

ROBERT DULIŃSKI

## BIOTECHNOLOGICZNE METODY PRODUKCJI WITAMIN Z WYKORZYSTANIEM MIKROORGANIZMÓW

### Streszczenie

Witaminy znajdują szerokie zastosowanie w produkcji żywności (w tym suplementów diety), produktów farmaceutycznych, pasz oraz jako składniki kosmetyków. Na skalę przemysłową większość witamin produkuje się metodami syntezy chemicznej lub za pomocą ekstrakcji z naturalnych substancji, ale w wielu przypadkach są to procesy wymagające dużego nakładu energii i generujące wysokie koszty składowania oraz utylizacji substancji odpadowych. Powyższe argumenty stanowiły impuls do poszukiwania możliwości zastępowania tych syntez procesami biotechnologicznymi, poczynając od wykorzystania mikroorganizmów w wybranych biotransformacjach (witamina C) aż do całkowitej syntezy mikrobiologicznej z udziałem zrekombinowanych szczepów, jak w przypadku witaminy B<sub>12</sub>. Możliwa jest także produkcja surowców roślinnych ze zwiększoną zawartością witamin, poprzez projektowanie metaboliczne szlaków ich biosyntezy czy też wykorzystanie ich jako bioreaktorów, tzw. "fitofarming" (witaminy A oraz E). W pracy zaprezentowano wybrane aspekty związane z biotechnologiczną produkcją witamin i selekcją organizmów transgenicnych do ich produkcji

**Słowa kluczowe:** witaminy, rośliny transgeniczne, projektowanie metaboliczne, fitofarming

### Wprowadzenie

Witaminy to grupa związków niezbędnych w ilościach śladowych do normalnego wzrostu i rozwoju, która nie jest produkowana przez ssaki i musi być dostarczana do organizmu z zewnątrz. Substancje te pełnią w organizmie rozliczne funkcje: (1) jako koenzymy lub ich prekursorzy (niacyna, tiamina, ryboflawina), (2) biorące udział w procesach widzenia (witamina A), (3) jako składniki systemu obrony organizmu przed negatywnym wpływem reaktywnych form tlenu (witamina A, C, E) czy też czynniki zaangażowane w proces regulacji genetycznej (kwas foliowy, witamina B<sub>12</sub>). Zasadniczym kryterium klasyfikacji witamin jest rozpuszczalność tych związków w wodzie lub tłuszczach. Oprócz funkcji prozdrowotnych, wynikających z ich aktywności meta-

bolicznej, witaminy odgrywają istotną rolę w produkcji żywności jako substancje przeciwutleniające, hamujące procesy oksydacyjne tłuszczów, substancje barwiące oraz smakowo-zapachowe, jak również jako tzw. składniki o prozdrowotnym oddziaływaniu często nazywane też substancjami bioaktywnymi.

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie witaminami nie tylko w kontekście wzbogacania żywności i pasz, ale także jako składników stosowanych w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym [6, 35]. Ogromne zapotrzebowanie rynku na witaminy zaspokaja głównie ich produkcja metodami syntezy chemicznej. Jednak znaczne koszty produkcji, duże zużycie agresywnych rozpuszczalników organicznych i powstawanie substancji odpadowych stanowią impuls do pozyskiwania witamin z alternatywnych źródeł. Osobne zagadnienie stanowi biodostępność tych związków, przyswajanych przez organizm w znacznie większym stopniu z naturalnych surowców niż w formie preparatów farmaceutycznych. Podejmuje się więc działania w kierunku wprowadzenia biotechnologicznych metod produkcji, które skutecznie konkurują z technikami tradycyjnymi bądź stanowią jedyny, ekonomicznie uzasadniony wariant otrzymywania witamin, jak w przypadku cyjanokobalaminy (tab. 1). Ponadto zastosowanie mikroorganizmów tworzy możliwości wykorzystania alternatywnych źródeł energii w pozyskiwaniu witamin, jak oleje roślinne czy cukry.

### **Metody produkcji witamin**

W rozwoju technik produkcji witamin odnotowuje się trzy kierunki. W procesach syntezy przemysłowej, stosowanej w ostatnich kilkudziesięciu latach, próbuje się zminimalizować koszty poprzez zastąpienie wybranych etapów mikrobiologicznymi fermentacjami prowadzonymi przez transformowane szczepy (np. produkcja witaminy C i B<sub>2</sub>) [13, 14, 38]. Druga tendencja to wykorzystanie inżynierii genetycznej w procesie zwiększania koncentracji witamin (np. kukurydza z witaminą E) lub inicjowania ich biosyntezy głównie w surowcach roślinnych (np. tzw. złoty ryż z prowitaminą A) [2]. Ostatni kierunek, będący kontynuacją poprzedniego, to zastosowanie roślin i mikroorganizmów jako bioreaktorów do produkcji tych kluczowych dla organizmu związków tzw. fitofarming (karotenoidy, witamina C, E i cyjanokobalamina) [3, 4, 13, 36].

### ***Witamina C***

Jeśliby przyjąć definicję biotechnologii jako dziedziny umożliwiającej otrzymywanie produktów za pomocą enzymów komórek mikroorganizmów, to już przy produkcji witaminy C, wytwarzanej zasadniczo metodą syntezy chemicznej, można mówić o przynajmniej częściowej ingerencji biotechnologii na jednym z etapów wytwarzania.

Tabela 1

Witaminy produkowane metodami biotechnologicznymi.

Vitamins produced by biotechnological methods.

Witamina Vitamin	Enzym/mikroorganizm Enzyme/microorganism	Metoda Method
Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach / Fat-soluble vitamins		
Witamina E ( $\alpha$ -tokoferol) Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol)	Glon słodkowodny <i>Euglena gracilis</i> Freshwater algae <i>Euglena gracilis</i>	Produkcja na bazie fermentacji z glukozy Fermentative production from glucose
Witamina K <sub>2</sub> Vitamin K <sub>2</sub>	Zmutowany szczep <i>Bacillus subtilis</i> Mutated strain of <i>Bacillus subtilis</i>	Fermentacja z wykorzystaniem ekstraktu z soi Fermentation using soybean extract
Witaminy rozpuszczalne w wodzie / Water-soluble vitamins		
Witamina C (kwas L-askorbinowy) Vitamin C (L-ascorbic acid)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Proces realizowany przez wyselekcjonowane poprzez mutagenezę szczepy <i>Chlorella pyrenoidosa</i> został opatentowany jako źródło biomasy ze związaną witaminą C w formie karmy dla zwierząt This process, carried out by <i>Chlorella pyrenoidosa</i> strains selected through mutagenesis, was patented as a source of biomass with bound vitamin C in the form of feed for animals
	<i>Gluconbacter oxydans</i>	Wczesne próby wprowadzenia biotransformacji na etapie utlenienia D-sorbitolu do L-sorbozy w przemysłowym cyklu Reichsteina Early attempts of introducing biotransformation on the stage of oxidizing D-sorbitol to L-sorbose during the industrial Reichstein-synthesis
	Reduktaza 2,5-diketo-D-glukonianu z <i>Corynebacterium</i> sp. 2,5 –diketo-D-gluconic acid reductase <i>Corynebacterium</i> sp.	Proces fermentacji na bazie kwasu 2-keto-L-gulonowego z następującą chemiczną konwersją do kwasu L-askorbinowego Fermentative process on the basis of 2 -keto-L-gulonic acid with the subsequent chemical conversion to L-ascorbic acid

c.d. Tab. 1

Biotyna Biothin	<i>Serratia marcescens</i>	Fermentacyjna produkcja z glukozy przez genetycznie modyfikowane bakterie Fermentative production from glucose by genetically modified bacteria
	System wieloenzymowy ( <i>Bacillus sphaericus</i> ) Multiple enzyme system ( <i>Bacillus sphaericus</i> )	Konwersja z kwasu diaminopimelinowego przy wykorzystaniu enzymatycznego układu biosyntezy biotyny z mutanta ( <i>Bacillus sphaericus</i> ) Conversion from diaminopimelic acid using enzyme biotin biosynthetic system from mutant ( <i>Bacillus sphaericus</i> )
Witamina B <sub>2</sub> (ryboflawina) Vitamin B <sub>2</sub> (riboflavin)	<i>Eremothecium ashbyii</i> , <i>Ashbya gossypii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida flaveri</i>	Produkcja z glukozy przez fermentację, konstrukcja udoskonalonych przez inżynierię metaboliczną szczepów Fermentative production from glucose, construction of strains improved by metabolic engineering
Witamina B <sub>12</sub> (cyjanokobalamina) Vitamin B <sub>12</sub> (cyanocobalamin)	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Pseudomonas denitrificans</i>	Kombinacja przypadkowej mutagenезy i inżynierii genetycznej pozwoliła na zwiększenie blisko 100-krotnie produktywności szczepu <i>Pseudomonas denitrificans</i> Combination of random mutagenesis and genetic engineering allowed to increase the productivity of <i>Pseudomonas denitrificans</i> strain by almost 100 times

Opracowanie własne na podstawie: [10, 13, 16, 20, 38].

The author's own study based on: [10, 13, 16, 20, 38].

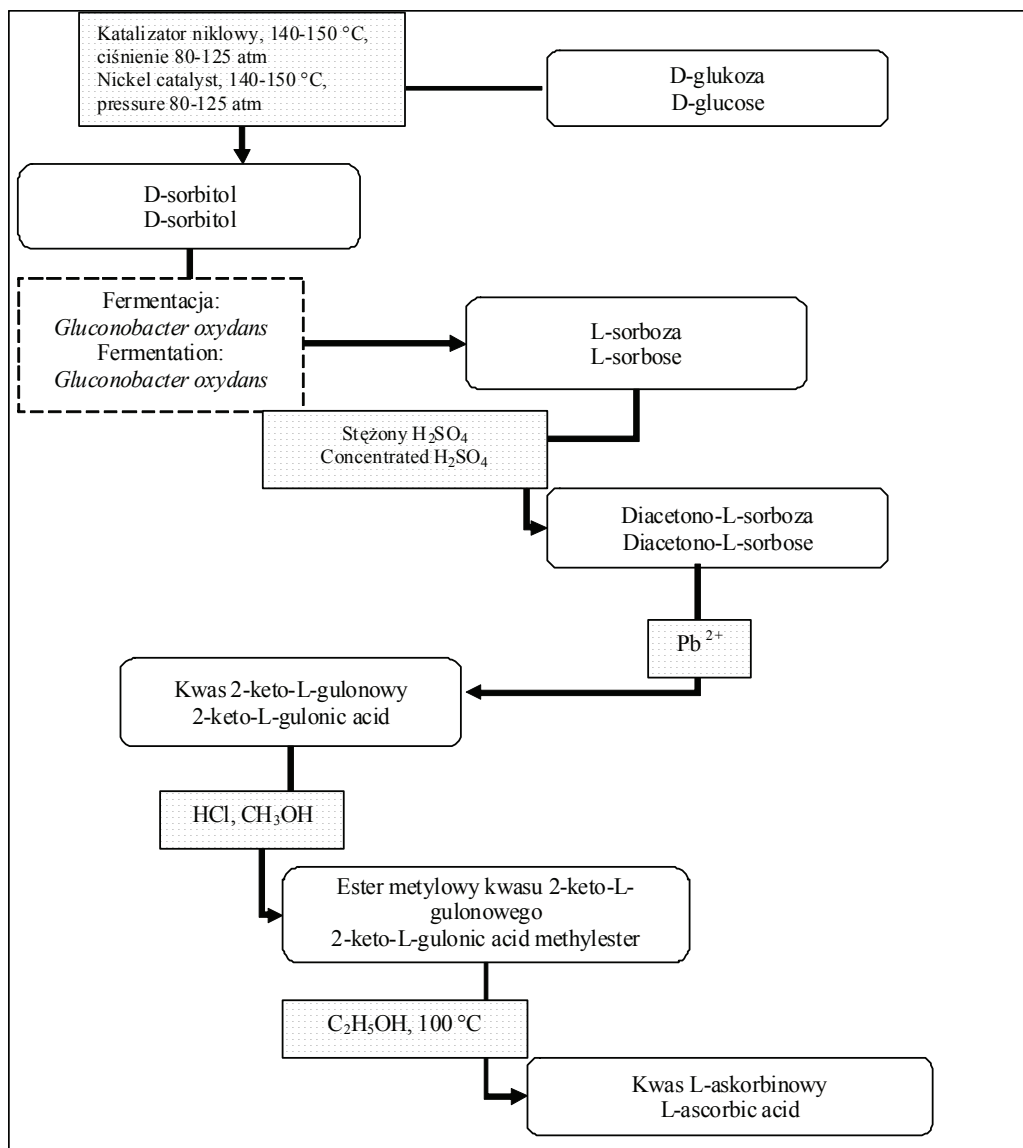
#### Zastosowanie pojedynczych i mieszanych kultur mikroorganizmów

Witamina C, czyli kwas L-askorbinowy (ang. L-ascorbic acid; L-AA), jest wykorzystywana w przemyśle farmaceutycznym (50 %), w produkcji żywności i pasz (25 %), a ostatnio również w kosmetologii (10 %) [5]. Roczna sprzedaż witaminy C osiągnęła wartość 800 mln USD, a rosnące zapotrzebowanie pokrywane jest głównie dzięki przemysłowej produkcji metodą chemiczno-mikrobiologiczną w 7-etapowym procesie Reichsteina. Początkowy etap utlenienia D-sorbitolu do L-sorbozy jest wspomagany przez biologiczną ścieżkę katalizowaną przez szczep *Gluconobacter oxydans*. Pomimo 60 lat doświadczeń proces wymaga użycia agresywnych rozpuszczalników organicznych i nieorganicznych, wysokiego ciśnienia i temperatury, co przy zaostro-

nych przepisach bezpieczeństwa znacząco podwyższa koszty produkcji (rys. 1). Optymalizacja syntezy Reichsteina zmierza w kierunku wykorzystania mieszanych kultur mikroorganizmów i genetycznej modyfikacji szczepów, co w optymistycznym wariacie mogłoby prowadzić nawet do jednoetapowej biotransformacji. Idea syntezy witaminy C konkurencyjnej wobec klasycznego procesu Reichsteina, z zastosowaniem mieszanych kultur mikroorganizmów, powstała w 1969 r. i jest sukcesywnie doskonalona głównie przez chińskich badaczy. Selekcja zmutagenizowanych promieniowaniem UV szczepów *G. oxydans* oraz *Bacillus megaterium* pozwoliła na uzyskanie konwersji 92 % L-sorbozy w 180-litrowym fermentorze. *G. oxydans* zawiera kluczowy układ enzymatyczny pozwalający na produkcję kwasu 2-keto-L-gulonowego (ang. 2-keto-L-gulononic acid; 2-KLGA), natomiast obecność *B. megaterium* zapewnia zwiększoną akumulację finalnego produktu. W kolejnej fazie zastosowano selekcję szczepów *Gluconobacter melanogenus*, która pozwoliła na produkcję 2-KLGA z D-sorbitolu i L-sorbozy z odpowiednio 50 i 60 % wydajnością. Pomimo przekonania, że zdolność produkcji 2-keto-L-gulonianu jest zarezerwowana wyłącznie dla rodzaju *Gluconobacter*, *Acetobacter* i *Pseudomonas* wyizolowano szczep *Ketogulonigenium vulgare* DSM 4025 osiągający wydajność 1,37 g/l L-AA z 5 g/l L-sorbosomu [34].

#### Genetyczna modyfikacja szczepów

Pierwsze próby wykorzystania szczepu *Erwinia herbicola* transformowanego genem reduktazy 2,5-diketo-D-glukonianu z *Corynebacterium sp.* pozwoliły na uzyskanie 120 g/l 2-KLGA w czasie poniżej 120 h [38]. Wysoką wydajność osiągnięto również dzięki rekombinantowemu szczepowi *G. oxydans* G624 z wbudowanym genem kodującym dehydrogenazę L-sorbosomu lub L-sorbozy z *G. oxydans* T-100 [28]. Jednak wymienione wyżej próby nie pozwalały na bezpośrednią produkcję kwasu askorbinowego z D-glukozy czy L-sorbitolu, a jedynie akumulację produktu pośredniego: 2-KLGA. Uzupełnienie brakującego ogniwa, to efekt zastosowania hydrolizy realizowanej przez laktonazy z *Zymomonas mobilis* czy *E. coli*, która pozwoliła na taką konwersję, jednak wciąż przy mało akceptowanym poziomie wydajności. Raporty sygnalizują identyfikację szczepów drożdży *Candida blanki* i *Cryptococcus dimmenna*, które przekształcają 2-KLGA do L-AA [13]. Uzyskana wydajność na poziomie 25 µg/ml L-AA w medium, z początkowych 5 mg/ml keto-L-gulonianu, po blisko 48 h fermentacji nadal nie jest odpowiednia. Oba szczepy wykorzystują kwas L-askorbinowy jako źródło węgla, stąd ukierunkowana mutageneza może się przyczyniać do zwiększenia efektywności tego procesu.



Rys. 1. Przemysłowa produkcja witaminy C poprzez syntezę Reichsteina z udziałem jednoetapowej fermentacji realizowanej przez rekombinantowy szczep *Gluconobacter oxydans*.

Fig. 1. Industrial production of vitamin C by Reichstein-synthesis with one-step fermentation carried out by a recombinant *Gluconobacter oxydans* strain.

Opracowanie własne na podstawie: [10, 13, 14, 30].

The author's own study based on: [10, 13, 14, 30].

### *Drożdże i mikroglony – alternatywne źródła*

Komórki drożdży mają zdolność syntezy pięciowęglowego analogu witaminy C – kwasu D-erythroaskorbinowego (ang. D-erythroascorbic acid; D-EAA). Związek ten ma podobne spektrum właściwości antyoksydacyjnych, jednak nie jest czynnikiem anty-skorbutowym, co znacząco ogranicza jego komercyjne zastosowanie. Interesujące jest podobieństwo dwóch etapów biosyntezy D-EAA przez drożdże do analogicznej sekwencji reakcji prowadzącej do powstania L-AA w roślinach. Okazuje się że zaangażowana w proces biosyntezy oksydaza D-arabino-1,4-laktonu, izolowana z *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*, akceptuje *in vitro*, oprócz naturalnego (D-arabinozy), również takie substraty, jak L-galakto-1,4-lakton oraz L-gulono-1,4-lakton, pozwalając na produkcję L-AA w komórkach [13]. Szeroka specyficzność substratowa dehydrogenazy D-arabinozy, katalizującej kolejny etap biosyntezy D-EAA, zapewniła akumulację kwasu L-askorbinowego po inkubacji z L-galaktozą [14].

Ta elastyczność ścieżki biosyntezy D-EAA została wykorzystana w jednoetapowym procesie fermentacji realizowanym przez udoskonalone szczepy *S. cerevisiae* oraz *Zygosacharomyces bailii* [30]. Głównym problemem w produkcji L-AA przez drożdże pozostaje wysoki koszt L-galaktozy, która na dalszym etapie powinna być pozyskiwana przez zrekombinowane szczepy bakteryjne wykorzystujące w produkcji tego cukru znacznie tańsze substraty wyjściowe. W 1996 r. opatentowano proces produkcji biomasy wzbogaconej w witaminę C dla przemysłu paszowego i suplementacji diety. Jednoetapowy proces fermentacji realizowany jest poprzez heterotroficzne mikroalgi *Chlorella pyrenoidosa*, deponujące witaminę C wewnątrz komórki. Optymalizacja warunków hodowli i mutageneza szczepów pozwoliła na 70-krotny wzrost wydajności produkcji w stosunku do macierzystego szczepu (2g L-AA /l ) [10].

### **Witamina B<sub>2</sub>**

Ryboflawina, czyli witamina B<sub>2</sub>, jest prekursorem koenzymów flawinowych FAD oraz FMN, uczestniczących w reakcjach oksydoredukcyjnych organizmu. W żywności stosowana jest głównie jako żółty barwnik, pozyskiwana w znakomitej większości poprzez syntezę chemiczną. W ostatnich latach dominujący producenci, koncerny BASF, Roche czy ADM/Aventis, intensywnie rozwijają sektor biotechnologicznej produkcji ryboflawiny polegającej na wykorzystaniu genetycznie zmodyfikowanych komórek bakterii i grzybów. Zastosowanie wysoko wydajnych szczepów mikroorganizmów z gatunku *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypi*, *Eremothecium ashbyii* czy *Candida famata* pozwala na przeprowadzenie jednoetapowej fermentacji, znacznie redukując koszty produkcji i potencjalnego recyklingu substancji odpadowych [17, 19, 23]. W mikrobiologicznej syntezie wykorzystywane są wyselekcjonowane szczepy, których hodowla zoptymalizowana jest pod względem doboru składników pożywki: źródła



węgla, mikroelementów oraz pH. Szczepy *A. gossypii* oraz *C. famata* charakteryzuje nadprodukcja ryboflawiny stymulowana wzbogacaniem pożywki w prekursory witaminy B<sub>2</sub>. Wzrost wydajności zanotowano przy suplementacji medium hodowlanego GTP, hipoksantyną [31] czy glicyną [15], która odgrywa równocześnie rolę czynnika limitującego i induktora syntezy ryboflawiny.

#### *Selekcja mutantów i projektowanie metabolizmu*

Selekcja mutantów prowadzona jest w kierunku obniżonej wrażliwości na zwiększone stężenie żelaza, które negatywnie wpływa na biosyntezę ryboflawiny przez *C. famata* [15]. Zwiększoną produkcję witaminy B<sub>2</sub> obserwowano również u mutantów opornych na analog puryny – tubercedynę (85 - 200 µg/ml), a w przypadku *B. subtilis*: 8-azoguaninę, sulfotlenek metioniny czy rozeoflawinę – antymetabolit ryboflawiny [23]. Nadprodukcja jest efektem deregulacji szlaków metabolicznych, co przyczynia się do intensywnego przekształcenia monofosforanu inozyny oraz monofosforanu ksantozyny do prekursora ryboflawiny: GMP.

Kolejna strategia zwiększania produktywności ryboflawiny – projektowanie metabolizmu – polega na nadekspresji lub wyłączeniu (nokaucie) genów kodujących enzymy kluczowych ścieżek biosyntetycznych lub katalizujących niepożądane reakcje boczne. Najbardziej zaawansowane w tym zakresie są próby ze szczepami *B. subtilis* oraz *A. gossypii* [11, 18, 33]. Przykład stanowi nadekspresja genu *AgGLY1*, kodującego aldolazę treoniny [21]. Treonina należy do grona potencjalnych prekursorów GTP, a z kolei ten związek stanowi substrat wyjściowy do procesu biosyntezy ryboflawiny. Kontrola genu przez promotor i terminator *AgTEF* zaowocowała 10-krotnym wzrostem specyficznej aktywności aldolazy treoniny, co pośrednio wpłynęło na zwiększenie produkcji ryboflawiny za sprawą efektywnego pobierania tego aminokwasu. Ostatni przykład stanowi „wyłączenie” genu *AgVMA1*, kodującego podjednostkę wakuolarną ATPazy [11]. Dzięki tej operacji syntetyzowana przez *A. gossypii* ryboflawina nie jest deponowana w komórkowej wakuoli, a transportowana do środowiska zewnątrzkomórkowego.

#### ***Witamina B<sub>12</sub>***

Termin witamina B<sub>12</sub> jest stosowany wobec związków czteropirolowych z centralnie zlokalizowanym jonem kobaltu: cyjanokobalaminy, adenozynekobalaminy oraz hydroksylokobalaminy. Dla człowieka witamina B<sub>12</sub> jest niezbędna w śladowych ilościach (1-3 µg/dzień) jako koenzym syntazy metioniny (EC 2.1.1.13) oraz mutazy metylomalonylo-CoA (EC 5.4.99.2). Proces biosyntezy jest prowadzony przez nieliczne bakterie i glony. Blisko 10 lat badań z udziałem ponad 100 naukowców pozwoliło na opracowanie technologii chemicznej syntezy witaminy B<sub>12</sub>. Jednak techniczne trudności związane z przeprowadzeniem 70-etapowego procesu i aspekty ekonomiczne



wykluczają zastosowanie metody na skalę przemysłową. Obecnie kobalamina produkowana jest wyłącznie metodą fermentacji przez wyselekcjonowane szczepy m.in. z rodzaju: *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas* czy *Rhizobium* [20, 24, 32]. Główną strategią w udoskonalaniu produkcji jest nieukierunkowana mutagenesa, a następnie skryning szczepów mikroorganizmów pod względem produktywności, genetycznej stabilności oraz odporności na podwyższone stężenie szkodliwych ubocznych produktów metabolizmu obecnych w środowisku hodowlanym. W produkcji przemysłowej wykorzystuje się przede wszystkim dwa gatunki: *Propionibacterium shermanii* oraz *Pseudomonas denitrificans*. *P. shermanii* zdominował rynek produkcji witaminy B<sub>12</sub>, a nie uznany za ogólnie bezpieczny szczep GRAS (ang. Generally Recognized as Safe). Bioprocessy realizowane z udziałem mikroaerofilnego *P. shermanii* przebiegają w ramach dwuetapowej fermentacji. W trakcie pierwszych 3 dni hodowli w środowisku beztlenowym bakterie syntetyzują prekursor kobinoamid, po czym następuje delikatne napowietrzanie kultury w ciągu kolejnych 1 - 3 dni celem realizacji finalnego etapu produkcji dimetylobenzimidazolu (DMBI) i połączenia obu części, aby utworzyć cyjanokobalaminę [20]. W przeciwieństwie do *Propionibacterium* produkcja witaminy B<sub>12</sub> przez *P. denitrificans* stanowi proces tlenowy, którego wydajność w ramach 2- 3-dniowego cyklu hodowlanego prowadzonego w temp. 30 °C i pH 6 - 7 jest wyraźnie skorelowana z fazą wzrostu drobnoustrojów. Niezależnie od zastosowanego szczepu produktywność wzrasta dzięki wprowadzeniu do pożywki prekursorów oraz kluczowych substancji w procesie biosyntezy: glicyny, treoniny, kwasu δ-aminolewulinowego, jonów kobaltu czy DMBI.

#### *Inżynieria genetyczna*

Francuski koncern Rhone-Poulenc Rhorer (RPR), wykorzystując metody inżynierii genetycznej wspomaganą przypadkową mutagenesą, zwiększył blisko 100-krotnie produktywność szczepu *P. denitrificans* [3]. Szczegółowo opisany w europejskim patencie 0516647B1 projekt polega m.in. na amplifikacji 8 genów *P. denitrificans* w operonie *cobF-cobM*. Zastosowanie wielokopijnych plazmidów pozwoliło na 30 % wzrost produkcji kobalaminy, a kolejne 20 % uzyskano dzięki zwiększeniu liczby kopii biosyntetycznych genów *cobA* oraz *cobE* [3, 4]. W celu wyeliminowania hamowania substratem metylotransferazy zaangażowanej w początkowe etapy biosyntezy, kodowanej przez gen *cobA*, naukowcy z RPR zasugerowali heterologiczną ekspresję genu *corA* z *Methanobacterium ivanovii* [3]. Istotny wzrost komórkowej syntezy DMBI – jednego z ligandów centralnego jonu kobaltu, często uzupełnianego w pożywce – uzyskano dzięki *trans*-ekspresji genu *bluB* z *Rhodobacter capsulatus* [4].

## Synteza witamin w transgenicznym roślinach

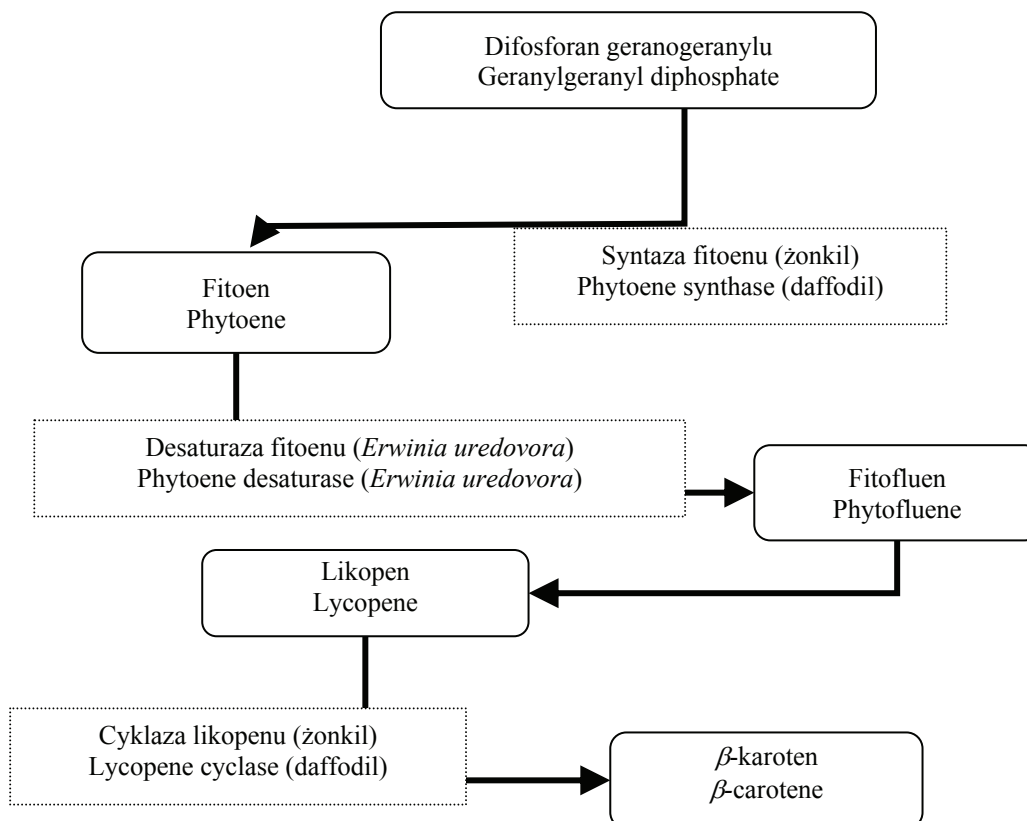
### *Witamina A oraz karotenoidy*

Karotenoidy to grupa ponad 600 strukturalnie spokrewnionych związków obecnych głównie w roślinach, glonach, bakteriach i grzybach. Barwa karotenoidów, kluczowa rola w procesach widzenia oraz ich właściwości przeciwutleniające to główne czynniki wpływające na coraz szersze ich zastosowanie w produkcji żywności i produktów farmaceutycznych (produkcja szacowana w 2010 roku na 1 mld USD) [8]. Rosnące zapotrzebowanie na karotenoidy może być zaspokojone poprzez syntezę oczyszczonej formy witaminy A w przypadku aplikacji farmaceutycznych, ale obiecującą perspektywą jest zwiększenie koncentracji prowitaminy A w roślinach, stanowiących podstawowe źródło karotenoidów w diecie (np. owoce pomidora) czy wręcz inicjowanie biosyntezy tego związku (endosperma ryżu) [29]. Jednocześnie postępy w biotechnologii glonów stwarzają możliwości wykorzystania tych mikroorganizmów jako bioreaktorów do produkcji karotenoidów [8, 25].

Dobry przykład stanowi projekt zainicjowany w 1990 r. przez Potrykusa z Zurychu oraz Beyera z Freiburga, polegający na wprowadzeniu do endospermy ryżu (*Oryza sativa*) genów odpowiedzialnych za biosyntezę prowitaminy A z bakterii *Erwinia uredovora* oraz żonkila (*Narcissus pseudonarcissus*) (rys. 2) [2]. Modyfikacja polegała na heterologicznej ekspresji w tej tkance aktywności syntazy fitoenu, desaturazy fitoenu, desaturazy  $\zeta$ -karotenu oraz cyklazy  $\beta$ -karotenu. Transgeniczny ryż o charakterystycznej żółtej barwie nasion zawierał od 1,6 - 2,0  $\mu\text{g}$   $\beta$ -karotenu na gram trawy, a w projekcie „Złoty Ryż 2” uzyskano nawet 23-krotny wzrost puli karotenoidów (37  $\mu\text{g/g}$ ) [22].

Druga strategia wzmocnienia produkcji witaminy A polega na modyfikacji szlaku karotenogenezy, w celu uzyskania optymalnej puli  $\beta$ -karotenu, wykazującego 100 % aktywności witaminy A. W trakcie deponowania likopenu w dojrzewającym pomidorze (*Lycopersicon esculentum*) głównym czynnikiem kontrolującym proces jest aktywność syntazy fitoenu i ten enzym jest jednym z kluczowych obiektów modyfikacji genetycznej w owocach pomidora. Ekspresja desaturazy fitoenu z *E. uredovora* pod kontrolą promotora 35S z wirusa mozaiki tytoniu CaMV (ang. cauliflower mosaic virus) wpłynęła na obniżenie całkowitej puli karotenoidów o 50 %, jednak poziom  $\beta$ -karotenu wzrósł niemal 3-krotnie z 270 do 520  $\mu\text{g/g}$  [27]. Natomiast w rzepaku (*Brassica napus*) ekspresja syntazy fitoenu z *E. uredovora* pod kontrolą macierzystego prekursora skutkowało 50-krotnym wzrostem całkowitej puli karotenoidów w homozygotycznych nasionach [31]. Wbrew oczekiwaniom badaczy, którzy zakładali zwiększenie zawartości luteiny, najwyższy poziom osiągnął  $\beta$ -karoten (400  $\mu\text{g/g}$  świeżej masy) oraz  $\alpha$ -karoten (700  $\mu\text{g/g}$  świeżej masy). Inżynieria genetyczna szlaku karotenoidów stwarza potencjalne zagrożenia związane z deregulacją ścieżek metabolicznych odpowie-

działnych m.in. za syntezę fitohormonów. Rezultatem ekspresji genu syntazy fitoenu w transgenicznym pomidorze było obniżenie puli kwasu giberelinowego, który ma wspólny prekursor (pirofosforan geranogeranylu) z prowitaminą A, wskutek czego wyhodowane rośliny cechowała karłowatość [12].



Rys. 2. Inżynieria genetyczna szlaku biosyntezy  $\beta$ -karotenu w endospermie „Złotego ryżu”.

Fig. 2. Genetic engineering of pathway of  $\beta$ -carotene biosynthesis in ‘Golden rice’ endosperm.

Opracowanie własne na podstawie: [2, 22, 29].

The author’s own study based on: [2, 22, 29].

### **Witamina E**

Naturalna witamina E obejmuje grupę 8 hydrofobowych pochodnych – tokoferoli – zbudowanych z podjednostki izoprenoidowej oraz pierścienia aromatycznego. Oprócz zasadniczej roli fizjologicznej, wynikającej m.in. z właściwości przeciwutleniających, witamina E jest stosowana w żywności jako substancja przeciwutleniająca

np. w produktach mięsnych, a także na coraz szerszą skalę w produktach farmaceutycznych i kosmetycznych. Zapotrzebowanie światowego rynku szacowane na ponad 1 mln USD jest pokrywane głównie poprzez produkcję syntetycznej witaminy E (85 - 88 %) i w nieznacznym stopniu (12 - 15 %) dzięki jej ekstrakcji z naturalnych źródeł [16]. Ścieżkę biosyntezy tokoferoli zidentyfikowano w badaniach na roślinach (rzodkiewnik *Arabidopsis thaliana*, soja, tytoń) oraz fostosyntetycznych bakteriach z rodzaju *Synechocystis* [9]. Zastosowanie inżynierii genetycznej w intensyfikacji produkcji witaminy E z naturalnych źródeł sprowadza się do dwóch strategii: (1) przekształcenia tokochromanoli w pochodną o najwyższej aktywności witaminy E lub (2) zwiększenia w próbach całkowitej puli tokoferoli [1, 26, 36]. Pierwsza metoda dotyczy głównie nasion, bowiem większość aktywnych fotosyntetycznie komórek roślinnych i bakteryjnych produkuje  $\alpha$ -tokoferol. Transgeniczna ekspresja  $\gamma$ -metylotransferazy odpowiedzialnej za końcowe przekształcenie  $\gamma$ -tokoferolu do  $\alpha$ -tokoferolu w nasionach *Arabidopsis* oraz rzepaku pozwoliła na zwiększenie puli tego ostatniego związku o 95 - 100 % [37]. Nasiona soi charakteryzuje złożone spektrum tokoferoli, obejmujące:  $\alpha$ -tokoferol (10 - 20 %),  $\beta$ -tokoferol (2 - 5 %),  $\gamma$ -tokoferol (60 - 70 %) oraz  $\delta$ -tokoferol (20 - 30 %). Ekspresja genu wspomianej metylotransferazy z *Arabidopsis* pozwoliła na całkowitą konwersję  $\gamma$ -tokoferolu do  $\alpha$ -tokoferolu oraz równoczesne przekształcenie  $\delta$ -tokoferolu do  $\beta$ -tokoferolu [37].

Alternatywna strategia produkcji witaminy E, polegająca na zwiększaniu akumulacji wszystkich tokoferoli, realizowana jest przy wykorzystaniu bakterii fotosyntetycznych z rodzaju *Synechocystis* oraz rzodkiewnika, tytoniu, rzepaku, kukurydzy czy nasion soi. Rezultaty tych badań wskazują na kluczową rolę fitylotransferazy kwasu homogentyzynowego, enzymu odpowiedzialnego za początkowe etapy biosyntezy, połączenie podjednostki izoprenoidowej oraz pierścienia aromatycznego. Ekspresja transgenicznej fitylotransferazy z *Arabidopsis thaliana* pozwoliła na 1,8-1,4-krotne zwiększenie zawartości tokoferoli w nasionach soi, a w przypadku liści rzodkiewnika dodatkowa stymulacja czynnikami środowiskowymi (promieniowanie słoneczne, składniki odżywcze) zapewniła 18-krotny wzrost poziomu witaminy E [7, 36].

## Podsumowanie

Rosnące zapotrzebowanie na witaminy jeszcze do niedawna było zaspokajane głównie przez przemysłową, chemiczną syntezę tych substancji. Jednak wysokie koszty energii, znaczne zużycie agresywnych rozpuszczalników i problemy z utylizacją substancji odpadowych stanowiły impuls do opracowania biotechnologicznych metod produkcji. Ekspansja biotechnologii polega na zastępowaniu kolejnych etapów chemicznych poprzez mikrobiologiczne biotransformacje (witamina C), czy też na kompleksowej biosyntezie witamin przez wyselekcjonowane, zmutagenizowane lub gene-

tycznie zmodyfikowane szczepy drobnoustrojów (witamina B<sub>12</sub>). Obiecującą perspektywę stanowi projektowanie metaboliczne, polegające na sterowaniu kluczowymi ścieżkami biosyntetycznymi prekursorów witamin w transgenicznym mikroorganizmach (witamina B<sub>2</sub>).

### Literatura

- [1] Ajjawi I., Shintani D.: Engineered plant with elevated vitamin E: a nutraceutical success story. *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 104-107.
- [2] Beyer P., Al-Babili S., Ye X., Lucca P., Schaub P., Welsch R., Portykus I.: Introducing the  $\beta$ -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J. Nutr.*, 2002, **132**, 506S-510S.
- [3] Blanche F., Cameron B., Crouzet J., Debussche L., Levy-Schil S., Thibaut D.: Rhone-Poulenc Biochimie. Eur. Patent 1998, 0516647 B1.
- [4] Blanche F., Cameron B., Crouzet J., Debussche L., Thibaut D.: Rhone-Poulenc Rorer. World Patent 1997, 97/43421.
- [5] Bremus C., Herrmann U., Bringer-Meyer S., Sahn H.: The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J. Biotechnol.*, 2006, **124**, 197-203.
- [6] Brzozowska A., Roszkowski W., Pietruszka B., Kałuża J.: Witaminy i składniki mineralne jako suplementy diety. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **4 (45) Supl.**, 5-16.
- [7] Collakova E., DellaPenna D.: Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2003, **131**, 632-642.
- [8] Del Campo J.A., Garcia-Gonzales M., Guerrero M.G.: Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **74**, 1163-74.
- [9] DellaPenna D.: A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *J. Plant Physiol.*, 2005, **162**, 729-737.
- [10] Doncheck J.A., Huss R.J., Running J.A., Skatrud T.J.: L-ascorbic acid containing biomass of *Chlorella pyrenoidosa*. US Patent, 1996, 5,521,090.
- [11] Forster C., Santos M.A., Ruffert S., Kramer R., Revuelta J.L.: Physiological consequence of the disruption of the *VMAL* gene in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 9442-9448.
- [12] Fray R.G., Wallace A., Fraser P.D., Valero D., Hedden P., Bramley P.M., Grierson D.: Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J.*, 1995, **8**, 693-701.
- [13] Hancock R.D., Viola R.: Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends in Biotechnology*, 2002, **20**, 299-305.
- [14] Hancock R.D., Viola R.: The use of micro-organisms for L-ascorbic acid production: current status and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 567-576.
- [15] Heefner D., Weaver C.A., Yarus M.J., Burdzinski L.A., Gyure D.C., Foster E.W.: Riboflavin producing strains of microorganisms, method for selecting, and method for fermentation. Patent WO 88/09822.
- [16] Herbers K.: Vitamin production in transgenic plants. *J. Plant. Physiol.*, 2003, **160**, 821-829.
- [17] Jimenez A., Santos M.A., Pompejus M., Revuelta J. L.: Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 5743-5751.

- [18] Kaesler B., Sahn H., Stahmann K.P., Schmidt G., Boededecker B., Seulberger H.: Riboflavin production process by means of microorganisms with modified isocitrate lyase activity, Patent WO 9703208-A, 1997.
- [19] Koizumi S., Yonetani Y., Maruyama A., Teshiba S.: Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, **53**, 674-679.
- [20] Martens J.H., Barg H., Warren M.J., Jahn D.: Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **58**, 275-285.
- [21] Monschau N., Sahn M., Stahmann K.P.: Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhanced riboflavin production in *Ashbya gossypii*. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**, 4283-4290.
- [22] Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L., Drake R.: Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. Nat. Biotechnol., 2005, **23**, 482-487.
- [23] Perkins J.B., Sloma A., Hermann T., Theriault K., Zachgo E., Erdenberger T., Hannett N., Chatterjee N.P., Williams V., Rufo G.A., Hatch R., Pero J.: Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. Ind. Microbiol. Biotechnol., 1999, **22**, 8-18.
- [24] Piao Y., Yamashita M., Kawaraichi N., Asegawa R., Ono H., Murooka Y.: Production of vitamin B<sub>12</sub> in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. J. Biosci. Bioengineering, 2004, **98**, 167-173.
- [25] Raja R., Hemaiswarya S., Rengasamy R.: Exploitation of *Dunaliella* for beta-carotene production. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, **74**, 517-523.
- [26] Rocheford T.R., Wong J.C., Egesel C.O., Lambert R.J.: Enhancement of vitamin levels in corn. J. Am. College Nutr., 2002, **21**, 191S-198S.
- [27] Romer S., Fraser P.D., Kiano J.W., Shipton C.A., Misawa N., Schuch W., Bramley P.M.: Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. Nature Biotechnol., 2000, **18**, 666-669.
- [28] Saito Y., Ishii Y., Hayashi Y., Imao T., Akashi K., Yoshikawa Y., Noguchi S., Soeda M., Yoshida M., Niwa J., Hosoda K., Shimomura K.: cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-ascorbic acid in recombinant *G. oxydans* strain. Appl. Environ. Microbiol. 1997, **63**, 454-460.
- [29] Sandmann G.: Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies problems and achievements. Trends Plant Sci., 2001, **6** (1), 14-17.
- [30] Sauer M., Branduardi P., Valli M., Porro D.: Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. Appl. Environ. Microbiol., 2004, **70**, 6086-6091.
- [31] Shewmaker C.K., Sheehy J.A., Daley M., Colburn S., Ke D.Y.: Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. Plant J., 1999, **20**, 401-412.
- [32] Stahmann K.P., Revuelta J.L., Seulberger H.: Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata* or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. B<sub>12</sub>. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, **53**, 509-516.
- [33] Steiner S., Philippsen P.: Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. Mol. Gen. Genet., 1994, **242**, 263-297.
- [34] Sugisawa T., Miyazaki T., Hoshino T.: Microbial production of L-ascorbic acid production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol, L-sorbose, L-gulose and L-sorbosone by *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1990, **69**, 659-662.
- [35] Survase S.A., Ishwar B.B., Singhal R.S.: Biotechnological production of vitamins. Food Technol. Biotechnol., 2006, **44**, 381-396.
- [36] Valentin H.E., Qi Q.: Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005, **68**, 436-444.

- [37] van Eenennaam A.L., Lincoln K., Durrett T.P., Valentin H.E., Shewmaker C.K., Thorne G.M., Jiang J., Baszis S.R., Levering C.K., Aasen E.D., Hao M., Stein J.C., Norris S.R., Last R.L.: Engineering vitamin E content: from *Arabidopsis* mutant to soil oil. *Plant Cell*, 2003, **15**, 3007-3019.
- [38] Zhang L., Wang Z., Xia Y., Kai G., Chen W., Tang K.: Metabolic engineering of plant L-ascorbic biosynthesis: recent trends and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2007, **27**, 173-182.

## BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF PRODUCING VITAMINS USING MICROORGANISMS

### S u m m a r y

Vitamins are widely applied to produce food (including dietary supplements), pharmaceuticals, feed-stuffs, and, also, as components of cosmetics. On the industrial scale, the majority of vitamins are produced using methods of chemical synthesis or through the extraction of natural substances, but, in many cases, those processes consume high amounts of energy and generate high waste disposal and waste utilization costs. Those arguments were the spur for searching for options to replace syntheses with biotechnological processes beginning from the use of micro-organisms in the selected bio-transformations (vitamin C) to the complete microbiological synthesis with engineered strains, for example in the case of vitamin B12. An alternative is the production of raw materials of plants with an increased content of vitamins by the metabolic design of pathways of their biosynthesis, or using them as bio-reactors, the so called 'phytopharming' (vitamins A and E). This paper presents some selected aspects relating to the biotechnological production of vitamins and to the selection of transgenic organisms for their production.

**Key words:** vitamins, transgenic plants, metabolic design, phytopharming ☒