprodukcji ryboflawiny u *C. famata*. Późniejsze badania wykazały, że obecnie *C. famata* i *D. hansenii* są różnymi gatunkami, a nie odmianami anamorficznymi i teleomorficznymi tego samego gatunku. *C. famata* można wyizolować z różnych źródeł naturalnych, ale najczęściej z przetworzonych produktów spożywczych. Rzadziej szczep ten pozyskiwany jest z

próbek klinicznych, zwykle związanych ze skórą. Testy asymilacji źródeł węgla dla *C. famata* są dodatnie dla glukozy, galaktozy, maltozy, sacharozy, trehalozy, D-ksylozy, melezitozy, glicerolu, rafinozy, celobiozy, L-arabinozy, D-mannitolu, D-glucitolu, rybitolu, salicyny, DL- kwasu mlekowego i kwasu bursztynowego; zmienne dla laktozy, melibiozy, erytrytolu, skrobi, L-ramnozy, D-arabinozy, L-sorbozy, D-rybozy, galaktitolu i kwasu cytrynowego; ujemne w stosunku do azotanu potasu i inozytolu (Dmytruk, Sibirny, 2012).

Wcześniej uzyskano już wysokowydajny szczep *C. famata* dzięki nadekspresji białka drożdży *Debaryomyces hansenii* IMH3 oraz własnych białek SEF1, RIB1, RIB7 (Dmytruk et al., 2011; 2014), a także genów biosyntezy purynowych nukleotydów de novo PRS3 oraz ADE4 (Dmytruk et al., 2020). Celem wynalazku jest uzyskanie nowego szczepu *C. famata*, zdolnego do bardziej wydajnej produkcji ryboflawiny. Wszystkie ulepszone szczepy wykazywały zdolność do nadprodukcji ryboflawiny w podłożu z glukozą lub sacharozą. Niedawno uzyskano także nadproducentów ryboflawiny *C. famata* poprzez nadekspersję genu drożdży *D. hansenii* RFE1 homologicznego genu ssaków BCRP, który koduje ekskretazę ryboflawiny. (Tsyrlunyk et al., 2020a).

Najbliższym do proponowanego sposobu wytwarzania ryboflawiny jest uzyskanie jej stabilnego super producenta *C. famata*, zawierającego dwie kopie genów SEF1, RIB1, RIB7 (Voronovski et al., 2010) oraz zwiększona ekskrecja ryboflawiny z komórek (Tsyrlunyk et al., 2020, a). Do hodowli producenta ryboflawiny należy używać drogich podłoży zawierających glukozę, pepton i ekstrakt drożdżowy (Tsyrlunyk et al., 2020, b).

Istota wynalazku polega na tym, że serwatkę o minimalnej zawartości laktozy na poziomie 3,2 do 5,1 % sterylizuje się w temperaturze od 118 do 123°C przez okres od 18 do 25 minut, a następnie filtruje się oddzielając wytrącone białka, po czym dodaje się związek, będący źródłem azotu w ilości od 1 do 4 g/l. Do tak przygotowanej serwatki dodaje się komórki *Candida famata* w fazie wzrostu logarytmicznego wypłukane z podłoża syntetycznego w ilości od 0,5 do 1 mg/l i prowadzi się hodowlę bez dostępu światła w temperaturze od 28 do 30°C, napowietrzając ją i mieszając przez okres od 120 do 240 h. pH hodowli utrzymuje się na poziomie 4,5 do 5,5,

dodając w razie potrzeby 10%-owy roztwór NaOH bądź 10%-owy roztwór H₂SO₄. W efekcie uzyskuje się od 0,95 do 1,2 g/l ryboflawiny.

Korzystnie źródłem azotu jest siarczan amonu.

Korzystnie hodowlę napowietrza się w ilości 1l/min.

Korzystnie hodowlę miesza się w wyrząsarce przy obrotach od 200 do 220 rpm.

Korzystnie hodowlę miesza się w bioreaktorze z prędkością nie mniejszą niż 700 rpm.

Główną zaletą rozwiązania według wynalazku jest uzyskanie ryboflawiny z wykorzystaniem odpadu produkcji mleczarskiej, jakim jest serwatka, obniżając tym samym znacznie koszt jej wytwarzania.

Rozwiązanie według wynalazku zilustrowano poniższymi przykładami wykonania.

Przykład 1

Oznaczenia dokonano przy użyciu spektrofotometru dla biomasy przy długości fali 590nm (absorbancja 3,4 odpowiada 1 mg/ml biomasy). Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność ryboflawiny, próbki rozcieńczano, a następnie ogrzewano przez minimum 30min w 80°C. Oznaczenie wykonywano przy długości fali 445nm, a stężenie RF obliczano ze wzoru:

$$RF = \frac{Abs_{445nm} \times rozc}{0,0306} \left[\frac{mg}{l} \right]$$

Przykład 2

Laktoza jest jednym z głównych składników serwatki. Zawartość tego cukru w serwatce wynosi 3,2-5,1%, a w serwatce skoncentrowanej – 15%. Aby przetestować zdolność do syntezy ryboflawiny szczepu *C. famata* hodowano na szalce Petriego na pożywce YPD w temperaturze 28°C przez 1 dzień. Uzyskaną hodowlę wysiano do kolb (100 ml) z 10 ml pożywki z serwatką, i inkubowano przez 4 dni na wstrząsarce kołowej przy prędkości 200 obr/min w temperaturze 28°C, a następnie określono zawartość ryboflawiny w płynie hodowlanym. Wyniki badań przedstawiono na rysunku Fig. 1.

Wzrost w pożywce z serwatką przy stężeniach laktozy 2,5 i 5% jest słabszy w porównaniu z pożywkami kontrolnymi YPD i YNB + ekstrakt drożdżowy, jednak po dodaniu dodatkowego źródła azotu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L badany szczep gromadzi do 10 mg/ml biomasy. Dodanie dodatkowego źródła azotu – siarczanu amonu do serwatki znacząco, bo nawet do 10 razy zwiększa produkcję ryboflawiny przez rekombinowany szczep zawierający dodatkowy gen RFE1, a akumulacja ryboflawiny w tej pożywce jest wyższa niż w bogatych podłożach YPD i YNB z dodatkiem ekstraktu drożdżowego i wynosi do 1,2 g/L. Gdy szczep *C. famata* BCRP hodowano w stężonej serwatce z 15% laktozy, nie zaobserwowano żadnego wzrostu, a dodatek siarczanu amonu tego nie zmienił.

Testowano wpływ innych źródeł azotu – mocznika, kombinacji mocznika i siarczanu amonu, fosforanu diamonu i difosforanu amonu - na zdolność do nadprodukcji ryboflawiny przez szczep *C. famata* BCRP. Wszystkie badane związki zawierające azot zwiększają produkcję ryboflawiny w pożywce z serwatką co pokazano na rysunku Fig. 2. Dlatego, aby uzyskać wysoki poziom ryboflawiny syntetyzowanej przez szczep *C. famata* BCRP w serwatce jako źródło azotu można użyć mocznika, połączenia mocznika i siarczanu amonu, siarczanu amonu, difosforanu amonu i fosforanu dwuamonowego.

Przykład 3

Aby zbadać skuteczność pobierania laktozy z pożywki przez szczep *C. famata* BCRP, przeprowadzono analizę zawartości tego cukru w pożywce przez 120 godzin hodowli. Skład chemiczny, czyli zawartość tłuszczu, białka i laktozy, kwaśnej serwatki określono za pomocą urządzenia Analizator Mleka na podczerwień (Infrared Milk Analyzer Bentley B-150, Bentley Instruments, USA). Podczas hodowli, stężenie laktozy w pożywce stopniowo maleje, jednak znaczna ilość, czyli ok. 1 % pozostaje, nawet po 100 godzinach hodowli. Na rysunku Fig. 3. pokazano powolne spożywanie laktozy przez szczep drożdży *C. famata* BCRP z nadekspresjonowanym genem RFE1.

Przykład 4

Serwatkę o zawartości laktozy wynoszącej 5 % sterylizowano w temperaturze 121°C przez 20 minut, a następnie filtrowano w celu oddzielenia wytrąconych białek. Do serwatki dodano siarczan amonu jako źródło azotu w ilości 3 g/l. Biomasa początkowa wynosiła 1 mg/ml i stanowiła komórki *Candida famata* w fazie wzrostu logarytmicznego wyplukane z podłoża syntetycznego o składzie: 1,7 g/l YNB, 0,05 g/l ekstraktu drożdżowego, 3 g/l siarczanu amonu, 20 g/l glukozy. Hodowlę prowadzono w bioreaktorze BioFlo115 firmy New Brunswick w trybie okresowym. Temperaturę utrzymywano na poziomie od 28 do 30°C, a pH w zakresie od 4,5 do 5,5 dodając w razie potrzeby 10%-owe roztwory NaOH bądź H₂SO₄ i mieszając z prędkością nie mniejszą niż 700 rpm. Jako czynnika przeciwpieniącego użyto preparatu Struktol 673. Hodowlę prowadzono przez 120 do 240 h w ciemności ze względu na negatywny wpływ światła na samą ryboflawinę. Uzyskano maksymalnie 950 mg/l ryboflawiny co ilustruje rysunek Fig. 4.