



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122821** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12P 25/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

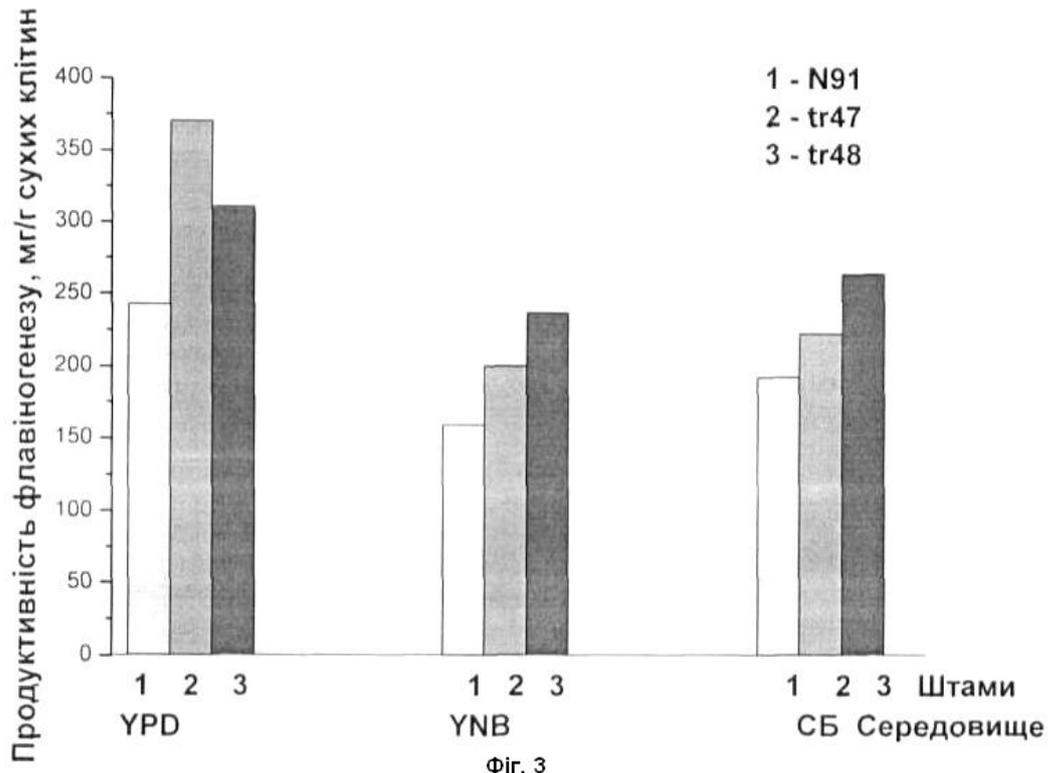
<p>(21) Номер заявки: а 2018 11788</p> <p>(22) Дата подання заявки: 29.11.2018</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 07.01.2021</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 10.06.2020, Бюл.№ 11</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 06.01.2021, Бюл.№ 1</p>	<p>(72) Винахідник(и): Цирульник Андрій Олександрович (UA), Федорович Дарія Василівна (UA), Колодій Олена Миколаївна (UA), Дмитрук Костянтин Васильович (UA), Сибірний Андрій Андрійович (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів-5, 79005 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 5231007 A, 27.07.1993 UA 90812 C2, 25.05.2010 UA 87684 C2, 10.08.2009 EP 1426450 B1, 09.06.2004 KR 100542565 B1, 11.01.2006 KR 100542573 B1, 11.01.2006 US 200523916 A1, 27.10.2005 CN 100430471 C, 05.11.2008 CN 1303434 A, 11.07.2001</p>
---	---

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ CANDIDA FAMATA З ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ СИНТЕЗУ ВІТАМІНУ В₂ (РИБОФЛАВІНУ)

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі біотехнології і є способом отримання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* з підвищеною продукцією вітаміну В₂, шляхом введення в геном штаму *C. famata* - надсинтетика рибофлавіну вектора, який містить фрагмент ДНК, що забезпечує надекспресію генетичної інформації про екскрецію рибофлавіну, отримано штамми з підвищеним рівнем синтезу цього вітаміну.

UA 122821 C2



Винахід належить до галузі біотехнології і є способом отримання ефективного продуцента рибофлавіну (РФ) дріжджів *Candida famata* за рахунок посилення екскреції цього вітаміну в культуральне середовище.

РФ застосовується як лікарський препарат, а також як кормова і харчова добавка, оскільки в організмі людини і тварин він не утворюється. У даний час вітамін В₂ отримують, використовуючи мікробний синтез. Продуцентами РФ є цвілеві гриби *Ashbya gossypii* та *Eremothecium ashbyi*, рекомбінантні штами бактерій *Bacillus subtilis*, а також дріжджі *Candida famata*, які дають приблизно однаковий вихід кінцевого продукту [1].

Перевагою дріжджів є їх здатність рости на простих живильних середовищах, напівпродуктах та відходах харчової промисловості при температурі 30-37 °С. Описано штами *C. famata*, які утворюють 3,8 г РФ/л [2], 10 г РФ/л [3], а також *C. famata* АТСС 20849, який синтезує 2,5 г РФ/л, а в 450-літровому ферментері за спеціально підібраних умов продукція РФ цим штамом після 200 годин ферментації становить 21 г/л [4]. Однак, неоліком описаних штамів *C. famata*, як продуцентів РФ, є їх генетична нестабільність, що приводить до утворення під час ферментації штамів, нездатних до надсинтезу вітаміну В₂, тому доводиться зупиняти процес та міняти культуру дріжджів у ферментерах. Це знижує рентабельність процесу біотехнологічного одержання РФ.

Отримано штами *C. famata* - продуценти РФ з високою стабільністю за ознакою "надсинтез РФ" [5, 6], які нагромаджують при вирощуванні в колбах у простому цукрово-мінеральному середовищі більше 1 г РФ/л. В оптимізованих умовах при вирощуванні у ферментері сконструйований штам *C. famata*, що містить по дві копії генів SEF1, RIB1, RIB7, утворював до 16 г РФ/л [6]. Однак продукція РФ цим штамом є нижчою, порівняно з найкращим нестабільним продуцентом РФ [4].

Здатність мікроорганізмів акумулювати РФ в культуральному середовищі свідчить про те, що вони активно секретують цей вітамін. Посилення виходу РФ з клітини може привести до підвищення флавіногенної активності та нагромадження його у культуральному середовищі.

Найбільш близьким до запропонованого способу є отримання РФ за допомогою стабільного надсинтетика *C. famata*, що містить по дві копії генів SEF1, RIB1, R1B7 [6]. Неоліком описаного надсинтетика є нижча, в порівнянні з найкращим нестабільним дріжджовим продуцентом РФ [4], продуктивність біосинтезу РФ.

В основу винаходу поставлено задачу підвищити синтез РФ шляхом конструювання рекомбінантних штамів дріжджів *C. famata* з посиленою експресією дріжджового гомолога білка-транспортера РФ ссавців BCRP (breast cancer resistance protein), який у лактуючих самок забезпечує вихід РФ з клітин молочної залози в молоко, а у рекомбінантних дріжджів забезпечує екскрецію РФ до культурального середовища.

Поставлена задача вирішується тим, що в геном штаму *C. famata* - стабільного надсинтетика РФ, що містить по дві копії генів SEF1, RIB1, RIB7, згідно з винаходом, додатково вводять плазмиду, яка містить гомолог гена BCRP, що кодує систему екскреції РФ, генетично близького до *C. famata* виду дріжджів *Debaryomyces hansenii* під контролем сильного промотора фактора елонгації трансляції - TEF1 дріжджів *D. hansenii*, що забезпечує посилення виходу РФ з клітин.

У запропонованому способі використовуються методи: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), конструювання рекомбінантної плазмиди, виділення плазмиди з *Escherichia coli*, рестрикційний аналіз, електрофорез в агарозному гелі, трансформація *E. coli* методом електропорації, описані в [7]. Трансформацію *C. famata* проводять, як описано в [8]. Виділення сумарної ДНК з трансформантів *C. famata* проводять як для *S. cerevisiae* [9]. Вміст РФ визначають флюориметрично на приладі Turner Quantech Digital Filter 109510-33.

Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *C. famata* з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну) ілюструється графічними матеріалами: На Фіг. 1 зображена лінійна схема плазмиди pUC57_TEF1_BCRP_ble (4.0 т.п.н.), де відкриту рамку трансляції гена ble *Staphylococcus aureus* позначено товстою сірою лінією; промотор гена TEF1 - товстим білим відрізком; бактерійна послідовність pUC57 - тонкою лінією; товстим чорним відрізком позначено гомолог гена BCRP *Debaryomyces hansenii*; скорочення сайтів рестрикції: HindIII; BamHI; PstI; SacI; EcoRI. На Фіг. 2 зображено продуктивність флавіногенезу реципієнтного штаму *C. famata* № 91 та отриманих рекомбінантних штамів, що містять додатковий ген BCRP, де на осі абсцис позначено номери штамів, а на осі ординат - продуктивність флавіногенезу (кількість утвореного РФ в перерахунку на мг біомаси). Час вирощування 3 доби. На Фіг. 3 зображено продуктивність флавіногенезу реципієнтного штаму *C. famata* № 91 та отриманих рекомбінантних штамів tr47 і tr48, що містять ген BCRP, вирощених у середовищах різного складу, де на осі абсцис

позначено номери штамів та назва середовища, а на осі ординат - продуктивність флавіногенезу (кількість утвореного РФ в перерахунку на мг біомаси). Час вирощування 3 доби.

Пропонований спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *S. famata* з підвищеним рівнем синтезу вітаміну B₂ (рибофлавіну) здійснюють кількома етапами:

5 Етап 1. Конструювання плазміди, що містить ген BCRP.

Ген BCRP у тварин кодує білок, який відповідає за виділення РФ у молоко. Гомолог цього гена знайдено у дріжджів *Pichia guilliermondii* та встановлено його участь в екскреції РФ [10]. Оскільки геном дріжджів *S. famata* не секвеновано, ми використовуємо ген BCRP генетично близького виду *Debaryomyces hansenii* з секвенованим геномом. Для конструювання плазміди, що містить ген екскретази BCRP, як плазмиду-носії, використовують дріжджову інтегративну плазмиду pUC57 із клонуваними в її склад промотором і термінатором TEF1 *D. hansenii* та маркерним геном *ble S. aureus*, білковий продукт якого забезпечує резистентність до флеоміцину. Ген екскретази BCRP виділяють із геномної ДНК *D. hansenii* і ампліфікують за допомогою ПЛР. Праймери, які використовують у реакції, містять послідовності сайтів рестрикції BamHI та PstI (ExFw: cgcGGATCCatgatctataagtaacccaatg, ExRw: aaaCTGCAGtcactttctcaactttaaccaas, розмір продукту ПЛР 1857 п.н.) необхідні для подальшого клонування цього фрагменту у плазмиду. Для перевірки наявності гена екскретази BCRP у сконструйованій плазміді проводять рестрикційний аналіз, з використанням різних комбінацій ферментів рестрикції, зокрема: EcoRV/HindIII (розмір фрагментів: 6078, 665), EcoRV/NdeI (розмір фрагментів 3658, 3085), EcoRV/XhoI (розмір фрагментів 4612, 2131).

Отриману плазмиду позначено як pUC57_TEF1_BCRP_ble (Фіг. 1). Цю плазмиду використовують для трансформації стабільного флавіногенного штаму дріжджів *S. famata* № 91 [6], попередньо здійснивши її лінеаризацію за допомогою рестрикційного ферменту XhoI.

Етап 2. Одержання рекомбінантних штамів *S. famata* з додатковою копією гена BCRP

Для отримання рекомбінантних штамів з підвищеним рівнем синтезу вітаміну B₂ зі стабільного надсинтетика РФ *S. famata* № 91 [6] його трансформують плазмідною pUC57_TEF1_BCRP_ble (Фіг. 1), що містить ген BCRP, за допомогою електропорації. Після трансформації клітини висівають на селективне YPD середовище, що містить антибіотики ампіцилін (100 мг/л) та флеоміцин (20 мг/л). Колонії, здатні рости на селективному середовищі, з'являються після 3 днів інкубації з частотою приблизно 50 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК. Трансформовані клітини стабілізують культивуванням у неселективному середовищі протягом 15-17 генерацій з наступним перенесенням на селективне середовище з флеоміцином. Наявність гена BCRP в геномі підтверджують за допомогою методу ПЛР. Перевіряють здатність до надсинтезу РФ в отриманих трансформантах. Отримані трансформанти нагромаджують в культуральному середовищі більше РФ, ніж реципієнтний штам *S. famata* № 91. Продуктивність синтезу РФ отриманими рекомбінантними штамми у 1,4-4,3 рази вища порівняно з реципієнтним штамом № 91 (Фіг. 2).

Етап 3. Перевірка здатності до надсинтезу РФ рекомбінантними штамми *S. famata*, що містять додатковий ген BCRP.

Для перевірки здатності до синтезу РФ штами *S. famata* вирощують у чашці Петрі на агаризованому багатому середовищі YPD (20 % глюкози, 10 % пептону, 5 % дріжджового екстракту) при 30 °С протягом 1 доби. Отриману культуру висівають в колби (300 мл) з 30 мл середовища YPD, витримують протягом 1-4 діб на круговій качалці (швидкість обертання 200 об./хв) при 28 °С, після чого визначають вміст РФ в культуральній рідині. Результати досліджень наведено в Табл. 1.

Таблица 1

Динаміка продукування РФ штамами *S. famata*, що містять ген BCRP, та реципієнтним штамом *S. famata* № 91, вирощеними у середовищі YPD

Час росту, діб	Вміст РФ, мг/л		
	Штами		
	tr47	tr48	№ 91
1	81,1±2,1	164,3±8,2	60,9±2,1
2	169,2±8,46	281,4±12,4	120,1±4,8
3	1289,1±54,1	1669,0±78,4	1054,2±47,4
4	1435,2±64,6	1694,2±81,3	1292,2±62,0

Як видно з Табл. 1, обидва рекомбінантні штами з введеним геном BCRP (tr47 і tr48) утворюють більше РФ, ніж реципієнтний штам *C. famata* № 91. Продуктивність флавіногенезу (кількість утвореного РФ в перерахунку на одиницю біомаси) штамів, що містять ген BCRP, вирощених у середовищах різного складу, зображено на Фіг. 3. Як видно з Фіг. 3, продуктивність флавіногенезу штамів з введеним геном BCRP у всіх використаних середовищах на 3 добу вирощування у 1,3-1,5 раза вища, порівняно з реципієнтним штамом *C. famata* № 91.

Етап 4. Перевірка стабільності рекомбінантних штамів *C. famata*, що містять додатковий ген BCRP

Для перевірки стабільності штами висівають на чашки з середовищем YPD, через 1 добу засівають у 20 мл цього ж середовища в колби об'ємом 100 мл. Після вирощування протягом 1,5 доби клітини осаджують центрифугуванням, двічі промивають стерильною дистильованою водою і висівають на синтетичне середовище Беркгольдера, що містить 1 % етанол як джерело вуглецю, в кількості 15×10^6 клітин на чашку. Через 10-14 днів підраховують кількість колоній на чашці і розраховують частоту реверсії. Відсутність росту на середовищі з етанолом (Табл. 2) свідчить, що сконструйовані штами tr47 і tr48, що містять ген BCRP, характеризуються такою ж високою стабільністю, як і реципієнтний штам *C. famata* № 91.

Введення додаткової копії гена BCRP у надсинтетик РФ *C. famata* № 91 приводить до підвищення флавіногенної активності та не знижує стабільності за ознакою "надсинтез РФ".

Таблиця 2

Ріст штамів *C. famata* № 91 та рекомбінантних штамів tr47, tr48 на середовищі з сахарозою та етанолом

Штам	Ріст	
	сахароза	етанол
<i>C. famata</i> № 91	+++	Відсутній
<i>C. famata</i> tr47	+++	Відсутній
<i>C. famata</i> tr48	+++	Відсутній

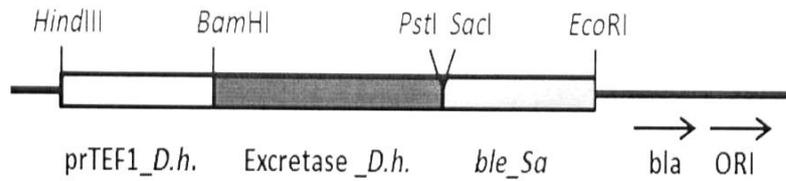
Штами дріжджів *C. famata* з підвищеним рівнем синтезу РФ, отримані за допомогою запропонованого способу, можуть бути використані у виробництві для отримання вітаміну B₂.

Джерела інформації:

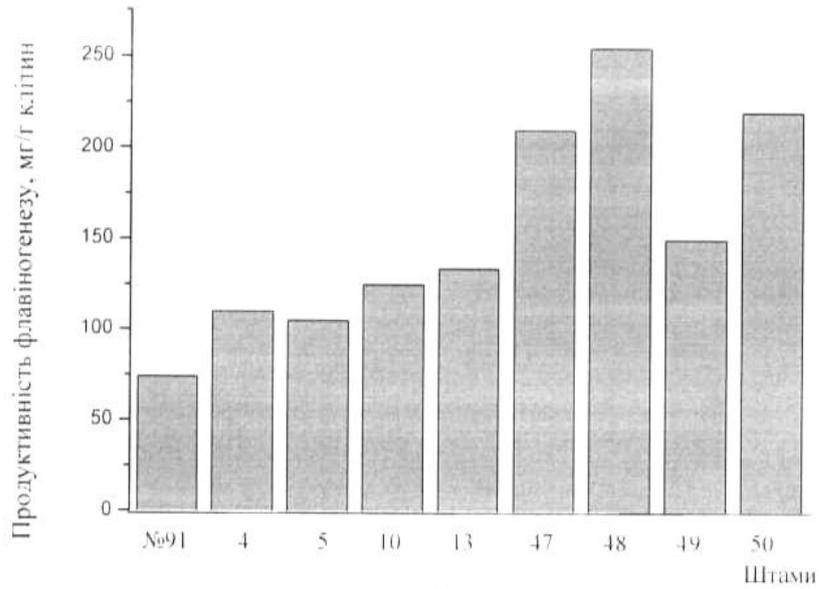
1. Stahmann K.P. et al. *Microbiol. and Biotechnol.* - 2000. - Vol. 53, № 5-P. 509-516.
2. Патент США WO 88/09822. МПК C12N1 5/01, C12N 15/04, C12P 25/00, C12R 1/72. опубл 15.12.1988.
3. Патент США № 5164303, МПК C12N 1/165, C12P 25/00. опубл. 17.11.1992.
4. Патент США № 5231007, МПК C12N 1/16, C12N 15/00, C12P 25/00, опубл. 27.07.1993.
5. Патент України на винахід № 90741, МПК C12N 1/19, C12P 25/00, опубл. 25.05.2010. Бюлетень № 10.
6. Dmytruk K. et al. *Journal of Biotechnology.* - 2014. - Vol. 172. - P. 11-17.
7. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
8. Voronovsky A.A. et al. *FEMS Yeast Research.* - 2002. - Vol. 2. - P. 381-388.
9. Wach A., Pick H., Philipsen P. In: *Molecular Genetics of Yeast. A Practical Approach* (Johnston, J.R., Ed.), IRL Press, Oxford. - 1994. - P. 1-16.
10. Boretsky et al. 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Italy, 13-17 September 2015. Abstract book. S.212.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

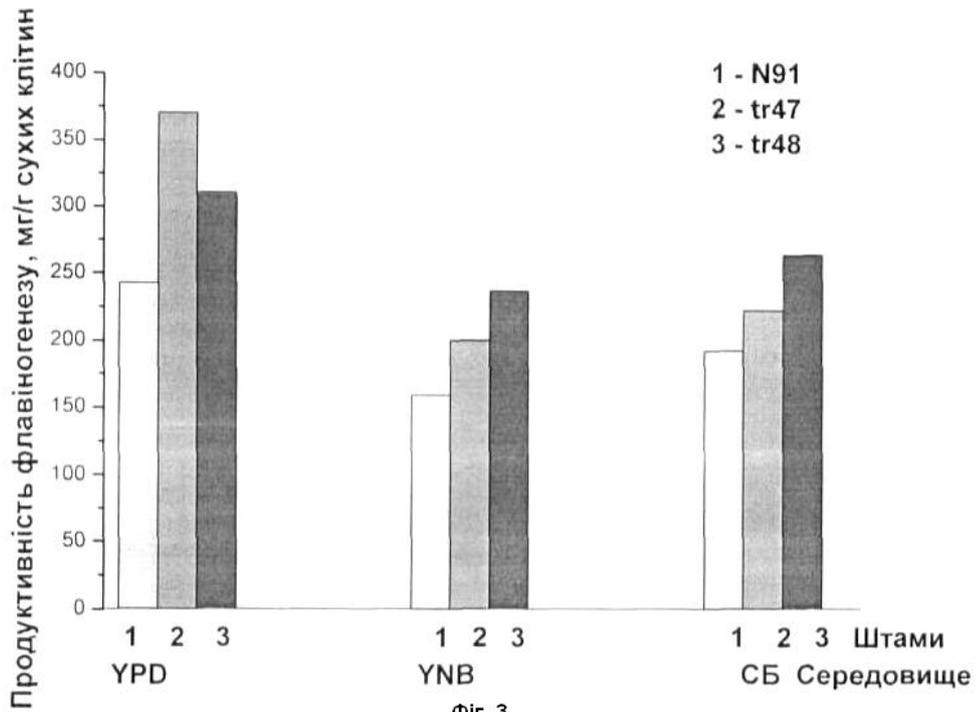
Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* з підвищеним рівнем синтезу вітаміну B₂ (рибофлавіну), який **відрізняється** тим, що в геном штаму *C. famata* - стабільного надсинтетика рибофлавіну, що містить по дві копії генів SEF1, RIB1 і RIB7, додатково вводять плазмиду, яка містить гомолог гена BCRP (breast cancer resistance protein), що кодує систему екскреції рибофлавіну, генетично близького до *C. famata* виду дріжджів *Debaryomyces hansenii* під контролем сильного промотора фактора елонгації трансляції - TEF1 дріжджів *D. hansenii*, що забезпечує посилення виходу рибофлавіну з клітин, та отримують рекомбінантні штами з вищою в 1,3-1,5 разу продукцією рибофлавіну, в порівнянні з реципієнтним штамом.



Фіг.1



Фіг. 2



Фіг. 3