



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **152271** (13) **U**
(51) МПК (2022.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12P 25/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2022 01605</p> <p>(22) Дата подання заявки: 18.05.2022</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 12.01.2023</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 11.01.2023, Бюл.№ 2</p>	<p>(72) Винахідник(и): Дмитрук Костянтин Васильович (UA), Сибірний Андрій Андрійович (UA), Фаюра Любов Романівна (UA), Федорович Дарія Василівна (UA), Цирульник Андрій Олександрович (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, 79005 (UA)</p> <p>(74) Представник: Федорович Дарія Василівна</p>
--	--

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФЛАВІНОВОГО АНТИБІОТИКА АМІНОРИБОФЛАВІНУ

(57) Реферат:

Спосіб отримання флавінового антибіотику амінорибофлавіну полягає у введенні в геном дріжджів генетичної інформації про синтез амінорибофлавіну, у якому модифіковані послідовності гена *rosB* бактерії *Streptomyces davaonensis* поміщають під контроль сильного промотору фактора елонгації трансляції - TEF1 дріжджів *Debaryomyces hansenii*, та вводять як селективний маркер ген *IMH3*, що забезпечує резистентність до мікофенольної кислоти, сконструйованим вектором трансформують штам дріжджів *Candida famata*, здатний до надсинтезу ФМН, та отримують рекомбінантні штами, у культуральній рідині яких накопичується до 5 мг/л амінорибофлавіну.

UA 152271 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології і є способом отримання амінірибофлавіну за допомогою рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata*. Амінірибофлавін є структурним аналогом рибофлавіну (вітаміну B₂), який має бактериостатичний ефект щодо грампозитивних бактерій *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* та *Micrococcus luteus* і може також бути використаний для лікування інфекцій, спричинених штамми *S. aureus*, з множинною стійкістю до антибіотиків. Амінірибофлавін є не токсичним для клітин ссавців (Pedrolli et al., 2014), що робить його перспективним антибактеріальним препаратом. Амінірибофлавін у незначних кількостях продукується бактеріями *Streptomyces davaonensis* та *Streptomyces cinnabarinus*. Хімічний синтез амінірибофлавіну також можливий, але дуже складний і дорогий, тому одержання його шляхом конструювання дріжджових продуцентів має велику науково-практичну цінність. На сьогоднішній день амінірибофлавін комерційно не виробляється.

Амінірибофлавін синтезується з рибофлавіну, який зазнає фосфорилування рибофлавінкіназою з утворенням флавінмононуклеотиду (Schwarz et al., 2016). Встановлено, що у *S. davaonensis* амінірибофлавін утворюється у трьох послідовних реакціях, які каталізує один фермент - N, N-8-деметил-8-аміно-рибофлавін-5'-фосфатсинтаза, яка кодується геном *rosB* (Schwarz et al., 2016, Konjik et al., 2017). До цього часу не описано жодного прикладу прямого мікробного синтезу значних кількостей амінірибофлавіну. Оскільки синтез флавінових антибіотиків починається з рибофлавіну, як вихідний організм для створення продуцентів доцільно використовувати флавіногенні дріжджі, зокрема *Candida famata*, у яких сконструйовано штами, здатні до надпродукції рибофлавіну і флавінмононуклеотиду.

Штами, здатні до синтезу флавінового антибіотика - амінірибофлавіну у дріжджів та способи їх отримання не описані.

В основу корисної моделі поставлено задачу за допомогою генноінженерних підходів сконструювати рекомбінантні штами дріжджів, здатні до надсинтезу амінірибофлавіну.

Поставлена задача вирішується шляхом модифікації бактерійного гена *rosB*, залученого в біосинтез амінірибофлавіну, конструювання вектора для надекспресії цього гена та отримання рекомбінантних штамів дріжджів *C. famata*, здатних до нагромадження в культуральній рідині амінірибофлавіну.

В основі запропонованого способу лежить введення в геном дріжджів фрагменту ДНК, який несе генетичну інформацію про синтез амінірибофлавіну, що забезпечує високий рівень нагромадження цільового продукту – амінірибофлавіну.

В основі запропонованому способу лежить введення в геном дріжджів модифікованої послідовності гена *rosB* бактерії *S. davaonensis*, який несе генетичну інформацію про синтез амінірибофлавіну, під контролем сильного промотору фактора елонгації трансляції - TEF1 дріжджів *Debaryomyces hansenii* та селективного маркера, гена IMH3, що забезпечує резистентність до мікофенольної кислоти. Шляхом введення сконструйованого вектора у геном штаму дріжджів *C. famata*, здатного до надсинтезу ФМН, отримують резистентні до мікофенольної кислоти рекомбінантні штами, що нагромаджують цільовий продукт - амінірибофлавін у культуральній рідині до 5 мг/л.

Спосіб отримання амінірибофлавіну ілюструється графічними матеріалами:

На Фіг. 1. зображено лінійну схему плазмиди *prosB-IMH3*. Точка початку реплікації ORI та ген стійкості до ампіциліну (*bla*) позначено білими відрізками; промотор та термінатор гена TEF1 *D. hansenii* позначено сірими відрізками; оптимізований ген *rosB* *Streptomyces davaonensis* та ген *ble* *Staphylococcus aureus*, що забезпечує резистентність до флеоміцину, позначені темно сірими відрізками; ген IMH3 *Debaryomyces hansenii*, що забезпечує селекцію трансформантів на середовищі з мікофенольною кислотою позначено чорним відрізком.

На фіг. 2 зображено електрофореграму ПЛР аналізу трансформантів *C. famata* з плазмідною *prosB-IMH3*. L - маркер молекулярної маси фрагментів ДНК (маса фрагментів представлена в т.п.н.); "+" позитивний контроль (плазмиду *prosB-IMH3*), "-" негативний контроль (хромосомна ДНК вихідного штаму *C. famata*). 1-3 - трансформанти *C. famata* 1/3, 1/4, 1/5

На Фіг. 3 зображено хроматографічне розділення на фракції флавінів у культуральному середовищі *S. davaonensis* (1), батьківського штаму *C. famata* #13 (2), похідного штаму 13/pIMH3, що містить плазмиду без касети експресії *rosB* (3), та трансформанти 13/*prosB-IMH3* (1/3; 1/4; 1/5), що містять плазмиду *prosB-IMH3* (4-6).

Спосіб здійснюють кількома етапами:

Етап 1. Конструювання плазмиди для посилення експресії гена *rosB* під промотором TEF1.

Створення штамів дріжджів *C. famata*, які продукуватимуть амінірибофлавін, розпочинають з конструювання плазмиди, що містить ген *rosB* *S. davaonensis*. Відомо, що геном *S. davaonensis* характеризується високим вмістом Г-Ц пар (70,6 %) (Jankowitsch et al., 2012), що може перешкоджати ефективній гетерологічній експресії відповідних генів у *C. famata*, геном якого

містить значно меншу кількість Г-Ц пар (~35,4 %). Для ефективної експресії гена *rosB* *S. davaonensis* в системі *S. famata* використовують послідовності гена *rosB* *S. davaonensis* із модифікованими CTG-кодонами, які було синтезовано основі NCBI Gene ID 31229912 на фірмі BioCat GmbH (Heidelberg, Germany). Модифікація полягає у виключенні послідовностей, які
 5 упізнаються рестриктазами EcoRI (GAATTC), EcoRV (GATATC), NcoI (CCATGG) та PstI (CTGCAG).

Таблица 1

Перелік праймерів, які використовують на першому і другому етапі способу

Назва праймеру	Послідовність нуклеотидів
IMH3F	5'- Ccg CTC GAG gtc gat ggt ctt gat cat tc-3'
IMH3R	5'- CCg CTCGAG GCA TTC TGT TCC AGT TTC TG-3'
RBFa	5'-TAT TGA ACA CAA CCT TGC GTC G-3'
RBRa	5'-ATC CTA ACT GAG ATT CCT CAA CC-3'

Синтетичний модифікований ген *rosB* *S. davaonensis*, який фланкований сайтами для рестриктаз BamHI та PstI, клонують до складу попередньо сконструйованої плазмиди pTTb (Tsygulnyk et al., 2020), використовуючи ці рестриктази між промотором та термінатором гена TEF1 *D. hansenii*. Далі ген IMH3 *D. hansenii*, що кодує інозинмонофосфатдегідрогеназу та забезпечує резистентність до мікофенольної кислоти [Dmytruk et al. 2011] ампліфікують з
 10 геномної ДНК *D. hansenii* CBS767 з використанням праймерів IMH3F та IMH3R (таблиця 1) та клонують у сайт XhoI плазмиди, сконструйовану на попередньому етапі. Кінцева плазіда носить
 15 назву назву *prosB-IMH3* (Фіг. 1).

Етап 2 Отримання штамів, здатних до продукції амінірибофлавіну шляхом трансформації плазмидою *prosB-IMH3* штаму *S. famata* #13 – надсинтетика ФМН.

Для отримання продуцентів амінірибофлавіну, у штам #13 *Candida famata* (Yatsyshyn et al, 2009), здатний до надсинтезу ФМН, вводять вектор *prosB-IMH3* (Фіг. 1), що містить касету експресії гена *rosB* *S. davaonensis* та селективний маркер, ген IMH3, що забезпечує
 20 резистентність до мікофенольної кислоти (МФК). Трансформанти відбирають на агаризованому середовищі YPD з додаванням зростаючих концентрацій МФК. Інтеграцію експресійної касети *rosB* в геном дріжджів підтверджують за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів
 25 специфічних до *rosB*: RBFa / RBRa (Фіг. 2).

Трансформанти стабілізують шляхом культивування на неселективному поживному середовищі протягом 15-17 поколінь з подальшим їх перенесенням на селективне середовище з МФК. Наявність експресійної касети *rosB* у стабільних трансформантів додатково
 30 підтверджують ПЛР-аналізом з використанням пари праймерів RBFa/RBRa та геномної ДНК стабілізованих трансформантів як матриці. Величина отриманого ПЛР-фрагменту відповідала величині очікуваного фрагменту, що становить 753 п.н. (Фіг. 2).

Етап 3 Аналіз продукції різних форм флавінів у сконструйованих рекомбінантних штамів

Для оцінки продукції флавінів, стабільні трансформанти культивують упродовж 44 год. в модифікованому середовищі Беркгольдера при 30 °C (вихідна біомаса 0,15 г/л). Батьківський
 35 штам #13 та його похідний, що містить плазмиду без експресійної касети *rosB* *S. davawensis* використовують як негативні контролі. Загальну продукцію флавінів у середовищі визначають за допомогою спектрофотометричного аналізу. Додатково, вміст флавінів у культуральному середовищі аналізують за допомогою висхідної хроматографії на папері у 5 % Na₂HPO₄. Розділені фракції флавінів аналізують за рухливістю та кількісно оцінюють
 40 спектрофотометричним аналізом (Табл. 2, Фіг. 3).

Спектрофотометричний аналіз продукції флавінів у трансформантів та контрольних штамів дріжджів *S. famata* *

	#13 (контроль)	13/pIMH3 (контроль)	13/prosB-IMH3 (# 1/3)	13/prosB-IMH3 (# 1/4)	13/prosB-IMH3 (# 1/5)
Загальні флавіни (мг/л)	104,20±3,05	89,23±2,78	93,74±1,98	44,83±0,77	38,75±0,87
ФМН	42,50±1,12	20,54±0,45	16,55±0,75	10,44±0,34	9,37±0,11
РФ	21,03±0,54	18,24±0,32	20,78±0,89	8,42±0,21	6,25±0,12
АФ	< 0,01	< 0,03	5,21±0,09	4,56±0,12	4,36±0,09
Біомаса (г/л)	8,00±0,19	7,64±0,08	7,03±0,07	6,91±0,23	6,92±0,19
Передбачуваний вихід АФ (мг/г клітин)	-	-	0,74±0,02	0,58±0,01	0,62±0,02

* Представлені значення загальної кількості флавінів і хроматографічно розділених фракцій флавінів.

У культуральній рідині трансформантів (# 1/3; 1/4; 1/5), що містять плазмиду *prosB-IMH3*, крім рибофлавіну і ФМН, видно флюоресціюючу сполуку (Фіг.2), яка за рухливістю ($R_f=0,1$) (Juri et al., 1987) та максимумом поглинання (480 нм) (Tyagi et al., 2009) відповідає амінорибофлавіну.

Загальна кількість флавінів і ФМН у штамів, що містять плазмиду *prosB-IMH3*, є нижчою, ніж у контрольних штамів. У той же час у культуральній рідині цих штамів нагромаджується від 4,36 до 5,21 мг амінорибофлавіну в 1 л, що становить 5,6-11,25 % від загальної кількості флавінів.

Джерела інформації:

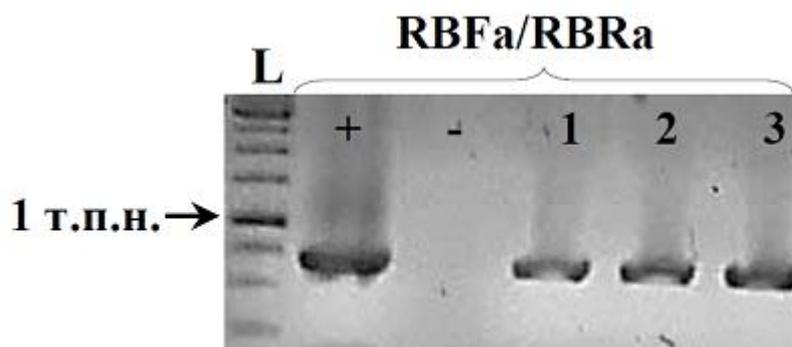
1. Pedrolli D.V. et al. *Methods Mol Biol.* - 2014.- Vol. 1146. - P. 4163.
2. Schwarz J. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016.- Vol. 10. №55. - P. 61036106.
3. Konjik V. et al... *Angewandte Chemie International Edition in English.* 2017 – Vol.56, 4. – P. 1146-1151.
4. Jankowitsch F. et al. *J Bacteriol.* - 2012. – Vol.194. – P.6818–27.
5. Tsyurulnyk A.O. et al., *Yeast.* 2020. Vol.37, 9-10. – P. 467-473.
6. Dmytruk KV. et al, *Metabolic Engineering.* – 2011. – Vol.13,1. - P. 82-8.
7. Juri N. et al. *Journal of Biochemistry.* – 1987. – Vol.- Vol.101. – P. 705-711.
8. Tyagi A. et al. *Chemical Physics.* - 2009 – Vol. 364. P. 19-30.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

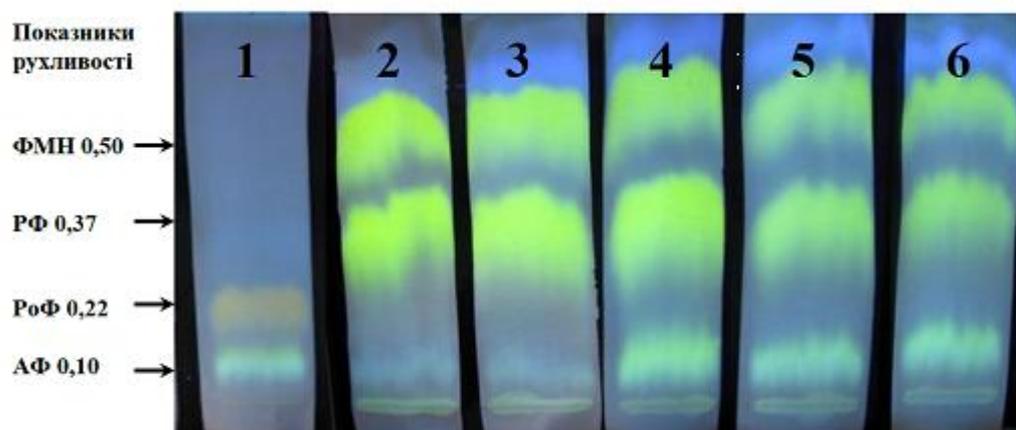
Спосіб отримання флавінового антибіотика амінорибофлавіну, що полягає у введенні в геном дріжджів генетичної інформації про синтез амінорибофлавіну, у якому модифіковані послідовності гена *rosB* бактерії *Streptomyces davaonensis* поміщають під контроль сильного промотору фактора елонгації трансляції - TEF1 дріжджів *Debrayomyces hansenii*, та вводять як селективний маркер ген *IMH3*, що забезпечує резистентність до мікофенольної кислоти, сконструйованим вектором трансформують штам дріжджів *Candida famata*, здатний до надсинтезу ФМН, та отримують рекомбінантні штамми, у культуральній рідині яких накопичується до 5 мг/л амінорибофлавіну.



Фіг.1



Фиг.2



Фиг.3