

**М.Т. Юрків¹, О.О. Куриленко¹,
Р.В. Васишин¹, К.В. Дмитрук¹, Н.Б. Мартинюк²,
В.В. Скороход², А.А. Сибірний¹**

¹ Інститут біології клітини НАН України, Львів

² Приватне акціонерне товариство «Ензим», Ладижин

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ ГЛУТАТІОНУ НА ОСНОВІ СКОНСТРУЙОВАНИХ АКТИВНИХ СУПЕРПРОДУЦЕНТІВ ЦЬОГО ТРИПЕПТИДУ У ДРІЖДЖІВ



За допомогою метаболічної інженерії сконструйовано штам метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* з посиленою експресією генів *GSH2*, що кодує γ -глутамілцистеїнсинтетазу, та *MET4*, що кодує транскрипційний активатор генів біосинтезу цистеїну (попередник синтезу глутатіону). Отриманий рекомбінантний штам характеризується підвищеною продуктивністю синтезу глутатіону порівняно із штамом дикого типу в лабораторних умовах. Було проведено оптимізацію синтезу глутатіону сконструйованого рекомбінантного штаму *H. polymorpha*. Розроблено напівпромислову модель технології отримання глутатіону з використанням сконструйованого дріжджового штаму-продуцента.

Ключові слова: глутатіон, дріжджі, *Hansenula polymorpha*, метаболічна інженерія.

Глутатіон (γ -L-глутаміл-L-цистеїніл-глїцин, GSH) — це біологічно активна речовина пептидної природи, що відіграє важливу роль у широкому спектрі клітинних реакцій. За рахунок наявності тіолових груп глутатіон у клітині виступає як донор електронів та забезпечує перебіг реакцій відновлення, при цьому він переходить в окислену форму (GSSG). Крім підтримки тіолового редокс-статусу глутатіон задіяний у детоксикації ендогенних та екзогенних металів і ксенобіотиків, депонуванні та транспорті цистеїну, біосинтезі білка та ДНК, транспорті амінокислот, які є важливими метаболітами для росту клітин еукаріот, регуляції клітинного циклу та ін. Глутатіон є кофактором ряду ферментів і основним джерелом

азоту і сірки в умовах їх виснаження в навколишньому середовищі [1]. Також він відіграє важливу роль у захисті організму від бактерій, паразитів та вірусів. Дефіцит глутатіону в людини асоційований з рядом медичних розладів, викликаних оксидативним стресом, отруєнням або послабленою імунною системою. Ці порушення включають нейродегенеративні захворювання, рак, катаракту, цироз печінки, захворювання легень, запалення шлунково-кишкового тракту і підшлункової залози та гемолітичну анемію.

Глутатіон широко використовується у медичній, косметологічній та харчовій промисловості. Протягом останнього десятиліття застосування глутатіону у складі різноманітних косметичних засобів швидко зростає. Глутатіон використовується як компонент емульгаторів, олійних речовин і зволожувачів в першу чергу для підвищення відбілюючого ефекту для

шкіри, а також у складі сонцезахисних засобів та як компонент кремів проти старіння, оскільки встановлено, що з віком у людини співвідношення GSH/GSSG знижується [2].

Глутатіон застосовується як інгредієнт в різних харчових продуктах, включаючи хлібо-булочні вироби, алкогольні та безалкогольні напої, сухі сніданки, сири, приправи, молочні продукти, жири, олії, соуси та м'ясо. На сьогоднішній день попит на продукцію глутатіону в промислових масштабах зростає. Світове виробництво кристалічного глутатіону та дріжджового екстракту, збагаченого глутатіоном (до 15 %), перевищує 500 і 2500 тонн в рік. Відповідно ринок глутатіону сягає 1 млрд. дол. США в рік.

Біотехнологічне виробництво глутатіону здійснюється з використанням ензиматичних методів або шляхом ферментації природних чи генетично модифікованих мікроорганізмів, таких, як *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*. Серед ряду мікроорганізмів, здатних до накопичення значних кількостей глутатіону, найбільш широко використовуються дріжджі *S. cerevisiae* та *C. utilis*. Переваги застосування цих дріжджів полягають у природній здатності накопичувати високі внутрішньоклітинні концентрації глутатіону, швидкому рості і досягненні високої густини клітинної біомаси. Процес культивування дріжджів здійснюється на дешевих середовищах та піддається масштабуванню [3]. Одним з основних недоліків у використанні дріжджів для промислового виробництва глутатіону є складні механізми регуляції, що обмежують його надсинтез.

Термотолерантні метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* з природньо високим вмістом глутатіону та стійкістю до різних видів стресу розглядаються як перспективний об'єкт для конструювання конкурентного продуцента цього трипептиду [4]. У метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* глутатіон бере участь у детоксикації токсичних продуктів катаболізму метанолу. Для цього виду дріжджів детально роз-

роблено підходи метаболічної інженерії. Нещодавно було завершено секвенування геному *H. polymorpha* та сформовано базу даних, що створює передумови для ідентифікації та функціонального дослідження генів, які задіяні в регуляції біосинтезу глутатіону, його транспорту в клітину та деградації. У зв'язку з цим метилотрофні дріжджі є перспективними організмами для конструювання промислових продуцентів цього трипептиду.

Підвищення ефективності виробництва за рахунок зниження собівартості продукції має важливе значення для зниження цін на глутатіон. Однією з основних передумов для ефективного виробництва мікробного глутатіону є його максимально високий вміст в клітині дріжджів та здатність накопичувати мікробну біомасу у високій концентрації.

Застосування методів метаболічної інженерії дало змогу одержати рекомбінантні штами *H. polymorpha* з підвищеною продуктивністю синтезу глутатіону. Зокрема встановлено, що посилення експресії як гену *GSH2*, що кодує γ -глутамілцистеїнсинтетазу, так і *MET4*, що кодує транскрипційний активатор генів біосинтезу цистеїну (попередник синтезу глутатіону), стимулює синтез глутатіону у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* [5]. У даній роботі представлено дослідження одночасного посилення експресії генів *GSH2* та *MET4* у *H. polymorpha*, а також оптимізацію умов синтезу глутатіону, що дозволить забезпечити максимальну його продукцію.

МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Штами мікроорганізмів та поживні середовища

У роботі використовували штами дріжджів *H. polymorpha* DL-1 (*leu2*), DL-1 ($\Delta ura3, \Delta trp1::URA3, leu2::mcGSH2_{CBS}::LEU2, \Delta trp1::TRP1_{PCR}$) [5]. Клітини дріжджів вирощували при $t = 37^\circ\text{C}$ у багатому середовищі YPD (1 % пептон, 1 % дріжджовий екстракт, 2 % глюкоза), мінімальному середовищі YNB (0,17 % Yeast Nitrogen Base, 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 % глюкоза) або мінеральному середовищі такого складу

(г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5; KH_2PO_4 – 3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; глюкоза – 2; мікроелементи (мг/л): EDTA – 15; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 4,5; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; 1 мг/л $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,3; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 4,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 3; $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; H_3BO_3 – 1; KI – 0,1. Для мінерального середовища окремо готували 1000-кратний розчин вітамінів (на 10 мл (мг): біотин – 0,5; пантотенова кислота – 10; нікотинова кислота – 10 мг; інозитол – 250; тіамін – 10; піридоксин – 10; параамінобензойна кислота – 2), який стерилізували холодною стерилізацією та додавали до середовища після автоклавовання. Після стерилізації (за необхідності) до середовища також стерильно додавали тетрациклін (20 мг/л). Агаризовані середовища містили бактеріологічний агар (2 %). Бактерійний штам *Escherichia coli* DH5 α ($\Phi 80$ *dlacZ*Δ*M15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*rK⁻*, *mK⁺*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*) U169) вирощували при $t = 37^\circ\text{C}$ у багатому середовищі LB (1,5 % пептон, 0,5 % дріжджовий екстракт, 1 % NaCl; $pH = 7,0$).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано стандартні молекулярно-генетичні методи [6]. Геномну ДНК *H. polymorpha* ізолювали за допомогою Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції і лігаза використовувалися згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Виділення плазмідної ДНК з *E. coli* проводилося за допомогою Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) з використанням Platinum® Taq DNA Polymerase (Fermentas) згідно з інструкцією виробника. Трансформацію *H. polymorpha* проводили методом електротрансформації [7]. Біомасу дріжджів визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Helios γ ($\lambda = 600$ нм, кювета 1 см), розраховуючи суху

вагу за калібрувальною кривою. Оптичну густину суспензії клітин дріжджів для трансформації визначали при 663 нм, для визначення глутатіону – при 420 нм, для визначення білка – при 750 нм.

Для дослідження рівня синтезу глутатіону штами дріжджів вирощували в аеробних умовах в колбах об'ємом 100 мл, що містили 30 мл середовища YNB при 37°C . Умов аерації досягали перемішуванням зі швидкістю 220 об./хв. Вихідна оптична густина клітин, інокульованих у середовище, становила $A_{600} = 0,1$. Культивування проводили протягом 5 днів, зразки на визначення глутатіону відбирали кожної доби. Визначали загальний вміст глутатіону (GSH + GSSG), як описано в [5].

Для оптимізації та підбору умов надсинтезу глутатіону штами дріжджів також вирощували в колбах об'ємом 100 мл, що містили 30 мл середовища YPD або YNB з додаванням 0,5 % дріжджового екстракту, при 37°C в аеробних умовах (220 об./хв). Вихідна оптична густина клітин, інокульованих у середовище, становила $A_{600} = 0,1$. Для дослідження впливу аерації на продукцію глутатіону штами вирощували в умовах перемішування при 200 об./хв та 300 об./хв під час культивування в колбах, що містили 1/3 або 1/6 об'єму середовища. Вихідна оптична густина клітин, інокульованих у середовище, становила $A_{600} = 1$ або 4.

Перевірка здатності до росту і синтезу глутатіону проводилася при вирощуванні в біореакторі об'ємом 100 л. Початковий об'єм середовища становив 70 л. Середовище готували на неочищеній воді. Проводили контроль і дотитривовування pH середовища до значення 5,5. Після стерилізації до середовища також стерильно додавали тетрациклін (20 мг/л). Стартову культуру штаму *H. polymorpha* mcGSH2/MET4 нарощували на середовищі YNB з додаванням дріжджового екстракту (YNB – 1,7 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5 г/л, глюкоза – 20 г/л, дріжджовий екстракт – 0,5 %) в колбах Ерленмейера об'ємом 2 л у повітряному шейкері-інкубаторі при 220 об./хв та 37°C протягом 24 год для

одержання оптичної густини $A_{600} = 10-12$. Вихідна оптична густина клітин, інокульованих у середовище у біореакторі, становила $A_{600} = 1$. Культивування проводилося в мінеральному середовищі за умов аерації (1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища), перемішуванні 200 об./хв та $pH = 5,0-5,5$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Отримання штамів-надсинтетиків глутатіону у дріжджів *H. polymorpha* за допомогою метаболічної інженерії

Синтез глутатіону у дріжджів відбувається у двох послідовних реакціях за участю γ -глутамілцистеїнсинтетази та глутатіонсинтетази. Перший фермент є лімітуючим у процесі біосинтезу за рахунок зворотнього інгібування кінцевим продуктом, тобто глутатіоном, запобігаючи надмірному накопиченню цього трипептиду в клітині [8]. Механізми регуляції біосинтезу глутатіону у метилотрофних дріжджів (зокрема у *H. polymorpha*) та забезпечення гомеостазу цього трипептиду у клітині залишаються в багатьох аспектах недостатньо дослідженими. Однак було встановлено, що посилення експресії окремо як гена *GSH2*, що кодує γ -глутамілцистеїнсинтетазу, так і *MET4*, що кодує транскрипційний активатор генів біосинте-

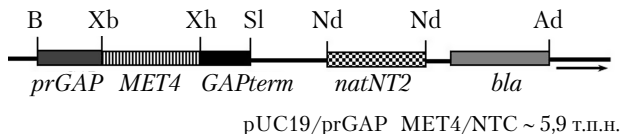


Рис. 1. Лінійна схема плазміди pUC19/prGAP_MET4/NTC: *prGAP* – промотор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; *GAPterm* – термінатор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; *natNT2* – ген стійкості до норзетрицину; *MET4* – ген, що кодує транскрипційний фактор, залучений у біосинтез цистеїну. Скорочення сайтів рестрикції: B, BamHI; Xb, XbaI; Xh, XhoI; Sl, SalI; Nd, NdeI; Ad, AdhI

зу цистеїну (попередник синтезу глутатіону), стимулює синтез глутатіону у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* [5, 9]. Отже, перспективним є одночасне посилення експресії генів *GSH2* та *MET4*, а також оптимізація умов синтезу глутатіону, що дозволить забезпечити максимальну його продукцію. Для отримання рекомбінантних штамів дріжджів *H. polymorpha* з посиленою експресією транскрипційного активатора Met4 було сконструйовано плазміду pUC19/prGAP_MET4/NTC (рис. 1).

З метою пошуку послідовності нуклеотидів гена *MET4* *H. polymorpha* було проведено комп'ютерний аналіз з використанням бази даних цього виду дріжджів (<http://genome.jgi-psf.org/Hanpro2>). За допомогою ПЛР з геном-

Таблиця 1

Послідовності нуклеотидів використаних у роботі праймерів

Назва	Послідовність нуклеотидів 5'-3'
Ко644	CGC GGA TCC TAG ACC ACA TCC GTG CAC CAG
Ко645	GTA AAT ATG TAG ATG GAG CCG AGC CTC GAG CCC GGG GCG GCC GCT CTA GAT TTG TTT CTA TAT TAT CTT TGT ACT AAA G
Ко646	CTT TAG TAC AAA GAT AAT ATA GAA ACA AAT CTA GAG CGG CCG CCC CGG GCT CGA GGC TCG GCT CCA TCT ACA TAT TTA C
Ко647	CGC GTC GAC CTG CCA CGA GGT ACC ACA AAG
ОК42	CGC CAT ATG ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA T CT TAA CTA TGC GGC ATC AGA G
ОК43	CGC CAT ATG ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TCC GAG ATT CAT CAA CTC ATT GC
Ко655	TAG TCT AGA ATG TGT GGC GCA GTA TGG C
Ко656	AAA GCG GCC GCC TAG TTT GGC TTC GGG AAA C

ної ДНК *H. polymorpha* було ампліфіковано ген *MET4*. Нативний промотор даного гена було замінено сильним конститутивним промотором гена *GAP1 H. polymorpha*, що кодує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу. На першому етапі промотор та термінатор гена *GAP1* були ампліфіковані з геномної ДНК *H. polymorpha* за допомогою ПЛР, використовуючи відповідні пари праймерів Коб44/Коб45 та Коб46/Коб47 (табл. 1).

Отримані фрагменти були з'єднані за допомогою ПЛР з використанням праймерів Коб44 та Коб47. Амплікований фрагмент розміром 0,8 т.п.н. було оброблено ендонуклеазами рестрикції *VamHI* та *SallI*. В результаті сконструйована плазмідна отримала назву рUC19/prGAP. На наступному етапі ген стійкості до норзеотрицину *natNT2* було ампліфіковано з плазмиди рRS41N [10] за допомогою ПЛР, використовуючи праймери ОК42/ОК43. Отриманий фрагмент розміром 1,3 т.п.н. було оброблено ендонуклеазою рестрикції *NdeI* і клоновано у *NdeI*-лінеаризовану плазмиду рUC19/GAP. В результаті сконструйована плазмідна отримала назву рUC19/prGAP/NTC. Ген *MET4* було ампліфіковано з геномної ДНК *H. polymorpha* за допомогою ПЛР, використовуючи праймери Коб55 та Коб77 і клоновано у *XbaI/NotI*-лінеаризований вектор рUC19/prGAP/NTC. В результаті сконструйована плазмідна отримала назву рUC19/prGAP_MET4/NTC (рис. 1).

Сконструйовану плазмиду рUC19/prGAP_MET4/NTC було використано для посилення експресії гена *MET4* в найкращих з наявних рекомбінантних штамів *H. polymorpha*, здатних до надсинтезу глутатіону. Як вихідний було використано рекомбінантний штам з посиленою експресією гена *GSH2 H. polymorpha* під контролем нативного промотора, що характеризувався підвищеним рівнем синтезу глутатіону на середовищі з глюкозою порівняно із штамом дикого типу [5].

Вектор рUC19/prGAP_MET4/NTC було введено в обраний штам *H. polymorpha* методом електропорації [7]. Селекцію трансформантів проводили на багатому поживному середовищі YPD з додаванням норзеотрицину (100 мг/л). Для отримання стабільних рекомбінантних штамів трансформанти культивували в неселективних умовах з подальшим відбором клонів, які зберігали здатність рости на середовищі з антибіотиком. В отриманих стабільних трансформантів інтеграція плазмиди у геном була підтверджена методом ПЛР з використанням відповідної пари праймерів Коб44/Коб77. Було визначено ефективність синтезу глутатіону відібраних стабільних трансформантів. Умови культивування та метод визначення глутатіону описані у попередньому розділі (див. Методи досліджень).

Рекомбінантний штам *H. polymorpha* з посиленою експресією генів *GSH2* та *MET4* (mcGSH2/MET4) характеризувався підвище-

Таблиця 2

Продуктивність синтезу внутрішньоклітинного та позаклітинного глутатіону штамми *H. polymorpha* на мінімальному середовищі YNB з глюкозою (2 %) на 24 та 96 год культивування в аеробних умовах

Штам	Глутатіон			
	Внутрішньоклітинний, нмол/мг білка		Позаклітинний, нмол/л	
	24 год	96 год	24 год	96 год
WT	160 ± 1,7	110 ± 1,2	4 ± 0,05	60 ± 0,7
mcGSH2	250 ± 2,6	350 ± 3,7	5 ± 0,05	169 ± 1,8
mcGSH2/MET4	210 ± 2,2	836 ± 8,5	5 ± 0,05	221 ± 2,3

ною продуктивністю синтезу внутрішньоклітинного та позаклітинного глутатіону на 96 год культивування порівняно зі штамом «дикого» типу *H. polymorpha* DL-1 (WT) у 7,6 та 3,7 рази відповідно, а також зі штамом з надекспресією гена *GSH2* (mcGSH2) у 2,4 та 1,3 рази відповідно (табл. 2).

Підбір та оптимізація умов надсинтезу глутатіону одержаними штамми в лабораторних умовах

Для отримання максимальної продукції глутатіону актуальним є встановлення оптимальної комбінації факторів, що впливають на його синтез при вирощуванні штаму-продуцента. Найкращий з отриманих рекомбінантних штамів з посиленою експресією генів *GSH2* та *MET4* (mcGSH2/MET4) *H. polymorpha* було використано для оптимізації виходу цільового продукту. Зокрема, було перевірено вплив факторів, що є ключовими детермінантами синтезу глутатіону: склад середовища, біомаса, аерація, *pH*, час культивування. Було встановлено, що максимальна продукція глутатіону спостерігалася при культивуванні у мінімальному середовищі YNB, натомість додавання дріжджового екстракту мало негативний вплив, ймовірно, інгібуючи активність ферментів, залучених у біосинтез глутатіону (табл. 3).

Однак вартість мінімального середовища YNB є достатньо високою, що значно підвищує вартість кінцевого продукту — глутатіону. Тому актуальним було дослідження синтезу глутатіону при вирощуванні штаму-продуцента у більш дешевому мінеральному середовищі. Рівень синтезу глутатіону при культивуванні у мінеральному середовищі був на 10–15 % нижчим порівняно з середовищем YNB (табл. 3). Важливими факторами, що впливають на продукцію глутатіону, є початкова біомаса штаму-продуцента, концентрація цукру в середовищі, аерація. Встановлено, що рівень синтезу глутатіону був у 2 рази вищим під час росту культури з меншою стартовою біомасою ($A_{600} = 1$), в той час як концентрація цукру в середовищі не мала суттєвого впливу на про-

дукцію глутатіону (табл. 3). Досліджено вплив аерації на продукцію глутатіону в умовах перемішування при 200 об./хв та 300 об./хв під час культивування в колбах, що містили 1/3 або 1/6 об'єму середовища. Було показано, що збільшення аерації не пригнічувало рівень синтезу глутатіону, однак і не призводило до його суттєвого покращення.

Одним з лімітуючих факторів синтезу глутатіону є наявність його попередників, а саме сірковмісної амінокислоти цистеїну. Нами було досліджено індукцію синтезу глутатіону після додавання 1 ммоль цистеїну у мінеральне середовище з 2%-ою глюкозою. Вихідна оптична густина клітин, інокульованих у середовище, становила $A_{600} = 1$. Було встановлено, що

Таблиця 3

Продуктивність синтезу внутрішньоклітинного глутатіону рекомінантним штамом *H. polymorpha* mcGSH2/MET4 на 24 та 48 год культивування в різних середовищах

Середовище	Внутрішньоклітинний глутатіон, нмол/мг білка	
	24 год	48 год
YPD	147 ± 1,5	209 ± 2,4
YNB + 0,5 % YE	200 ± 2,3	226 ± 2,5
YNB	332 ± 3,5	389 ± 4,1
MC (2 % глюкоза)	323 ± 3,3	365 ± 3,8
MC (5 % глюкоза)	431 ± 4,5	437 ± 4,6

Таблиця 4

Продуктивність синтезу внутрішньоклітинного глутатіону рекомінантним штамом *H. polymorpha* mcGSH2/MET4 в мінеральному середовищі за відсутності цистеїну та з додаванням цієї амінокислоти на 20 год культивування

Середовище	Внутрішньоклітинний глутатіон, нмол/мг білка	
	20 год	23 год
MC (2 % глюкози)	320 ± 3,3	329 ± 3,4
MC (2 % глюкози) + 1 ммоль цистеїну	326 ± 3,4	568 ± 5,9

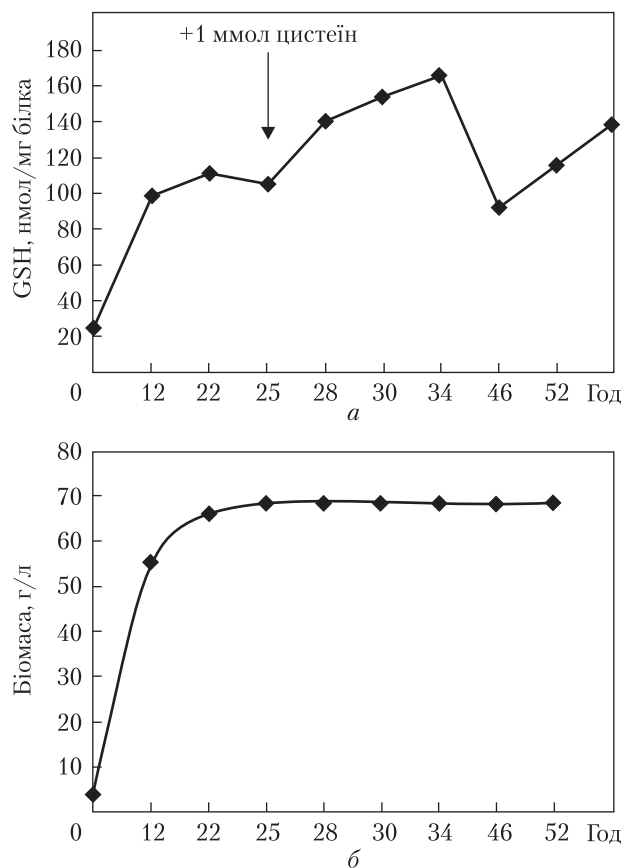


Рис. 2. Динаміка синтезу внутрішньоклітинного глутатіону (а) та біомаси (б) штамом *H. polymorpha* mcGSH2/MET4 під час культивування у біореакторі на мінеральному середовищі (МС) з додаванням цистеїну

додавання цистеїну активувало синтез глутатіону вже через 3 год, призводячи до його підвищення у 1,7 рази (табл. 4).

Підібрані оптимальні умови для ефективного вирощування штаму-продуцента було використано для розробки тимчасових інструкцій для апробації технології виробництва глутатіону та масштабування процесу в промислових умовах.

Масштабування процесу синтезу глутатіону та розробка напівпромислового регламенту отримання глутатіону

Розроблений для сконструйованого штаму-продуцента глутатіону лабораторний регла-

мент ферментації було адаптовано до промислових умов на приватному акціонерному товаристві «Ензим» (м. Ладижин, Вінницька обл.). Перевірка здатності до росту і синтезу глутатіону проводилася при вирощуванні в біореакторі об'ємом 100 л. Початковий об'єм мінерального середовища становив 70 л. Вихідна оптична густина клітин, інокульованих у середовище у біореакторі, становила $A_{600} = 1$. Культивування проводилося на мінеральному середовищі в умовах аерації (1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища), при перемішуванні 200 об./хв та $pH = 5,0-5,5$. Протягом культивування проводився мікроскопічний та мікробіологічний контроль чистоти культури, контроль pH , температури, вмісту цукру у середовищі, продукції біомаси та цільового продукту. На 20 год культивування у середовище вносили цистеїн у концентрації 1 ммоль/л. Тривалість ферментації становила 58 год. Культивування у біореакторі дозволило досягти більшого, ніж у колбах, виходу біомаси продукцента. Швидкість росту також була вищою і як наслідок стаціонарна фаза була досягнута вже на 20 годину інкубації (рис. 2, б).

Встановлено, що максимальна продукція глутатіону спостерігалася на 28–34 год культивування через 3–9 год після додавання 1 ммоль/л цистеїну і становила близько 150 нмоль/мг білка (або 1350 мг/л) (рис. 2, а).

Одним з найкращих відомих продуцентів глутатіону є рекомбінантний штам дріжджів *S. cerevisiae* G-14, здатний синтезувати близько 1620 г/л глутатіону на 52 год ферментації в біореакторі об'ємом 5 л. Оптимізація процесу біосинтезу шляхом додавання цистеїну дозволила досягнути у цього штаму продукції глутатіону 2020 мг/л на 38 год культивування [11]. Проте збільшення об'ємів при культивуванні зазначеного штаму не проводилося, що до певної міри ускладнює оцінку виробництва глутатіону у промислових масштабах.

Нами сконструйовано надпродуценти глутатіону на основі дріжджів *H. polymorpha* шля-

хом коекспресії генів *GSH2* та *MET4*, а також вперше здійснено масштабування процесу синтезу глутатіону для рекомбінантних штамів дріжджів *H. polymorpha* в біореакторі об'ємом 100 л. Отримані результати свідчать про високий потенціал дріжджів *H. polymorpha* як продуцентів глутатіону в промислових масштабах з перспективою їх подальшого покращення за допомогою методів метаболічної інженерії.

ВИСНОВКИ

Із застосуванням методів метаболічної інженерії було сконструйовано штами-надпродуценти глутатіону метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* за рахунок посилення експресії гена *GSH2*, що кодує γ -глутамілцистеїнсинтетазу, та *MET4*, що кодує транскрипційний активатор генів біосинтезу цистеїну (попередник синтезу глутатіону).

Показано, що рекомбінантні штами *H. polymorpha* з посиленою експресією генів *GSH2* та *MET4* характеризуються суттєво підвищеною продуктивністю синтезу глутатіону порівняно зі штамом дикого типу *H. polymorpha* DL-1 за лабораторних умов. Було проведено оптимізацію синтезу глутатіону сконструйованими штамми *H. polymorpha* в лабораторних умовах. Зокрема, досліджено вплив факторів, що є ключовими детермінантами виходу кінцевого продукту — глутатіону: склад середовища, аерація, *pH*, час культивування.

Встановлено, що максимальна продукція глутатіону спостерігається на мінімальному середовищі в умовах аерації (200 об./хв) після додавання 1 ммоль/л цистеїну.

Випробування найкращих продуцентів глутатіону було здійснено в напівпромислових умовах в ферментері об'ємом 100 л. Максимальний синтез глутатіону спостерігався на 28–34 год культивування через 3–9 год після додавання 1 ммоль/л цистеїну і становив 150 нмоль/мг (або 1350 мг/л) білка.

ЛІТЕРАТУРА

1. Penninckx M.J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental,

and oxidative stresses // *Enzyme Microb Technol.* — 2000. — 26. — P. 737–742.

2. Pocsí I., Prade R., Penninckx M. Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi // *Advances in Microbial Physiology.* — 2004. — V. 49. — P.13–86.

3. Li Y., Wei G., Chen J. Glutathione: a review on biotechnological production // *Applied Microbiology and Biotechnology.* — 2004. — P. 305–315.

4. Gellisen G. *Hansenula polymorpha* — biology and applications. — Weinheim: Wiley VCH; 2002.

5. Ubiyovok V.M., Ananin V.M., Malyshev A.Y. et al. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1 // *BMC Biotechnol.* — 2011. — V. 11. — P. 8.

6. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory // Cold Spring Harbor, New York. — 1989.

7. Faber K.N., Haima P., Harder W. et al. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet.* — 1994. — 25. — P. 305–310.

8. Griffith O., Mulcahy R. The enzyme of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase // *Advances in enzymology and related aress of molecular biology.* — 1999. — V. 73. — P. 209–267.

9. Grabek-Lejko D, Kurylenko O.O, Sibirny V.A. et al. Alcoholic fermentation by wild-type *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* versus recombinant strains with an elevated level of intracellular glutathione // *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* — 2011. — 38(11). 1853–9.

10. Taxis C., Knop M. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques.* — 2006. — 40. — P. 73–78.

11. Wang Z., Tan T., Song J. Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production // *Process Biochemistry.* — 2007. — 42. — P. 108–111.

REFERENCES

1. Penninckx M.J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb Technol.* 2000, 26: 737–742.

2. Pocsí I., Prade R., Penninckx M. Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi. *Advances in Microbial Physiology.* 2004, V. 49: 13–86.

3. Li Y., Wei G., Chen J. Glutathione: a review on biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2004: 305–315.

4. Gellisen G. *Hansenula polymorpha* — biology and applications. Weinheim: Wiley VCH; 2002.

5. Ubiyvovk V.M., Ananin V.M., Malyshev A.Y. et al. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *BMC Biotechnol.* 2011, V.11: 8.
6. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. *Cold Spring Harbor*, New York. 1989.
7. Faber K.N., Haima P., Harder W. et al. *Highly-efficient electrotransformation of the yeast Hansenula polymorpha.* *Curr Genet.* 1994, 25: 305–310.
8. Griffith O., Mulcahy R. The enzyme of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology.* 1999, V. 73: 209–267.
9. Grabek-Lejko D, Kurylenko O.O, Sibirny V.A. et al. Alcoholic fermentation by wild-type *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* versus recombinant strains with an elevated level of intracellular glutathione. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 2011, 38(11): 1853-9.
10. Taxis C., Кноп М. *System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for Saccharomyces cerevisiae.* *BioTechniques.* 2006, 40: 73–78.
11. Wang Z., Tan T., Song J. Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production. *Process Biochemistry.* 2007, 42: 108–111.

М.Т. Юрків¹, Е. А. Куриленко¹,
Р.В. Василюшин¹, К.В. Дмитрук¹, Н.Б. Мартинюк²,
Скорород В.В.², А.А. Сибирный¹

¹Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

²Частное акционерное общество «Энзим», Ладыжин

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
ПРЕПАРАТОВ ГЛУТАТИОНА
НА ОСНОВЕ СКОНСТРУИРОВАННЫХ
АКТИВНЫХ СУПЕРПРОДУЦЕНТОВ ЭТОГО
ТРИПЕПТИДА У ДРОЖЖЕЙ

С помощью метаболической инженерии сконструирован штамм метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*

с усиленной экспрессией генов *GSH2*, кодирующего γ -глутамилцистеинсинтетазу, и *MET4*, кодирующего транскрипционный активатор генов биосинтеза цистеина (предшественник синтеза глутатиона). Полученный рекомбинантный штамм характеризовался повышенной продуктивностью синтеза глутатиона в сравнении со штаммом дикого типа в лабораторных условиях. Проведена оптимизация синтеза глутатиона сконструированного рекомбинантного штамма *H. polymorpha*. Разработана полупромышленная модель технологии получения глутатиона с использованием сконструированного дрожжевого штамма-продукента.

Ключевые слова: глутатион, дрожжи, *Hansenula polymorpha*, метаболическая инженерия.

М.Т. Yurkiv¹, O.O. Kurylenko¹,
R.V. Vasylyshyn¹, K.V. Dmytruk¹, N.B. Martyniuk²,
V.V. Skorohod², A.A. Sybirny¹

¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Lviv

²Joint Stock Company «Enzyme», Ladyzhyn

DEVELOPMENT OF GLUTATHIONE
PRODUCTION TECHNOLOGY BASED
ON CONSTRUCTED ACTIVE YEAST
OVERPRODUCERS

Recombinant *Hansenula polymorpha* strain overexpressing both *GSH2* gene, encoding γ -glutamylcysteine synthetase, and *MET4* gene, coding for transcription activator of genes involved in cysteine biosynthesis (precursor of glutathione) was obtained applying metabolic engineering approaches. Constructed recombinant strain was characterized by significantly increased glutathione production as compared to the wild type strain in laboratory conditions. Conditions for efficient glutathione production by recombinant *H. polymorpha* strain were optimized. A semi-industrial model for glutathione production using constructed *H. polymorpha* overproducer was developed.

Keywords: glutathione, yeast, *Hansenula polymorpha*, metabolic engineering.

Надійшла 19.06.2015