



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **42499** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 1/19МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) ШТАМ ДРІЖДЖІВ CANDIDA FAMATA IMB Y-5028 - ПРОДУЦЕНТ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ (5'-ФМН)**

1

2

(21) u200900725

(22) 02.02.2009

(24) 10.07.2009

(46) 10.07.2009, Бюл.№ 13, 2009 р.

(72) СИБІРНИЙ АНДРІЙ АНДРІЙОВИЧ, ЯЦИШИН
ВАЛЕНТИНА ЮРІЇВНА, ФЕДОРОВИЧ ДАРІЯ ВА-
СИЛІВНА, ІЩУК ОЛЕНА ПЕТРІВНА, ВОРОНОВ-
СЬКИЙ АНДРІЙ ЯРОСЛАВОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ

(57) Штам дріжджів *Candida famata* - продуцент флавінмононуклеотиду (5'-ФМН), з підвищеною здатністю до синтезу цього нуклеотиду без додавання АТФ або його попередників і рибофлавіну у поживне середовище, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України за № IMB Y-5028, який призначений для мікробіологічного отримання флавінмононуклеотиду.

Корисна модель відноситься галузі мікробіологічного синтезу біологічно активних сполук і є новим штамом дріжджів *Candida famata* - продуцентом флавінмононуклеотиду (рибофлавін-5'-фосфату, 5'-ФМН), що є ефективним засобом профілактики і лікування захворювань, пов'язаних із порушенням біосинтезу цієї сполуки, а також компонентом системи біоломінесцентного аналізу та проміжним продуктом для отримання флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) і його похідних.

Відомо, що 5'-ФМН у промислових масштабах отримують шляхом фосфорилування рибофлавіну (РФ) хімічними агентами (хлороксид фосфору, пірофосфорна кислота і суміш фенолу, хлороформу і фосфорного ангідриду), при цьому утворюються ізомерні форми ФМН (2'-ФМН і 4'-ФМН), РФ динуклеотиди (5',4'-ФДН і 5',3'-ФДН), а також РФ поліфосфати [1]. Очищення 5'-ФМН від цих сполук є складним завданням. Комерційні препарати містять не більше 74% натрієвої солі 5'-ФМН. Крім того, препарати ФМН, отримані таким способом, є дуже дорогими, що знижує можливості їх широкого використання у практиці.

На сьогоднішній день не знайдено жодного природного штаму мікроорганізмів, здатного до синтезу значних кількостей ФМН.

Запропоновано спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *C. famata* із високою активністю РФ-кінази, здатних до надсинтезу ФМН внаслідок заміни нативного промотора клонованого гена FMN1 дріжджів *Debaryomyces hansenii* (кодує РФ-кіназу) на сильний промотор гена TEF1 (фактор елонгації трансляції 1α) *C. famata* [2]. Отримані таким способом штами володіють високою акти-

вністю РФ-кінази, але синтезують незначні кількості ФМН.

Найближчим аналогом штаму, що заявляється, є сконструйовані рекомбінантні штами бактерії *Corynebacterium ammoniagenes* з надекспресованим біфункціональним ферментом РФ-кіназою/ФАД-синтетазою, які можуть продукувати значні кількості ФМН і ФАД [3]. Головним недоліком у використанні згаданих рекомбінантних штамів для отримання ФМН є потреба у високих концентраціях АТФ або його попередників і РФ у поживному середовищі для реакції фосфорилування.

В основу корисної моделі поставлено завдання за допомогою генноінженерних підходів сконструювати рекомбінантні штами дріжджів із високою активністю РФ-кінази, здатні до надсинтезу ФМН.

Поставлене завдання досягається тим, що шляхом надекспресії гена FMN1 (кодує РФ-кіназу) у штамів *C. famata*, здатних до надсинтезу РФ, отримують трансформанти з високою активністю РФ-кінази, здатні до синтезу значних кількостей ФМН.

Штам дріжджів *C. famata* IMB Y-5028 зберігається в депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму *C. famata* IMB Y-5028. Вегетативні клітини штаму, вирощені в рідкому пивному суслі концентрацією 7°Б при 30°C, мають овальну форму, розміром 2,8-5,3×4,5-10,5 мкм, містяться поодинокі, парами, іноді короткими ланцюжками чи невеликими групами. Не утворюють псевдоміцелію. На агаризованому середовищі колонії віком 7 діб округлі, діаметром 2-3 мм, про-

(13) **U**
(11) **42499**
(19) **UA**

філь припіднятий, поверхня гладка, блискуча, жовтуватого кольору.

На скошеному агарі трьохдобовий штрих гладкий, однорідний, блискучий, жовтуватого забарвлення.

Клітини штаму асимілюють сахарозу, мальтозу, глюкозу, галактозу, манніт, маннозу, сорбіт, арабінозу, фруктозу, трегалозу, рафінозу, целобіозу, меліцитозу; слабо ростуть на сукцинаті, глутаматі, гліцерині, етанолі, дульциті, ксилозі, сорбозі, проте не використовують метанол, малат, кетоглутарат, рамнозу, рибозу, крохмаль. Крім того, клітини даного штаму слабо ферментують сахарозу та глюкозу, не ферментують мальтозу, галактозу, ксилозу, лактозу, крохмаль, трегалозу, рафінозу, целобіозу та меліцитозу.

Як джерело азоту клітини використовують сульфат амонію, діамоній фосфат, сечовину, але не нітрат натрію.

Штам *C. famata* належить до облигатних аеробів. Штам росте при температурі 25-32°C, оптимум температури - 30°C, оптимум pH становить 6,5-7,0.

Штам зберігають на агаризованому суслі агарі в холодильнику. Клонується двічі на рік і відсівають 3-4 клони на 4-5 день вирощування, використовуючи маркерну ознаку (резистентність до флеоміцину) і активність штаму щодо синтезу ФМН.

Для конструювання штаму *C. famata* IMB Y-5028 використовують такі методи: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), конструювання рекомбінантних плазмід, виділення плазмід з *Escherichia coli*, рестрикційний аналіз, електрофорез в агарозному гелі, трансформація *E. coli* методом електропорації, описані у [4]. Трансформацію *C. famata* проводять, як описано в [5]. Виділення сумарної ДНК з трансформантів *C. famata* проводять як для *S. cerevisiae* [6]. Вміст флавінів у зразках визначають флюориметричним методом за допомогою флюорометра Turner Quantech FM 109510-33). Концентрацію ФМН вимірюють на цьому ж флюорометрі після хроматографічного розділення флавінів в 5% Na₂HPO₄.

Отримання продуцента ФМН *C. famata* IMB Y-5028 та його характеристика ілюструються графічними матеріалами.

На Фіг.1 зображена лінійна схема плазміди p19L2_ble_RIB1Cf_prTEF1_FMN1Dh (~8т.п.н.), де фрагмент, що містить pUC19, позначено тонкою лінією; фрагмент, що містить ген RIB1 *C. famata*, позначено товстою смугою з горизонтальними лініями; фрагмент, що містить промотор TEF1 *C. famata*, позначено товстою смугою з вертикальними лініями; фрагмент, що містить ген ble *S. aureus*, позначено товстою лінією з косими лініями; фрагмент, що містить ген FMN1 *D. hansenii*, позначено товстою білою лінією, інтрон цього гену позначено крапками; скорочення сайтів рестрикції: H, HindIII; Sp, SphI; P, PstI; K, KpnI; RI, EcoRI; S1, Sall; B, BamHI; Sm, SmaI; Sc, SacI; Xb, XbaI.

На Фіг.2 зображено зміни вмісту ФМН в культуральній рідині штамом №13 *C. famata* за умов інкубації великої кількості клітин (5г/л) протягом 70 годин, де на осі абсцис відкладений час вирощу-

вання, а на осі ординат - нагромадження ФМН в культуральній рідині.

На Фіг.3 зображена лінійна схема плазміди pUCC57_IMH3_prTEF1_FMN1Dh (~6,75т.п.н.), де фрагмент, що містить pUC57, позначено тонкою лінією; фрагмент, що містить ген FMN1 *D. hansenii*, позначено товстою лінією з вертикальними лініями, інтрон цього гену позначено білим прямокутником; фрагмент, що містить промотор TEF1 *C. famata*, позначено сірим прямокутником; фрагмент, що містить ген IMH3 *D. hansenii*, позначено товстою лінією з точками, інтрон цього гену позначено білим прямокутником; скорочення сайтів рестрикції: Sc, SacI; S1, Sall; B, BamHI; P, PstI.

На Фіг.4 зображено питомі активності РФ-кінази виділених штамів, що містять додаткові копії гену FMN1 *D. hansenii*.

На Фіг.5 зображено зміни вмісту ФМН в культуральній рідині при інкубації великої кількості клітин (5г/л) окремих клонів штаму №IMB Y-5028 *C. famata*, що містить додаткову копію гену FMN1 *D. hansenii*, де на осі абсцис відкладений час вирощування, а на осі ординат - нагромадження ФМН в культуральній рідині.

Штам дріжджів *C. famata* IMB Y-5028 - продуцент ФМН отримують у декілька етапів.

Етап 1. Конструювання плазміди та отримання рекомбінантних штамів *C. famata*, що містять ген FMN1 *D. hansenii* під промотором TEF1 *C. famata*

Для одержання штамів з надекспресованим геном FMN1 використовують конструкцію, що містить ген FMN1 з промотором TEF1 [7], переклонують її у вектор, який містить ген ble *Staphylococcus aureus* (забезпечує стійкість до флеоміцину) [8]. Сконструйована плазміда має назву p19L2_ble_RIB1Cf_prTEF1_FMN1Dh. Її лінійна схема представлена на Фіг.1.

Плазмідною p19L2_ble_RIB1Cf_prTEF1_FMN1Dh трансформують штам *C. famata* AF4, продукція РФ у якого не залежить від забезпечення залізом [9]. Трансформанти, резистентні до флеоміцину, відбирають на мінімальному середовищі Беркгольдера, що містить флеоміцин у концентрації 1,8мг/л. Серед низки трансформантів відбирають стабільні інтегранти, резистентні до флеоміцину. Наявність в геномі трансформантів рекомбінантної послідовності, що містить ген FMN1 *D. hansenii* під промотором TEF1 *C. famata* та ген ble, перевіряють за допомогою ПЛР.

Етап 2. Перевірка активності РФ-кінази та продукції ФМН рекомбінантними штамми *C. famata*

Активність РФ-кінази у відібраних штамів та вміст РФ і ФМН в культуральній рідині визначають після 2,5 діб вирощування трансформантів в середовищі Беркгольдера. Результати представлено в таблиці.

Проаналізовані трансформанти виявляють у 19-33 рази вищу активність РФ-кінази в порівнянні зі штамом дикого типу (wt) *C. famata* та в 5-9 разів порівняно з реципієнтним штамом AF4. На відміну від штаму дикого типу, в культуральній рідині трансформантів нагромаджується ФМН. Продукція ФМН у проаналізованих штамів коливається від 2,67 до 24,89мг/л. Однак, крім ФМН, культуральна

рідина містить РФ. Процентний вміст ФМН коливається від 10 до 43%, в той час як у реципієнтного

штаму AF4 - лише 5%.

Таблиця

Активність РФ-кінази та вміст ФМН у культуральній рідині штамів, що містять ген FMN1 D. hansenii під промотором TEF1 C. famata

Штам	РФ-кіназа, mU/мг білка	Флавіни культуральної рідини		
		ФМН, мг/л	РФ, мг/л	ФМН, %
wt	0,12	-	1,55	-
AF4	0,46	2,67	49,20	5,15
2	3,99	5,33	29,30	18,19
6	2,92	17,78	32,80	35,15
7	3,31	8,00	26,77	23,00
11	3,16	5,33	18,18	22,67
13	3,99	24,89	32,32	43,51
16	3,02	8,89	31,31	22,11
19	2,34	2,67	23,74	10,11

Найвищий вміст ФМН виявлено у штаму 13, який нагромаджує при вирощуванні в простому цукрово-мінеральному середовищі понад 24мг/л ФМН. Досліджено зміни вмісту ФМН в культуральній рідині упродовж інкубації великої кількості клітин (5г/л) цього штаму. Максимальна продукція ФМН спостерігалася через 48 годин інкубації (до 200мг/л).

Етап 3. Конструювання плазмиди та отримання рекомбінантних штамів *C. famata*, що містять додаткову копію гена FMN1 D. hansenii під промотором TEF1 C. famata

Для подальшого покращення продуцентів ФМН у геном найкращого з відібраних трансформантів (№13) вводять додаткові копії гена FMN1 D. hansenii під контролем промотора TEF1 C. famata. Для цього конструкцію, що містить промотор TEF1 з геном FMN1 переклонують у вектор, який містить ген резистентності до мікофенолової кислоти IMH3 D. hansenii.

Сконструйована плазмідка отримала назву pUC57_IMH3_prTEF1_FMN1 Dh. Її лінійна схема представлена на Фіг.3.

Плазмідкою pUC57_IMH3_prTEF1_FMN1Dh трансформують штам №13, який містить ген FMN1 D. hansenii під контролем промотора TEF1 C. famata. Трансформанти, резистентні до мікофенолової кислоти, відбирають на мінімальному середовищі Беркгольдера, що містить цю кислоту в концентрації 20мг/л. Серед низки трансформантів відбирають стабільні інтегранти, резистентні до мікофенолової кислоти. Наявність в геномі трансформантів рекомбінантної послідовності плазмиди pUC57_IMH3_prTEF1_FMN1Dh, що містить ген FMN1 D. hansenii під промотором TEF1 C. famata та ген IMH3, перевіряють за допомогою ПЛР.

Етап 4. Перевірка активності РФ-кінази та продукції ФМН рекомбінантними штамми *C. famata*, що містять додаткову копію гена FMN1 D. hansenii під промотором TEF1 C. famata

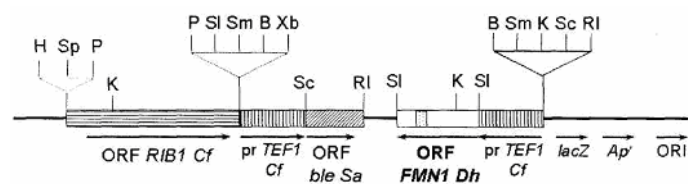
Активність РФ-кінази у відібраних штамів та нагромадження ФМН у культуральній рідині визна-

чають після 2,5 діб вирощування трансформантів в середовищі Беркгольдера. Активність РФ-кінази сконструйованих штамів приведена на Фіг.4. Всі проаналізовані трансформанти виявляють у 2,5-4,5 разів, вищу активність РФ-кінази, ніж реципієнтний штам №13. Із штаму з найвищою активністю РФ-кінази №13-76 отримано окремі клони і досліджено їх здатність до нагромадження ФМН при інкубації великої кількості клітин (5г/л) впродовж 48год. Окремі клони мало відрізнялися за рівнем нагромадження ФМН в культуральній рідині (Фіг.5). Максимальна продукція ФМН (до 350мг/л) спостерігалася на 24год інкубації.

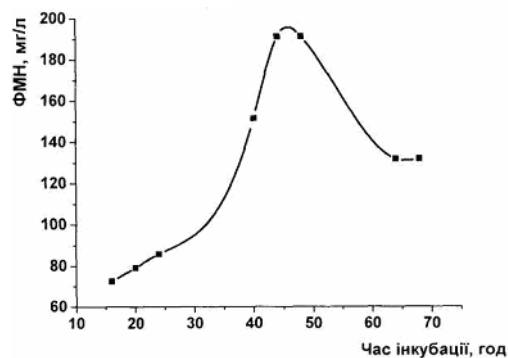
Сконструйований штам *C. famata* IMB Y-5028, завдяки підвищеній здатності до синтезу ФМН без додавання АТФ або його попередників і рибофлавіну у поживне середовище, може бути використаний у виробництві як ефективний продуцент ФМН.

Джерела інформації:

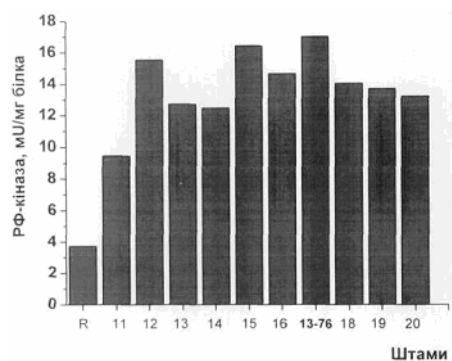
1. Березовский В.М. Химия витаминов. - М.: Пищевая промышленность, 1973. - 632с.
2. Патент України №22568, опубл. 25.04.2007, Бюл. № 5.
3. Hagihara et al. - 1995. - Appl Microbiol Biotechnol. - Vol.42, №5. - P.724-729.
4. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
5. Voronovsky A.A. et al. // FEMS Yeast Research. - 2002. - Vol.2. - P.381-388.
6. Wach A., Pick H., Philipson P. In: Molecular Genetics of Yeast. A Practical Approach (Johnston, J.R., Ed.), IRL Press, Oxford. - 1994. - P.1-16.
7. Іщук О.П. Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази // Укр. біохім. журнал. - 2006. - Т.78, №5. - С.63-69.
8. Dmytruk K.V. et al. // Curr Genet. - 2006. - Vol.50, N3. - P.183-191.
9. Патент України №36164, опубл. 10.10.2008, Бюл. №19.



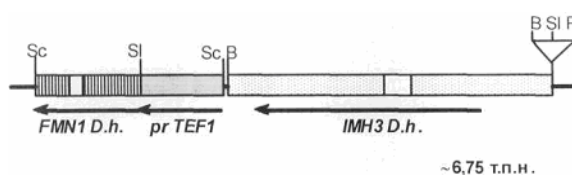
Фиг. 1



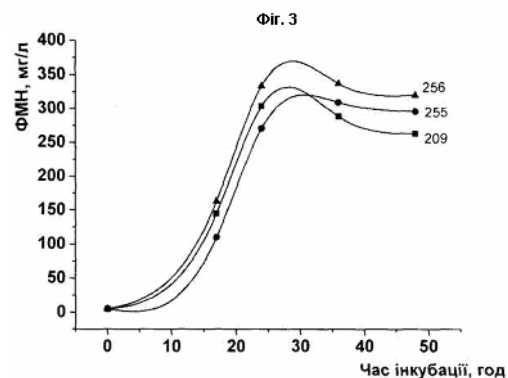
Фиг. 2



Фиг. 4



~6,75 т.п.н.



Фиг. 5