



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **133594** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12P 25/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

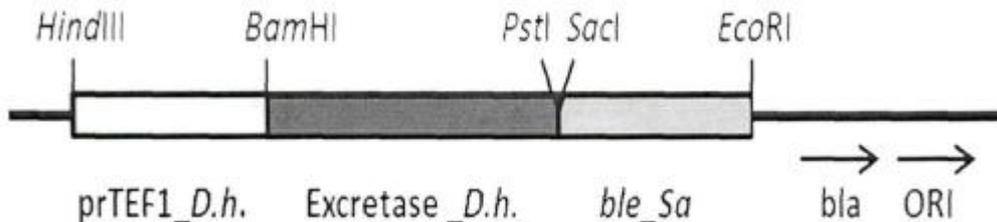
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2018 11789	(72) Винахідник(и): Цирульник Андрій Олександрович (UA), Федорович Дарія Василівна (UA), Колодій Олена Миколаївна (UA), Дмитрук Костянтин Васильович (UA), Сибірний Андрій Андрійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 29.11.2018	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів-5, 79005 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2019	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2019, Бюл.№ 7	

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

(57) Реферат:

Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну) характеризується 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 раза продукцією рибофлавіну, в порівнянні з реципієнтним штамом.



Фиг. 1

UA 133594 U

Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* з підвищеним рівнем синтезу вітаміну B₂ (рибофлавіну)

Корисна модель 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 B₂ 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* ATCC 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, недоліком описаних штамів *C. famata*, як продуцентів РФ, є їх генетична нестабільність, що приводить до утворення під час ферментації штамів, нездатних до надсинтезу вітаміну B₂, 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, R1B1, R1B7, 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, R1B1, R1B7 [6]. Недоліком описаного надсинтетика є нижча, в порівнянні з найкращим нестабільним дріжджовим продуцентом РФ [4], продуктивність біосинтезу РФ.

В основу корисної моделі поставлена задача 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, R1B1 і R1B7, згідно з корисною моделлю додатково вводять плазмиду, яка містить гомолог гену 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 B₂ (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: Етап 1. Конструювання плазміди, то 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 (ExFrw: cgcGGATCCatgatatctataagtaaccacaatg, FixRew: aaaCTGCAGtcacttctcaactttaaccaas, 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 гену 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.

Таблиця 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		
	tr-47	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

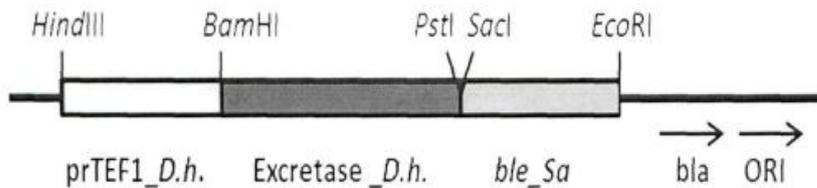
Штами дріжджів *C. famata* з підвищеним рівнем синтезу РФ, отримані за допомогою запропонованого способу, можуть бути використані у виробництві для отримання вітаміну B2.

Джерела інформації:

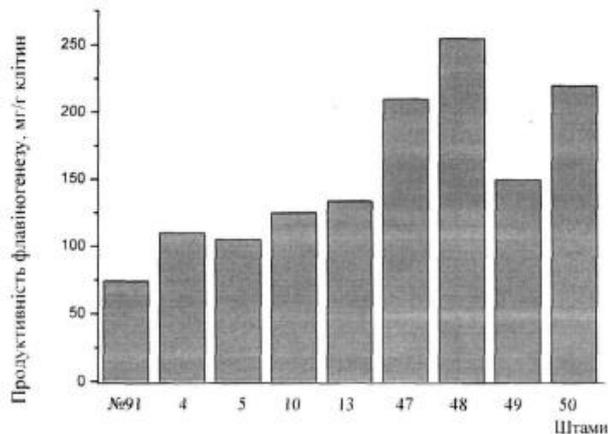
1. Stahmann K.P. et al. *Microbiol. and Biotechnol.* - 2000. - Vol. 53, № 5-P. 509-516.
2. Патент США WO 88/09822. МПК C12N 15/01, C12N 15/04, C12P 25/00, C12R 1/72. опубл 15.12.1988.
3. Патент США № 5164303, МПК C12N 1/165, C12P 25/00. опубл. 17.11. 1992.
4. Патент США № 5231007, МПК C12N 1/16, C12N 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.), IRI. 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 КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

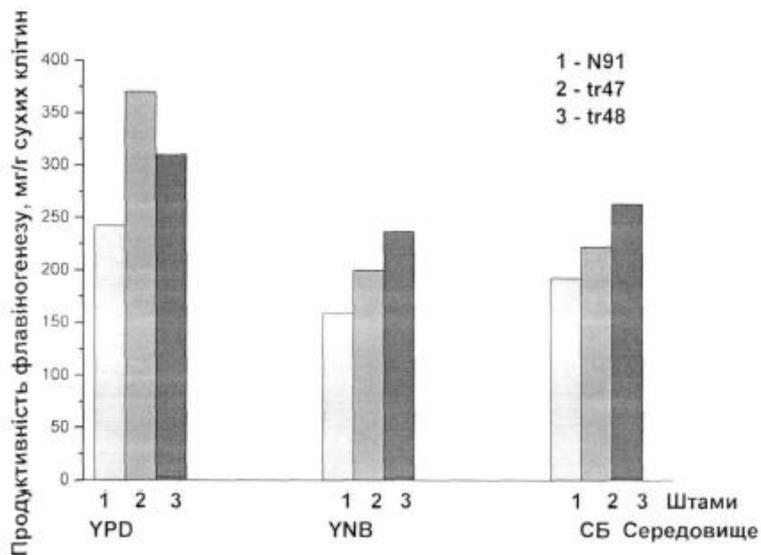
Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* з підвищеним рівнем синтезу вітаміну B₂ (рибофлавіну), який **відрізняється** тим, що в геном штаму *C. famata* - стабільного надсинтетика рибофлавіну, що містить по дві копії генів SEF1, RIB1 і RIB7, додатково вводять плазмиду, яка містить 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 раза продукцією рибофлавіну, в порівнянні з реципієнтним штамом.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601