

растений (за счет более высокого содержания ненасыщенных жирных кислот) может модулировать конформацию белков-сенсоров, участвующих в передаче сигналов при действии стрессовых факторов, и, как следствие, приводит к активации защитной системы растений.

#### **Резюме**

Были сконструированы гибридные гены *desA-licBM3* и *desC-licBM3*. Эти гены были клонированы в растительные экспрессионные вектора, которыми далее были трансформированы растения картофеля *Solanum tuberosum*. Показано, что гибридные гены экспрессируются в растительных трансформантах и при этом десатуразы и лихеназа сохраняют свои основные свойства. Продемонстрировано, что экспрессия гетерологичных десатураз в растениях приводит к увеличению ненасыщенных жирных кислот, что коррелирует с более высокой толерантностью растений к воздействию стрессовых факторов.

Hybrid genes *desA-licBM3* and *desC-licBM3* were constructed. These hybrid genes were cloned in plant expression vectors and were introduced into *Solanum tuberosum*. It was shown that hybrid genes expressed in transgenic plants and desaturases and lichenase save their main behaviors consisting hybrid genes. It was demonstrated that expression of heterological desaturases into plants led to increase unsaturated fat acids and this correlate with high level of plant tolerance to set stress factors.

**ЯЦИШИН В.Ю., ФЕДОРОВИЧ Д.В., ВОРОНОВСЬКИЙ А.Я., СИБІРНИЙ А.А.**

*Інститут біології клітини НАН України,*

*Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: [yatsyshyn.v@gmail.com](mailto:yatsyshyn.v@gmail.com)*

### **ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ СИНТЕЗУ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA***

Флавінові кофактори: флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД) є похідними рибофлавіну (РФ) та задіяні у багатьох реакціях, необхідних для основних метаболічних процесів (аеробне та анаеробне дихання, фотосинтез, денітрифікація, репарація ДНК, біолюмінесценція). Флавопротеїни залучені в метаболізм вуглеводів, ліпідів, білків, синтез вітамінів В<sub>6</sub> та В<sub>12</sub>, а також у метаболізм заліза. Препарати флавінових нуклеотидів мають медичне значення і використовуються як реагенти у біохімії.

Відомо багато мікроорганізмів, здатних до надсинтезу попередника флавінових нуклеотидів – РФ, але досі не описано жодного природного надсинтетика ФМН чи ФАД. Лише мутанти гриба *Emmenthosium ashbyi* здатні продукувати деякі кількості ФАД у суміші з РФ. Нами було вперше сконструйовано рекомбінантні штами флавіногенних дріжджів *Candida famata* з надекспресованим геном *FMN1* (кодує РФ-кіназу – фермент, який каталізує фосфорилування РФ до ФМН), здатні до надсинтезу ФМН [2], що продукували в 1000 разів більше цього нуклеотиду, ніж штам дикого типу. Як відомо [8], одним із ефективних способів підвищення продуктивності процесу надсинтезу бажаних метаболітів є, окрім методів генетичної інженерії, підбір оптимального складу середовища культивування та умов ферментації.

У роботі наведено дані про вплив різних факторів на процес біосинтезу ФМН отриманими нами рекомбінантними штамми *C. famata* з надекспресованим геном *FMN1* за умов інкубації визначеної кількості клітин. Підібрано оптимальне джерело і концентрацію вуглецю (сахароза) та азоту (сечовина). Встановлено, що оптимальною для нагромадження ФМН є 24 годинна інкубація.

## Матеріали та методи

У роботі використовували отриманий нами раніше рекомбінантний штам дріжджів *Candida famata* 13-76, що містить додаткові гени *FMN1 D. hansenii* під контролем промотора *TEF1 C. famata*. Схема конструювання плазмід із геном *FMN1* під контролем промотора *TEF1* та отримання трансформантів описані в [2].

Дріжджі вирощували при 300С у багатому середовищі YPD (дріжджовий екстракт, 0,5%; пептон, 1%; глюкоза, 2%) та мінімальному середовищі Беркгольдера, що містило 5 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [4].

Вміст флавінів у культуральній рідині визначали флуориметрично на флуорометрі Turner Quantech FM 109510-33 після хроматографічного розділення, із використанням синтетичного РФ як стандарту [5].

Дані представлено як середнє  $\pm$  похибка середнього ( $M \pm m$ ). Статистичну обробку здійснювали із використанням коефіцієнта Ст'юдента. Математичне опрацювання результатів виконували за допомогою програмного пакета Microsoft Office Excel 2003.

## Результати та обговорення

Раніше нами було показано, що надекспресія гену *FMN1* дріжджів *C. famata*, шляхом заміни його нативного промотора на сильний конститутивний промотор *TEF1*, призводить до суттєвого зростання активності РФ-кінази та виникнення надсинтезу ФМН у рекомбінантних штамів, що містять такий модифікований ген [2, 3]. Отримані штами-надсинтетики продукують ФМН, однак кількості цільового продукту недостатні для використання цих штамів у промисловості. Як шляхи підвищення синтезу ФМН ми розглядаємо введення додаткових копій гену *FMN1* у геном надсинтетика, пригнічення гідролітичної активності фосфатаз, що можуть розщеплювати новоутворений продукт, а також оптимізацію умов культивування.

Компоненти середовища підбирали шляхом інкубації клітин рекомбінантного штаму *C. famata* 13-76 у середовищі вибраного складу (як основа використовувалось модифіковане синтетичне середовище Беркгольдера [4]). Перед цим дріжджі вирощували протягом 1,5 діб для нагромадження біомаси. Клітини «виброджували» у середовищі без джерела вуглецю або без джерела азоту протягом 6 год. (2 генерації). Отриманий таким чином інокулят інкубували протягом 15-70 год. у середовищі з різними джерелами вуглецю і азоту.

Відомо, що коло джерел вуглецю, які використовуються дріжджами, надзвичайно велике, але найкраще засвоюються моно- та дисахариди. Для перевірки впливу на синтез ФМН джерела вуглецю ми використали лише сахарозу та глюкозу як субстрати, які забезпечують добрий ріст *C. famata*.

Виявилось, що інкубація в середовищі, де джерелом вуглецю була сахароза, дає змогу отримати лише на 8% більше ФМН, ніж інкубація з глюкозою (рис. 1). Таким чином, значної різниці між випробуваними субстратами помічено не було, як джерело вуглецю в подальших експериментах використовували сахарозу, як стандартний компонент вихідного середовища. Однак, концентрацію цього компонента було підвищено до 30 г/л, оскільки саме за таких умов у культуральне середовище виділялося найбільше ФМН.

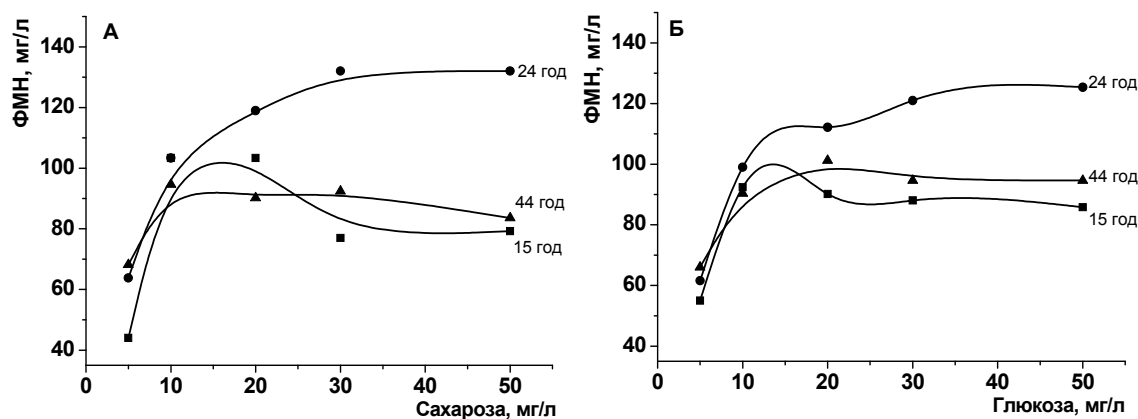


Рис. 1. Визначення оптимального джерела та концентрації вуглецю для продукції ФМН штамом 13-76 *C. famata*: інкубація з сахарозою (А) та глюкозою (Б)

Крім того, наші дослідження показали (див. рис. 1), що оптимальною для синтезу ФМН є 24-годинна інкубація, при тривалішому культивуванні вміст цього нуклеотиду в культуральній рідині суттєво знижується, можливо через розщеплення фосфатазами.

Для підбору джерела азоту та його концентрації використовували модифіковане середовище Беркгольдера, що містило 3% сахарози. Як джерела азоту ми вибрали солі амонію, сечовину та гліцин, а також їх поєднання (таблиця) у концентраціях, еквівалентних кількості азоту в базовому середовищі.

Як виявилось, сечовина є оптимальним для продукції ФМН джерелом азоту. Заміна сечовини на діамоній фосфат та гліцин призводила до зниження синтезу цієї сполуки на 12%, а внесення сульфату амонію зменшувало вихід ФМН у 5,5 разів. Одним з пояснень негативного впливу іонів сульфату на продукцію ФМН може бути значне закислення середовища інкубації, що відбувається внаслідок утилізації амонію.

Таблиця. Продукція ФМН рекомбінантним штамом 13-76 *C. famata* при інкубації протягом 24 год. в середовищах із різними джерелами азоту

Джерело азоту	ФМН, мг/л
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$21,6 \pm 1,94$
Сечовина	$123,2 \pm 9,82$
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$107,8 \pm 8,31$
Гліцин	$108,2 \pm 5,55$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +гліцин	$90,8 \pm 5,20$
Сечовина+гліцин	$122,5 \pm 11,1$
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ +гліцин	$103,1 \pm 11,0$

Вірогідно відрізняється від відповідних контрольних значень із  $p < 0,05$

ФМН хімічним способом [1].

Інші компоненти середовища, зокрема мікроелементи, також можуть мати важливе значення для оптимізації синтезу ФМН. Для визначення впливу макро- та мікроелементів необхідно провести багатофакторний аналіз. В будь-якому випадку,

Експерименти щодо визначення концентрації сечовини в поживному середовищі, оптимальної для максимальної продукції ФМН, показали, що внаслідок додавання у 5 разів більшої кількості цього джерела азоту синтез ФМН зростає у 2,5 рази, порівняно із базовим середовищем Беркгольдера (див. рис. 2).

Отримані результати вказують на те, що підбір оптимальних концентрацій лише джерела вуглецю і азоту дозволяє збільшити продукцію ФМН в 10 разів. При цьому в культуральній рідині рекомбінантного штаму не нагромаджуються інші фосфорильовані продукти, як це має місце при отриманні

отримані рекомбінантні штами для синтезу ФМН не потребують додавання дорогих попередників та інших компонентів: РФ або АТФ, як це описано для бактерійних надсинтетиків ФМН [6, 7].

Однак, в культуральній рідині штамів-надсинтетиків ФМН наявний РФ. Можливою причиною цього може бути гідроліз нуклеотиду за участю фосфатаз. Можливо, пригнічення активності цих ферментів за допомогою компонентів середовища – інгібіторів фосфатаз, дозволить підвищити вихід цільового продукту.

Дані літератури [6, 7] та наші дослідження [2, 3] свідчать про перспективність використання мікроорганізмів для отримання ФМН. Основною перевагою мікробіологічного синтезу цього нуклеотиду є уникнення синтезу побічних продуктів. На нашу думку, введення додаткових копій гену, що кодує РФ-кіназу, а також подальша оптимізація середовища культивування з застосуванням методів математичного планування експериментів дозволять використовувати штами, отримані шляхом надекспресії гену РФ-кінази для промислового отримання ФМН.

#### Література

1. Березовский В.М. Химия витаминов / Березовский В. М. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 632 с.
2. Вороновський А.Я., Дмитрук К.В., Іщук О.П., Федорович Д.В., Сибірний А.А., Яцишин В.Ю. Спосіб отримання флавінмононуклеотиду (5'-ФМН) / Патент України на корисну модель №22568, 25 квітня 2007 р.
3. Іщук О.П., Яцишин В.Ю., Дмитрук К.В., Вороновський А.Я., Федорович Д.В., Сибірний А.А. Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази // Укр. біохім. журнал. – 2006. – Т. 78, № 5. – С.53-59.
4. Шавловський Г.М., Жарова В.П., Щелокова И.Ф., Трач В.М., Сибірний А.А., Кшемінская Г.П. Флавіногенная активність природних штамів дрожжей *Pichia guilliermondii* // Прикл. біохімія і мікробіологія. – 1978. – Т.14. – С. 184-189.
5. Bessey O.A., Lowry J.Y., Love R.H.J. The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues // J. Biol. Chem. – 1949. – Vol. 180, N 2. – P. 378-381.
6. 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, N 5. – P. 724-729.
7. Nakagawa S., Hagihara T., Fujio T., Aisaka K. Metaphosphate-dependent phosphorylation of riboflavin to FMN by *Corynebacterium ammoniagenes* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1995. – Vol. 43, N 2. – P. 325-329.
8. Wu Q.-L., Chen T., Gan Y., Chen X., Zhao X.-M. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 76, N 4. – P. 783-794.

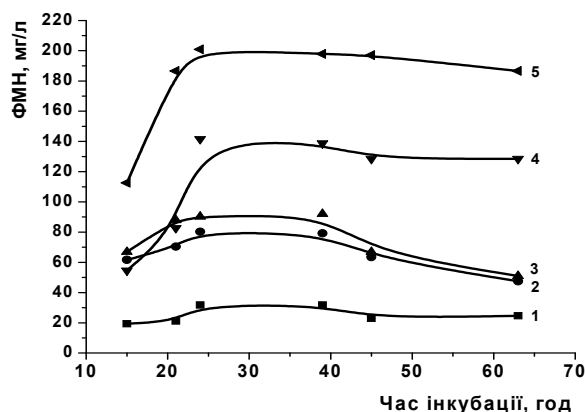


Рис. 2. Підбір оптимальної концентрації джерела азоту для продукції ФМН штамом 13-76 *C. famata*: 1 – 0,01% сечовини, 2 – 0,05% сечовини, 3 – 0,1% сечовини 4 – 0,2% сечовини, 5 – 0,5% сечовини

## Резюме

Оптимізовано середовище для максимального нагромадження ФМН рекомбінантними штамми дріжджів *Candida famata*, що містять ген РФ-кінази FMN1 під контролем сильного конститутивного промотора TEF1.

Оптимизирован состав среды для максимального накопления ФМН рекомбинантными штаммами дрожжей *Candida famata*, содержащими ген РФ-киназы FMN1 под контролем сильного конститутивного промотора TEF1.

The medium composition for maximal FMN production by recombinant strains of the yeast *Candida famata* that express the *FMN1* gene encoding riboflavin kinase under control of the strong constitutive *TEF1* promoter was optimized.

**GERASYMENKO I.M., LYPOVA N.M., SAKHNO L.A., SHCHERBAK N.L.,  
SINDAROVSKA Y.R., BANNIKOVA M.A., SHELUDKO Y.V., KUCHUK N.V.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,  
Zabolotnoho str. 148, Kiev 03680, Ukraine, e-mail: ysheludko@ukr.net*

## **OBTAINING AND ANALYSIS OF TOBACCO, LETTUCE AND RAPE PLANTS TRANSFORMED WITH HUMAN INTERFERON ALFA 2B GENE**

Interferons are a large family of multifunctional secreted proteins involved in animal antiviral defence, cell growth regulation and immune system activation [1]. The human interferon alpha2b (hIFN- $\alpha$ 2b) is used to treat several diseases including some types of cancer and hepatitis C. Recombinant human interferons have been produced in bacteria, yeast, insect and mammalian cells, and several plant species. Plants as source of pharmaceutical proteins have important advantages over microbial or animal cell systems. They are free from bacterial toxins and human pathogens like viruses and prions, so the recombinant proteins of plant origin are considered to be safer [2]. In some cases they can be used without purification as edible vaccines that lowers production costs considerably [3]. The main obstacle on the way of using transgenic plants for high-scale production of recombinant proteins is the low level of foreign gene expression in case of stable integration into plant nuclear genome (usually about 0.1-0.5 % TSP) [3]. However, the high specific activity of hIFN- $\alpha$ 2b may allow using of transgenic plants as food supplements to enhance immune functions of humans and animals.

Here we describe *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of model and agricultural plant species with hIFN- $\alpha$ 2b gene that resulted in obtaining of plants expressing physiologically active human interferon.

### **Materials and methods**

*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 was used for plant transformation. *Escherichia coli* strain XL1Blue was used for cloning of binary plasmid vectors. Plasmid vectors pICH5290, pCBV16, pICH13301 and pICH17311 were generously donated by Icon Genetics GmbH (Germany). Restriction endonucleases (REs) and T4 DNA ligase were used with supplied buffers (Fermentas, Lithuania). Bacterial cell transformation, plasmid DNA isolation and electrophoretic analysis were carried out as described in [4]. A short nucleotide sequence containing *Bam*HI and *Xba*I recognition sites was added to the pICH13301 and pICH17311 constructs digested with *Pst*I RE. Native and recombinant hIFN- $\alpha$ 2b genes were excised with *Nco*I and *Xba*I REs and ligated into pICH5290 and pCBV16 vectors predigested with the same REs. The obtained vectors were designated as pCB73, pCB123, pCB124 and pCB125 (Table1).