

Применение процесса зелёной ферментации для производства жирорастворимых витаминов^{1,2}

Анастасия Максименко^{1,2}, Анна Подволоцкая^{1,2}, Оксана Сон^{1,2}, Софья Гончаренко^{1,2}, Варвара Стёпочкина^{1,2}, Павел Шинкарук^{1,2}

¹ Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия
² ООО “Арника”, R&D “Agrobiotechnology” С. Вольно-Надеждинское, Приморский край, Россия

Информация о статье

Поступила в редакцию:

03.11.2023

Принята

к опубликованию:

07.12.2023

УДК 636.087.7

JEL N50

Ключевые слова:

жирорастворимые витамины, микробная ферментация, заводы по производству микробных клеток, ферментативное производство витаминов, экологическая устойчивость, экономическая устойчивость, зелёная ферментация.

Аннотация

Витамины представляют собой группу основных питательных веществ, необходимых для поддержания нормального обмена веществ и оптимального здоровья человека и животных. Они находят широкое применение в пищевой, косметической, кормовой, химической и фармацевтической промышленности. В последнее время мировой спрос на витамины значительно увеличился, что привело к поиску новых производственных стратегий. Традиционные методы химического синтеза витаминов включают высокие температуры, реакторы под давлением и использование невозобновляемых химикатов или токсичных растворителей, что вызывает обеспокоенность по поводу безопасности продукции, загрязнения окружающей среды и образования опасных отходов. В ответ на эти вызовы появляются инновационные подходы. Фабрики по производству микробных клеток для производства витаминов предлагают

DOI: <https://dx.doi.org/10.24866/2311-2271/2023-4/76-88>.

¹ Работа выполнена на производственной площадке “Кормбиосинтез” ООО “Арника” в ТОР “Надеждинский” при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования FZNS-2022-0017 “Разработка пакета технологий производства биодоступной защищённой формы кормового витамина Д3 и биокомплексов на его основе с использованием растительных и океанических ресурсов для обеспечения продуктивности и повышения иммунной защиты сельскохозяйственных животных” (раздел о витамине D).

² Работа выполнена при финансовой поддержке по Соглашению о предоставлении субсидии от 25 июня 2021 г. № 075-11-2021-065 в рамках 13 очереди реализации постановления Правительства от 9 апреля 2010 г. № 218 “Разработка промышленной технологии и организация в Дальневосточном федеральном округе высокотехнологичного производства кормового витамина А повышенной стабильности и биодоступности” (раздел о витамине А).

экологически чистую и устойчивую альтернативу как с экологической, так и с экономической точки зрения. Достижения в области биотехнологии и метаболической инженерии проложили путь к разработке эффективных и экологически чистых процессов. Жирорастворимые витамины, такие как витамины А и D, потенциально могут производиться с использованием фабрик микробных клеток или уже производятся в коммерческих процессах ферментации. В этом обзоре представлен краткий обзор жирорастворимых витаминов, также подробно рассмотрены конкретные примеры и достижения в этой области. Кроме того, в обзоре исследуется метаболическая инженерия как основа для создания фабрик по производству витаминов из микробных клеток, подчёркивается их потенциал конкурировать с традиционными химическими методами. Также подробно обсуждаются современное состояние и проблемы, возникающие при ферментативном производстве витаминов, что проливает свет на текущие усилия по удовлетворению растущего глобального спроса, при этом уделяется приоритетное внимание устойчивости и безопасности.

The Application of the Green Fermentation Process for the Production of Fat-Soluble Vitamins

Anastasiia A. Maksimenko, Anna B. Podvolotskaya, Oksana M. Son, Sofiya I. Goncharenko, Varvara D. Stepochkina, Pavel A. Shinkaruk

Abstract

Vitamins represent a group of essential nutrients necessary for maintaining normal metabolism and optimal health in humans and animals. They find wide applications in the food, cosmetic, feed, chemical, and pharmaceutical industries. Recently, the global demand for vitamins has significantly increased, leading to a growing interest in finding new production strategies. Traditional methods of chemical synthesis of vitamins involve high temperatures, pressurized reactors, and the use of non-renewable chemicals or toxic solvents, raising concerns about product safety, environmental pollution, and the generation of hazardous waste. In response to these challenges, innovative approaches are emerging. Factories producing microbial cells for vitamin production offer an environmentally friendly and sustainable alternative from both an ecological and economic perspective. Advances in biotechnology and metabolic engineering have paved the way for the development of efficient and environmentally friendly processes. Fat-soluble vitamins, such as vitamins A and D, can potentially be produced using microbial cell factories or are already being manufactured in commercial fermentation processes. This overview provides a brief review of fat-soluble vitamins and thoroughly examines specific examples and achievements in this field. Additionally, the review explores metabolic engineering as the foundation for establishing vitamin production factories from microbial cells, highlighting their potential to compete with traditional chemical methods. The modern state and challenges arising in fermentative vitamin production are also discussed in detail, shedding light on current efforts to meet the growing global demand, with a focus on sustainability and safety.

Keywords:

fat-soluble vitamins, microbial fermentation, microbial cell factories, fermentative vitamin production, environmental sustainability, economic sustainability, green fermentation.

Введение

Витамины являются важными органическими соединениями, которые преимущественно действуют как коферменты в метаболических реакциях во всех организмах. Существует по меньшей мере 30 различных соединений, классифицируемых как “витамины” и, известно, что более 20 из них необходимы для биологического здоровья. Витамины делятся на жирорастворимые (А, D, Е, К) и водорастворимые (С, группы В). Водорастворимые витамины легко растворяются в воде и нерастворимы в органических растворителях. После абсорбции в организме сохраняется очень мало этих витаминов, большая часть которых выводится с мочой. Жирорастворимые витамины растворяются в жирах, но не в воде, откладываясь в печени или жировой ткани для дальнейшего использования. Растения и микроорганизмы могут синтезировать их естественным путём, в то время как людям и животным необходимо получать достаточное количество с пищей или добавками для поддержания оптимального здоровья. Потребность в витаминах возрастает при патологических состояниях, неправильном питании, высоких физических нагрузках, беременности, стрессах и других факторах. Кроме того, методы обработки и консервирования пищевых продуктов могут снизить содержание витаминов, поскольку витамины чувствительны к свету, теплу, кислороду и рН. Поэтому витамины производятся для кормовой, пищевой, косметической, химической и фармацевтической промышленности [1, 2].

Способы получения витаминов основаны либо на химическом синтезе, либо на биотехнологических процессах — ферментативном производстве. К преимуществам зелёного производства витаминов относится экологическая и экономическая устойчивость. Традиционные методы химического синтеза для производства витаминов часто требуют высоких температур, реакторов под давлением и использования невозобновляемых химикатов или токсичных растворителей, что приводит к проблемам с безопасностью продукции, загрязнению окружающей среды и образованию опасных отходов.

Метод микробной ферментации привлёк значительное внимание благодаря низкой стоимости, низкому энергопотреблению и простоте переработки отходов. В настоящее время исследователи признают ферментацию более экологически чистым и безопасным подходом, чем химические методы. С развитием технологии ферментации этот подход всё чаще применяется в промышленности для увеличения производства различных витаминов. Например, процессы ферментации для производства витамина В₂ (VB₂), витамина В₁₂ (VB₁₂), витамина С и витамина К₂ были успешно интегрированы в промышленную практику.

Помимо вопросов устойчивости, экономика была основным движущим фактором развития биопроцессов в последние десятилетия. Объём мирового рынка ферментированных витаминов увеличился с 5 до 75% в период с 1999 по 2012 г. В целом биопереработка снизила воздействие на окружающую среду и производственные затраты на 43% [3].

Многие микроорганизмы естественным образом производят витамины, но соответствующие метаболические пути жёстко регулируются, поскольку витамины необходимы только в каталитических количествах. Метаболическая инженерия ускоряет развитие фабрик по производству витаминных клеток из микробных клеток, которые могли бы конкурировать с химическими методами, оптимизированными на протяжении десятилетий, но научные препятствия остаются. Чтобы вывести на рынок инновационные биопроцессы, необходимо решить дополнительные технологические и нормативные вопросы [3].

В этом обзоре мы обсуждаем жирорастворимые витамины, такие как витамины А и D, которые можно получить путём зелёной ферментации. Также углубляемся в микроорганизмы-продуценты, передовые биологические методы и узкие места метаболизма различных витаминов.

Фабрики по производству микробных клеток для производства витаминов

Традиционно штаммы, продуцирующие витамины, улучшались посредством мутагенеза и метаболической инженерии, достигаемых с использованием химических (например, химический мутагенез, применение пучка ионов N^+ , ультрафиолетового излучения или лазерный мутагенез) или биологических (например, создание штаммов, генетическая модификация, синтетическая биотехнология) методов. Эти биотехнологические подходы трансформируют клеточные метаболические сети, создавая программируемое “шасси” и “программируемое” целое для эффективной сборки и адаптации внешних компонентов. Химические методы хоть и эффективны, но дороги, экологически вредны и приводят к образованию дорогостоящих отходов. Напротив, микробная ферментация приобрела известность благодаря своей низкой стоимости, энергоэффективности и лёгкой переработке отходов. Этот метод считается более экологичным и безопасным, чем химические альтернативы. По мере развития технологии ферментации её всё чаще используют в промышленности для экономически эффективного производства различных витаминов, таких как B_2 , B_{12} , С и K_2 , с успешной индустриализацией [1].

Фабрики по производству микробных клеток для производства витаминов считаются экологически чистыми и устойчивыми как с экологической, так и с экономической точки зрения (рис. 1). Этот подход предлагает ряд преимуществ, в том числе: (а) экологическую устойчивость — экологически чистые методы производства снижают воздействие на окружающую среду, связанное с традиционным химическим синтезом, такое как загрязнение окружающей среды и опасные отходы; (б) экономическая устойчивость — фабрики по производству микробных клеток обеспечивают экономически эффективный и устойчивый подход к производству витаминов, предлагая более эффективную и экологически чистую альтернативу традиционным методам; (в) широкое применение — витамины, полученные путём микробной ферментации, широко используются в продуктах питания, косметике, кормах, меди-

цине и других областях, способствуя доступности необходимых питательных веществ для различных целей; (г) повышенная безопасность и биологическая активность — витамины, полученные с помощью процессов зелёной ферментации, могут обеспечить повышенную безопасность, биологическую активность и скорость усвоения по сравнению с витаминами, синтезированными традиционными методами; (д) водорастворимые и жирорастворимые витамины — методы зелёного производства охватывают широкий спектр витаминов, включая водорастворимые витамины (такие как витамины группы В и витамин С) и жирорастворимые витамины (такие как Е и К). В целом, производство “зелёных” витаминов с использованием фабрик микробных клеток предлагает устойчивый и экологически чистый подход к удовлетворению глобального спроса на необходимые питательные вещества.



Рис. 1. Основные преимущества процесса микробной ферментации для производства витаминов

Мировой спрос на витамины группы В растёт из-за их широкого применения в пищевой, фармацевтической, кормовой и других отраслях. Хотя большинство витаминов производятся путём химического синтеза, были разработаны успешные промышленные биопроцессы производства витаминов В₂ и В₁₂ с использованием рациональной и классической метаболической инженерии. Fang et al. (2018) создали штамм *Escherichia coli*, который производит витамин В₁₂ посредством разработанного аэробного пути биосинтеза *de novo*. Команде учёных удалось увеличить выход витамина В₁₂ из рекомбинантного штамма *E. coli* более чем в 250 раз до 307.00 мкг г⁻¹ DCW за счёт метаболической инженерии и оптимизации условий ферментации. Кроме того, они не только продемонстрировали, что *E. coli* служит платформой микробного

биосинтеза для производства витамина В₁₂, но также предоставили многообещающий пример того, как десятки белков в сложном биосинтетическом пути могут передаваться между организмами для стимулирования промышленного производства [4].

Жирорастворимые витамины

Витамин А

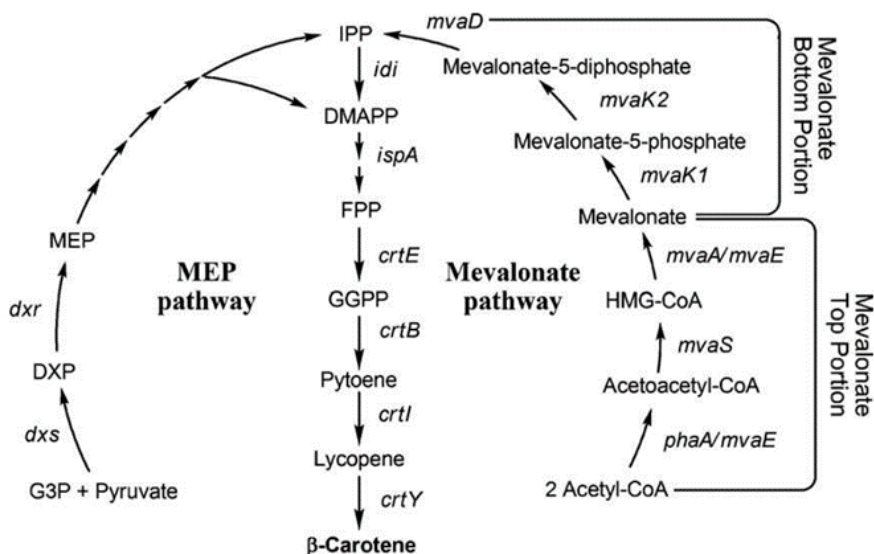
Витамин А в основном включает β-каротин, α-каротин и β-криптоксантин. β-каротин, каротиноидный провитамин А, делится на транс- и цис-изомеры и отвечает за синтез ретиноидов. Полностью транс-β-каротин является основным изомером, обнаруженным в необработанных растительных продуктах, богатых каротином, за ним следуют его цис-изомеры 9 и 13. β-каротин служит антиоксидантом, который не только ингибирует синглетный кислород, но и ингибирует перекисное окисление липидов, тем самым играя решающую роль в профилактике заболеваний [5–7].

Каротиноиды представляют собой семейство терпеноидных пигментов от жёлтого до оранжево-красного цвета, вырабатываемых фотосинтезирующими организмами, включая некоторые бактерии, грибы и водоросли. В промышленности каротиноиды находят применение в фармацевтических препаратах, нутрицевтиках и кормовых добавках, а также служат красителями в косметике и пищевых продуктах. Хотя в настоящее время 90% коммерческого β-каротина синтезируется химическим путём, в последние годы растёт интерес к производству природных каротиноидов посредством микробной ферментации. Каротиногенные микробы, такие как *Xanthophyllomyces dendrorhous*, водоросли *Haematococcus* и *Blakeslea trispora*, были исследованы для крупномасштабного производства. Растущий интерес к микробным каротиноидам обусловлен предпочтениями потребителей в отношении натуральных добавок и потенциальной экономической эффективностью массового производства с помощью микробной биотехнологии. Наличие каротиноидных генов у каротиногенных микробов позволило синтезировать каротиноиды у некаротиногенных микробов, таких как, *Escherichia coli*, *Zygomonas mobilis*, *Candida utilis* и *Saccharomyces cerevisiae*. В частности, *E. coli* является отличным хозяином для производства каротиноидов, поскольку она обладает мощными генетическими инструментами метаболической инженерии и легко экспрессирует многочисленные каротиногенные гены, способные продуцировать различные каротиноиды, такие как ликопин, зеаксантин и астаксантин [8].

Каротиноиды происходят из двух общих строительных блоков: изопентенилдифосфата (IPP) и диметилаллилдифосфата (DMAPP), которые синтезируются по пути MVA у эукариот или по пути 2-C-метил-D-эритрит-4-фосфата (MEP) у прокариот (рис. 2).

Увеличение синтеза строительных блоков IPP и DMAPP посредством метаболической инженерии, а также балансировка экспрессии каротиногенных генов для эффективного преобразования строительных

блоков в нужные каротиноиды является способом увеличения производства каротиноидов. Для улучшения производства каротиноидов в *E. coli* через путь MEP было использовано несколько стратегий. Во-первых, биосинтез каротиноидов был усилен за счёт увеличения метаболического притока к пути MEP за счёт сверхэкспрессии ключевых изопреноидных генов, таких как ген 1-дезоксид-Д-ксилозу-5-фосфат-синтазы (*dxs*) и ген, кодирующий изопентенилдифосфатизомеразу (*idi*), чтобы увеличить поставки IPP и DMAPP. Во-вторых, выработка каротиноидов была улучшена за счёт увеличения поставок двух важных предшественников пути MEP (пирувата и глицеральдегид-3-фосфата). В-третьих, систематические методы, основанные на стехиометрических моделях в масштабе генома, использовались для определения целей нокаута или амплификации генов для увеличения производства каротиноидов. В-четвёртых, методы, основанные на транспозонах или дробовике, использовались для идентификации целей нокаута или амплификации генов, которые улучшали выработку каротиноидов посредством регуляторных, кинетических или других неидентифицированных механизмов, которые не могли быть идентифицированы с помощью стехиометрических моделей [9].



Источник: [8].

Рис. 2. Биосинтез β-каротина в рекомбинантной *Escherichia coli*

Примечание: IPP, предшественник биосинтеза β-каротина, синтезируется как по пути MEP, так и по пути MVA. Путь MVA был разделён на две части: верхнюю (от ацетил-КоА к MVA) и нижнюю (от MVA к IPP и DMAPP). Верхняя часть состоит из генов *phaA* (ацетил-КоА-ацетилтрансфераза), *mvaS* (HMG-КоА-синтаза) и *mvaA* (HMG-КоА-редуктаза), а нижняя часть состоит из *mvaK1* (мевалонат-киназа), *mvaK2* (фосфомевалонат-киназа), *mvaD* (дифосфомевалонатдекарбоксилаза) и *idi* (IPP-изомеразы). IPP преобразуется в β-каротин через путь синтеза чужеродных каротиноидов, который включает гены *crtE*, *crtB*, *crtI* и *crtY*.

Сокращения: G3P — глицеральдегид-3-фосфат; DXP — 1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфат; MEP — 2-С-метил-Д-эритрит-4-фосфат; HMG-CoA — 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА; IPP — изопентенилдифосфат; DMAPP — диметилаллилдифосфат; FPP — фарнезилдифосфат; GGPP — геранилгеранилдифосфат.

Используя *E. coli* в качестве хозяина, приток IPP и DMAPP можно значительно увеличить, внедрив в неё гетерологичный путь MVA [10, 11]. Продукция ликопина в *E. coli* может быть увеличена в несколько раз при использовании нижнего пути MVA из *S. pneumoniae* с экзогенным добавлением мевалоната [10]. Также было продемонстрировано, что наибольшая продукция β-каротина может быть достигнута в *E. coli*, используя тот же нижний путь MVA, что и *S. pneumoniae*, с экзогенным добавлением мевалоната [11].

Yoon et al. (2009) увеличили синтез строительных блоков IPP (изопентенилдифосфат) и DMAPP (диметилаллилдифосфат) путём введения гетерологичного пути MVA (мевалоната), тем самым увеличивая выработку каротиноидов. Рекомбинантная *E. coli* DH5α, несущая весь путь MVA и гены синтеза β-каротина, продуцировала β-каротин на уровне 465 мг/л с концентрацией глицерина 2% (w/v).

Аденозинтрифосфат (АТФ) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) являются двумя важными кофакторами в пути биосинтеза терпеноидов. Zhao et al. (2013) спроектировали и оптимизировали путь синтеза β-каротина в *E. coli*, а затем разработали центральные метаболические модули для увеличения запасов АТФ и НАДФН, тем самым улучшая выработку β-каротина. Лучший штамм, CAR005, увеличивал выработку β-каротина до 2,1 г/л с выходом 60 мг/г DCW при периодической ферментации с подпиткой [9].

Larroude et al. (2018) объединили традиционные стратегии метаболической инженерии с новыми инструментами синтетической биологии, чтобы превратить *Yarrowia lipolytica* в промышленно конкурентоспособного производителя β-каротина. Они сверхэкспрессировали гетерологичную каротинсинтазу (Crt) в *Y. lipolytica*, что привело к выработке большого количества β-каротина. Выход ферментации сконструированного штамма, полученного путём подбора лучшего промотора, достигал 1,5 г/л. За счёт оптимизации условий ферментации и использования периодической ферментации с подпиткой выход β-каротина был дополнительно увеличен до 6,5 г/л и 90 мг/г DCW, одновременно производя 42,6 г/л липидов. Они пришли к выводу, что такие высокие титры позволяют предположить, что сконструированный *Y. lipolytica* является конкурентоспособным организмом, продуцирующим β-каротин [12].

Однако недостаточная доступность прекурсоров создала серьёзную проблему для процесса индустриализации синтеза β-каротина в будущем.

Витамин D

Витамин D принадлежит к группе жирорастворимых секостероидов, ответственных за усиление кишечной абсорбции магния, кальция и фосфатов, а также за различные другие биологические эффекты.

Наиболее важными соединениями группы витамина D являются витамин D₂ (эргокальциферол) и витамин D₃ (холекальциферол). Витамин D играет ключевую роль в повышении кишечной абсорбции кальция, магния и фосфатов, способствуя тем самым профилактике различных заболеваний [13].

Хорошо известно, что предшественником витамина D₂ является эргостерин. Витамин D₂ широко используется в медицинской, пищевой и других отраслях промышленности. В настоящее время коммерческое производство эргостерина осуществляется в основном путём дрожжевого брожения. Популярные методы усиления ферментации эргостерина включают оптимизацию культуральной среды и скрининг штаммов с высоким содержанием эргостерина. Различные источники углерода, источники азота и другие питательные вещества по-разному влияют на рост клеток и накопление эргостерина. Содержание эргостерина можно увеличить примерно до 2% биомассы (сухого веса) с использованием оптимизированной среды культивирования [14].

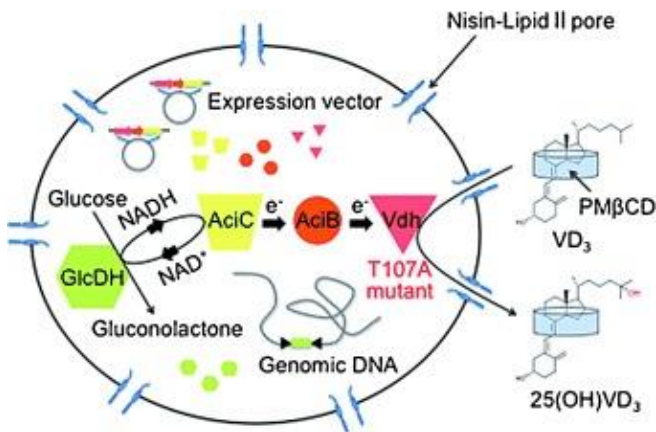
Tan et al. (2003) улучшил выработку эргостерина за счёт оптимизации ферментационной среды и отбора штаммов с высоким содержанием эргостерина. Было обнаружено, что растворенный кислород (DO) может служить эффективным параметром для контроля периодического брожения дрожжей с подпиткой. Общий выход эргостерина может быть увеличен до 1160 мг/л, если поддерживать DO на уровне 12% ($\pm 1\%$) и использовать периодическое импульсное питание [14].

Витамин D₃ не может играть непосредственную роль в организме человека и животного, но в результате метаболизма в печени может образовывать физиологически активную форму 25-гидроксивитамин D₃ (25(OH)VD₃), которая является основной циркулирующей формой витамина D и используется в качестве маркера для оценки статуса витамина D в организме. Превращение витамина D₃ в 25(OH)VD₃ является решающим этапом метаболизма витамина D и имеет важное значение для его биологических функций. В дальнейшем 25(OH)VD₃ метаболизируется в почках с образованием биологически активной формы витамина D, 1 α ,25-дигидроксивитамина D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃), который играет ключевую роль в гомеостазе кальция и фосфатов, костной ткани, здоровье и различных других физиологических процессах.

В настоящее время процесс получения 25(OH)VD₃ в основном включает химический синтез и световое облучение. Стадии химических реакций сложны, для некоторых требуются галогенные реагенты, а в ходе реакции образуются рацематы, что усложняет разделение. Поэтому всё большее число исследователей обращают своё внимание на ферментацию 25-гидроксивитамина D₃ (25(OH)VD₃) микроорганизмами. Штаммы, используемые в микробном биосинтезе, в основном включают *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Pseudonocardia* sp., и *Mycobacterium*. Гидроксилаза витамина D₃ (Vdh) представляет собой разновидность монооксигеназы цитохрома P450, которая может катализировать двухстадийное гидроксилирование витамина D₃ (VD₃) с обра-

зованием 25(OH)VD₃ и 1 α ,25-дигидроксивитамина D₃. Эти гидроксильированные формы VD₃ используются в качестве фармацевтических средств для лечения состояний, связанных с дефицитом VD₃ и метаболическими нарушениями VD₃ [15].

Yasutake et al. (2013) описали создание высокоактивного мутанта T107A Vdh путём разработки предполагаемого сайта связывания ферредоксина (рис. 3). Кристаллографический и кинетический анализы показали, что мутация T107A приводит к конформационному изменению из открытого состояния в закрытое, тем самым увеличивая сродство к связыванию ферредоксина. Они также сообщили об эффективном биокаталитическом синтезе 25(OH)VD₃, многообещающего промежуточного продукта для синтеза различных гидроксильированных производных VD₃, с использованием обработанных низином клеток *Rhodococcus erythropolis*, содержащих Vdh_{T107A}. Кассета экспрессии генов, кодирующая глюкозодегидрогеназу-IV из *Bacillus megaterium*, была интегрирована в хромосому *R. erythropolis* и экспрессирована для предотвращения истощения NADH в цитоплазме вовремя биотрансформации. В результате в ходе 2-часовой биотрансформации было успешно синтезировано 573 мкг мл⁻¹ 25(OH)VD₃ [15].



Источник: [15].

Рис. 3. Биокаталитический синтез 25(OH)VD₃ с использованием обработанных низином клеток *Rhodococcus erythropolis*, содержащих Vdh_{T107A}

Хотя в настоящее время в промышленном производстве витамина D₃ в основном преобладает химический синтез, методы микробного синтеза более устойчивы и не производят примесей в процессе биосинтеза. Поэтому в будущем промышленном производстве ожидается, что микробный синтез будет иметь приоритет.

Заключение

Ферментативное производство витаминов с использованием бактерий, дрожжей или микроводорослей имеет множество преимуществ по сравнению с традиционными методами химического синтеза.

С точки зрения безопасности, биологической активности, скорости всасывания и т.д., витамины, полученные биологическими методами, могут быть более пригодны как для внутреннего, так и для наружного применения. Современный биосинтез витамина А сосредоточен в основном на β -каротине. Биосинтез β -каротина успешно превратился в крупномасштабный производственный процесс посредством классической и рациональной микробной метаболической инженерии. Однако из-за высоких промежуточных отраслевых барьеров и сложного процесса синтеза и метаболизма будущие исследования столкнутся с более сложными задачами. В настоящее время промышленное производство витамина D осуществляется в основном путём химического синтеза активного $25(\text{OH})\text{VD}_3$ и $1\alpha,25$ -дигидроксивитамина D_3 , но самым большим препятствием является гарантированное качество и надёжность поставок сырья, которым должен быть холестерин с чистотой более 95% (класс NF). Таким образом, ключом к решению проблемы сырья является создание большего количества продуцирующих бактерий, оптимизация их метаболических путей и повышение их продуктивности [1, 13].

Развитие синтетической биотехнологии открывает новые возможности для создания фабрик по производству витаминных клеток. Ключевые технологии, такие как высокопроизводительный скрининг высокопродуктивных штаммов, технология редактирования генома CRISPR/Cas9 и технология автоматической сборки генов, предоставляют необходимые технические инструменты для сбора и генетической модификации клеток шасси. Для усиления выработки витаминов трансформируются сложные ферментативные пути, создаётся устойчивая микробная флора, применяются передовые инженерные технологии. К ним относятся контроль температуры, вызванный холодовым шоком, системы динамической экспрессии генов, биосенсоры, бесклеточные системы и компьютерное проектирование. Модульные и ортогональные стратегии поддерживают строительство фабрик по производству витаминных клеток. Проблемы заключаются в совместимости биологических и инженерных систем, а также в универсальности реконструкции биологических систем. Достижения в области технологий, междисциплинарные исследования и интеграция новых стратегий имеют решающее значение для создания эффективных фабрик микробных клеток для ферментации витаминов. Главной целью является достижение более широкого, безопасного и устойчивого промышленного производства витаминов посредством постоянного развития синтетической биотехнологии и метаболической инженерии [1].

Список источников

1. Wang Y., Liu L., Jin Z. [et al]. Microbial Cell Factories for Green Production of Vitamins // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. Vol. 9: 661562. — DOI 10.3389/fbioe.2021.661562.
2. Vandamme E.J., Revuelta J.L. Comprehensive summary of the history, discovery, natural sources, physiological role and deficiency of vitamins including the B group // *Current Opinion in Biotechnology*. 2019. Vol. 56. P. 18–29.

3. Acevedo-Rocha C.G., Gronenberg L.S., Mack M. [et al]. Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins // *Current Opinion in Biotechnology*. 2019. Vol. 56. P. 18–29. — DOI 10.1016/j.copbio.2018.07.006.
4. Fang H., Li D., Kang J. [et al]. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for de novo biosynthesis of vitamin B₁₂ // *Nature Communications*. 2018. Vol. 9: 4917. — DOI 10.1038/s41467-018-07412-6.
5. Wise L.A., Wesselink A.K., Bethea T.N. [et al]. Intake of lycopene and other carotenoids and incidence of uterine leiomyomata: a prospective ultrasound study // *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2021. Vol. 121. P. 92–104. — DOI 10.1016/j.jand.2020.08.013.
6. Yang Y., Li R., Hui J. [et al]. β -Carotene attenuates LPS-induced rat intestinal inflammation via modulating autophagy and regulating the JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPK signaling pathways // *Journal of Food Biochemistry*. 2021. Vol. 45: e13544. — DOI 10.1111/jfbc.13544.
7. Kawata A., Murakami Y., Suzuki S. [et al]. Anti-inflammatory activity of β -carotene, lycopene and tri-n-butylborane, a scavenger of reactive oxygen species // *In Vivo*. 2018. Vol. 32. P. 255–264. — DOI 10.21873/invivo.11232.
8. Yoon S.H., Lee S.H., Das A. [et al]. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E. coli* // *Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 140. P. 218–226. — DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.01.008.
9. Zhao J., Li Q., Sun T. [et al]. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production // *Metabolic Engineering*. 2013. Vol. 17. P. 42–50. — DOI 10.1016/j.ymben.2013.02.002.
10. Yoon S.H., Lee Y.M., Kim J.E. [et al]. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate // *Biotechnology and Bioengineering*. 2006. Vol. 94. P. 1025–1032.
11. Yoon S.H., Park H.M., Kim J.E. [et al]. Increased beta-carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition // *Biotechnology Progress*. 2007. Vol. 23. P. 599–605. — DOI 10.1021/bp070012p.
12. Larroude M., Celinska E., Back A. [et al]. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene // *Biotechnology and Bioengineering*. 2018. Vol. 115. P. 464–472. — DOI 10.1002/bit.26473.
13. Yuan P., Cui S., Liu Y. [et al]. Metabolic engineering for the production of fat-soluble vitamins: advances and perspectives // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 104. P. 935–951. — DOI 10.1007/s00253-019-10157-x.
14. Tan T., Zhang M., Gao H. Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* // *Enzyme and Microbial Technology*. 2003. Vol. 33. P. 366–370. — DOI 10.1016/s0141-0229(03)00132-7.
15. Yasutake Y., Nishioka T., Imoto N. [et al]. A single mutation at the ferredoxin binding site of P450 Vdh enables efficient biocatalytic production of 25-hydroxyvitamin D₃ // *Chembiochem*. 2013. Vol. 14. P. 2284–2291. — DOI 10.1002/cbic.201300386.

Сведения об авторах / About authors

Максименко Анастасия Александровна, Ph.D., доцент, доцент департамента комплексных проектов, Передовая инженерная школа “Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем”, Дальневосточный федеральный университет. 690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10. ORCID: 0000-0002-3665-1484. E-mail: anastasiia.a.mak@gmail.com.

Anastasiia A. Maksimenko, Ph.D., Assistant Professor of the Department of Complex Projects of the Advanced Engineering School “Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems”, Far Eastern Federal University. FEFU Campus, 10 Ajax Bay, Russky Island, Vladivostok 690922, Russia. ORCID: 0000-0002-3665-1484. E-mail: anastasiia.a.mak@gmail.com.

Подволоцкая Анна Борисовна, кандидат биологических наук, доцент, декан факультета биоэкономики и биобезопасности, Передовая инженерная школа “Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем”, Дальневосточный федеральный университет. 690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10. Заместитель руководителя, ООО “Арника”. 692481, Россия, Приморский край, с. Вольно-Надеждинское, ул. Центральная, 42. ORCID: 0000-0002-7450-4362. E-mail: podvolotckaia.ab@dvfu.ru.

Anna B. Podvolotskaya, Ph.D. in Biology, Research Engineer of the Advanced Engineering School “Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems”, Far Eastern Federal University. FEFU Campus, 10 Ajax Bay, Russky Island, Vladivostok 690922, Russia. Deputy Head, Molecular Biology, Biotechnology and Bioinformatics Center, R&D, Arnika Ltd. Central 42, Volno-Nadezhdinskoe, Vladivostok 692481, Russia. ORCID: 0000-0002-7450-4362. E-mail: podvolotckaia.ab@dvfu.ru.

Сон Оксана Михайловна, кандидат технических наук, заместитель директора по научной работе, Передовая инженерная школа “Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем”, Дальневосточный федеральный университет. 690922 Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10. Директор R&D “Агробиоэкономика”, ООО “Арника”. 692481, Россия, Приморский край, с. Вольно-Надеждинское, ул. Центральная, 42. ORCID: 0000-0002-7995-7387. E-mail: son.om@dvfu.ru.

Oksana M. Son, Ph. D. in Technical Sciences, Deputy Director for Science of Advanced Engineering School “Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems”, Far Eastern Federal University. FEFU Campus, 10 Ajax Bay, Russky Island, Vladivostok 690922, Russia. Director of the Molecular Biology, Biotechnology and Bioinformatics Center, R&D, Arnika Ltd. Central 42, Volno-Nadezhdinskoe, Vladivostok 692481, Russia. ORCID: 0000-0002-7995-7387. E-mail: son.om@dvfu.ru.

Гончаренко Софья Игоревна, лаборант-исследователь, департамент комплексных проектов, Передовая инженерная школа “Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем”, Дальневосточный федеральный университет. 690922 Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10. Научный сотрудник ООО “Арника”. 692481, Россия, Приморский край, с. Вольно-Надеждинское, ул. Центральная, 42. ORCID: 0009-0007-2902-5841. E-mail: goncharenko.si@dvfu.ru.

Sofiya I. Goncharenko, Research Laboratory Assistant, Integrated Projects Department of the Advanced Engineering School “Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems”, Far Eastern Federal University. FEFU Campus, 10 Ajax Bay, Russky Island, Vladivostok 690922, Russia. Researcher of the Arnika Ltd. Central 42, Volno-Nadezhdinskoe, Vladivostok 692481, Russia. ORCID: 0009-0007-2902-5841. E-mail: goncharenko.si@dvfu.ru.

Стёпочкина Варвара Дмитриевна, аспирант Передовой инженерной школы “Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем”, Дальневосточный федеральный университет. 690922, Россия, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10. Руководитель центра химической безопасности ООО “Арника”. 692481, Россия, Приморский край, с. Вольно-Надеждинское, ул. Центральная, 42. ORCID: 0000-0002-4124-6002. E-mail: stepochkina.vd@dvfu.ru.

Varvara D. Stepochkina, Post-graduate student of Advanced Engineering School “Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems”, Far Eastern Federal University. FEFU Campus, 10 Ajax Bay, Russky Island, Vladivostok 690922, Russia. Head of the Chemical Safety Center of the Arnika Ltd. Central 42, Volno-Nadezhdinskoe, Vladivostok 692481, Russia. ORCID: 0000-0002-4124-6002. E-mail: stepochkina.vd@dvfu.ru.

Шинкарук Павел Алексеевич, аспирант, Передовая инженерная школа “Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем”, Дальневосточный федеральный университет. 690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10. ORCID: 0009-0001-7653-6819. E-mail: shinkaruk.pa@dvfu.ru.

Pavel A. Shinkaruk, Post-graduate student of Advanced Engineering School “Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems”, Far Eastern Federal University. FEFU Campus, 10 Ajax Bay, Russky Island, Vladivostok 690922, Russia. E-mail: shinkaruk.pa@dvfu.ru.

© Максименко А.А., Подволоцкая А.Б., Сон О.М.,
Гончаренко С.И., Стёпочкина В.Д., Шинкарук П.А., 2023
© Maksimenko A.A. Podvolotskaya A.B., Son O.M.,
Goncharenko S.I., Stepochkina V.D., Shinkaruk P.A., 2023

Адрес сайта в сети Интернет: <http://jem.dvfu.ru>