



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **87684** (13) **C2**  
(51) МПК (2009)  
**C12P 25/00**  
**C12N 15/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ (5'-ФМН)

1

(21) a200612203

(22) 20.11.2006

(24) 10.08.2009

(46) 10.08.2009, Бюл. № 15, 2009 р.

(72) ВОРОНОВСЬКИЙ АНДРІЙ ЯРОСЛАВОВИЧ, ДМИТРУК КОСТЯНТИН ВАСИЛЬОВИЧ, ІЩУК ОЛЕНА ПЕТРІВНА, СИБІРНИЙ АНДРІЙ АНДРІЙОВИЧ, ФЕДОРОВИЧ ДАРІЯ ВАСИЛІВНА, ЯЦИШИН ВАЛЕНТИНА ЮРІІВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ

(56) Stahmann K.P. et al. Microbiol. and Biotechnol. - 2000. - Vol. 53, N5 - P. 509-516.

Сибірний А.А. і співавт. Мікробний синтез флавінів, Київ: Наукова думка, 2006, с.41-50.

US 5514574, 07.05.96.

Manstein D.J. and Pai E.F.J. Biol. Chem. - 1986. - Vol. 261, №34. - P. 16169-16173.

Voronovsky A.A. et al. // FEMS Yeast Research. - 2002. - Vol. 2. - P. 381-388.

EP 0147713 B1, 30.08.89.

2

JP 60141295 A, 26.07.85 (abstract).

JP 2138988 A, 28.05.90 (abstract).

(57) Спосіб отримання флавінмононуклеотиду (5'-ФМН), що полягає у введенні в геном мікроорганізмів генетичної інформації про синтез флавінмононуклеотиду, який **відрізняється** тим, що промотор гена FMN1 (кодує рибофлавінкіназу) дріжджів *Debaryomyces hansenii* вирізають, замінюють його на сильний промотор фактора елонгації трансляції - TEF1 дріжджів *Candida famata*, конструюють вектор для надекспресії гена FMN1 для введення в геном *Candida famata* фрагмента ДНК, що несе генетичну інформацію про синтез 5'-ФМН, вибраний з групи: вектор відповідно до Фіг. 2 або вектор відповідно до Фіг. 3, отримують рекомбінантні штами з підвищеною в 5-8 разів, в порівнянні з реципієнтним штамом, активністю рибофлавінкінази, у культуральній рідині яких накопичується 5'-ФМН.

Винахід відноситься до галузі біотехнології і є способом отримання флавінмононуклеотиду (ФМН) за допомогою рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* (С. famata).

5'-ФМН (рибофлавін-5'-фосфат) є сполукою, яка відіграє важливу роль як коензим у різноманітних ферментативних реакціях у живих організмах і є ефективним засобом профілактики і лікування захворювань, пов'язаних з порушенням біосинтезу цієї сполуки. Препарати ФМН, отримані ферментативним способом, можуть знайти застосування як: 1 - лікарські препарати, які не містять домішок з невстановленою біологічною активністю; 2 - реактиви високого ступеня чистоти; 3 - проміжні продукти для отримання флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) та його похідних; 4 - компоненти системи біolumінесцентного аналізу.

Відомо, що 5'-ФМН у промислових масштабах отримують шляхом фосфорилування рибофлавіну (РФ) хімічними агентами [1], що приводить до утворення препарату, який містить побічні продукти: ізомерні форми флавінмононуклеотиду, такі як

2'-ФМН і 4'-ФМН, рибофлавін динуклеотиди (5',4'-ФДН і 5',3'-ФДН), а також поліфосфати, які не мають вітамінної активності. 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.

Відомо досить багато мікроорганізмів, здатних до надсинтезу РФ, зокрема, рекомбінантні штами бактерій *Bacillus subtilis*, цвільовий гриб *Ashbya gossypii* та флавіногенні дріжджі *C. famata* [2, 3]. Однак не описано жодного прикладу прямого мікробного синтезу значних кількостей ФМН.

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб отримання ФМН, в якому використані бактерії родів *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Enterobacter* і *Pseudomonas*, що містять рекомбінований ДНК з фрагментом, який несе генетичну інформацію про синтез ФМН [4]. Однак у цих мікроорганізмів перетворення РФ до ФМН і наступну реакцію, фосфорилування ФМН до ФАД, здійснює

(13) **C2**(11) **87684**(19) **UA**

той самий білок [5], тому в культурах нагромаджуються обидва нуклеотиди - ФМН і ФАД.

В основу винаходу поставлено завдання за допомогою генноінженерних підходів сконструювати рекомбінантні штами дріжджів з високою активністю рибофлавінкінази (РФ-кіназа), здатні до надсинтезу ФМН.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі отримання флавіномононуклеотиду (5'-ФМН), який полягає у введенні в геном мікроорганізмів генетичної інформації про синтез ФМН, згідно з винаходом промотору гену FMN1 (кодує РФ-кіназу) дріжджів *Debaryomyces hansenii* (D. hansenii) вирізають, замінюють на сильний промотор фактора елонгації трансляції - TEF1 дріжджів *C. famata*, конструюють вектори для надекспресії гену FMN1, за допомогою яких в геном *C. famata* вводять фрагмент ДНК, що несе генетичну інформацію про синтез 5'-ФМН, отримують рекомбінантні штами з високою активністю РФ-кінази, в культуральній рідині яких нагромаджується 5'-ФМН.

Суть винаходу полягає у введенні в геном дріжджів фрагменту ДНК, який несе генетичну інформацію про синтез ФМН під контролем сильного конститутивного промотора, що забезпечує високий рівень експресії гену FMN1 і нагромадження цільового продукту - ФМН, а не суміші флавінових нуклеотидів, ФМН і ФАД, як це має місце при використанні бактерійної моделі [5]. Біосинтез ФМН і ФАД у дріжджів *C. famata* здійснюється за допомогою послідовної каталітичної дії 2 різних ферментів - РФ-кінази (КФ 2.7.1.26) та ФАД-синтетази (КФ 2.7.27.2), які забезпечують утворення ФМН і ФАД у незначній кількості, необхідній для життєдіяльності клітини. [3].

У запропонованому способі 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 в [6]. Трансформацію *C. famata* проводять, як описано в [7]. Виділення сумарної ДНК з трансформантів *C. famata* проводиться як для *S. cerevisiae* [8].

Спосіб отримання ФМН ілюструється графічними матеріалами.

На Фіг. 1 зображено нуклеотидну послідовність відкритої рамки зчитування та термінатора гена РФ-кінази FMN1 дріжджів *D. hansenii*, де інтрон вказаний нежирним шрифтом, старт- та стоп-кодони підкреслені, термінатор позначено курсивом нежирним шрифтом.

Послідовність взято з банку даних "Genolevures: *Debaryomyces hansenii*", <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/DEHA>).

На Фіг. 2 зображено лінійну схему плазмід *p19L2+prTEF1+FMN1Dh*, де фрагмент, що містить ген LEU2 *S. cerevisiae*, позначено сірою смугою; фрагмент, що містить промотор TEF1 *C. famata*, позначено вертикальними штрихами; фрагмент, що містить відкриту рамку зчитування FMN1 *D. hansenii*, позначено білою смугою; інтрон FMN1 *D. hansenii*, позначено крапками; тонкою чорною лінією позначено бактерійну частину вектора. Сайти рестрикції позначено: H - HindIII, Sp - SphI, P - PstI; K - KpnI; RI - EcoRI; S1 - Sall; Xb - XbaI; B - BamHI; Sm - SmaI; Sc - SacI.

На Фіг. 3 зображено лінійну схему плазмід *p19L2+b1e+RIBCf+prTEF1+FMN1Dh*, де фрагмент, що містить ген RIB1 *C. famata*, позначено горизонтальними смугами; фрагмент, що містить ген *ble* *S. aureus* позначено діагональним штрихом; фрагмент гена LEU2 *S. cerevisiae*, позначено сірою смугою; фрагмент, що містить промотор TEF1 *C. famata*, позначено вертикальними штрихами; фрагмент, що містить відкриту рамку зчитування FMN1 *D. hansenii*, позначено білою смугою; інтрон FMN1 *D. hansenii*, позначено крапками; тонкою чорною лінією позначено бактерійну частину вектора. Сайти рестрикції позначено: H - HindIII; Sp - SphI, P - PstI; K - KpnI; S - Sall; Sm - SmaI; Xb - XbaI; Sc - SacI; RI - EcoRI; B - BamHI.

Спосіб здійснюють кількома етапами.

Етап 1. Конструювання плазмід, що містить ген FMN1 *Debaryomyces hansenii* під промотором TEF1.

Відкриту рамку зчитування (BP3), що містить інтрон, а також термінатор гену FMN1 *D. hansenii* (Фіг. 1) ампліфікують за допомогою ПЛР з використанням геномної ДНК *D. hansenii* як матриці та праймерів A51 і A52 (Табл. 1). Фрагмент очікуваної величини (824 пари нуклеотидів, (п.н.)) обробляють рестриктазою Sall (сайти цього фермента фланкують одержаний продукт ПЛР). Фрагмент, що містить промотор TEF1 *C. famata*, ампліфікують за допомогою ПЛР з використанням праймерів P7-2B і P7-3S (Табл. 1) та геномної ДНК *C. famata* як матриці. Продукт очікуваної величини (658 п.н.) обробляють рестриктазами BamHI та Sall, сайти яких фланкують цей продукт. BamHI/Sall-фрагмент з промотором TEF1 *C. famata* та Sall-фрагмент з BP3 і термінатором FMN1 *D. hansenii* клонують на вектор *p19L2* [7]. Сконструйовану плазмиду позначено *p19L2+prTEF1+FMN1Dh* (Фіг. 2).

Таблиця 1

Перелік праймерів, які використовують у 1, 2 та 3 етапах способу

Назва праймера	Послідовність нуклеотидів
P7-2B	5'-TGC GGA TCC TAA CGA ACA GCT CAT CAG-3'
P7-3S	5'-TGC GTC GAC TTT GCT TAA TGT ATA ATA G-3'
A51	5'-CCC GTC GAC ATG ACG AGA CCT GAA ACT CAC GTT CC-3'
A52	5'-CGG GTC GAC CCT TAA GTA AAA GTA CCC CAA AAT AG AAC G-3'
Ko36	5'-TTT GAG CTC ATG TTA CAG TCT ATC CCG GC-3'

Етап 2. Конструювання рекомбінантних штамів *S. famata*

Плазмідною p19L2+prTEF1+FMN1Dh, попередньо лінеаризованою рестриктазою HindIII, трансформують реципієнтний штам *S. famata* L20105 (leu2). Трансформацію проводять методом електропорації, селекцію Leu<sup>+</sup>-трансформантів проводять на мінімальному середовищі Беркгольдера без лейцину [7]. Серед низки трансформантів відбирають стабільні Leu<sup>+</sup>-інтегранти. Наявність в геномі трансформантів гену FMN1 *D. hansenii* під промотором TEF1 *S. famata* перевіряють за допо-

могою ПЛР з використанням відповідної пари праймерів (P7-2B та A52) (Табл.1). Інтегранти, що містять цю рекомбінантну конструкцію, відбирають для перевірки активності РФ-кінази та продукції ФМН. Трансформанти вирощують протягом 2 діб в колбах Ерленмейєра у середовищі з низьким вмістом заліза (0,01мг Fe/л). Частина відібраних рекомбінантних штамів №3, 9, 18, 33 мають у 3-6 разів вищу активність РФ-кінази у порівнянні з вихідним штамом *S. famata* L20105 і рекомбінантним штамом K9, отриманим трансформацією тією ж плазмідною, але без гену FMN1 (Табл. 2).

Таблиця 2

Активність РФ-кінази та вміст флавінів в культуральній рідині рекомбінантних штамів *S. famata*, що містять ген FMN1 *D. hansenii* під контролем промотора TEF1

Штам	Активність РФ-кінази, мкмоль × 10 <sup>-5</sup> / хв × мг білка	Флавіни культуральної рідини, мг/л		
		ФМН	Сумарна кількість флавінів	% ФМН
L20105 (контроль)	20,4	0,2	3,39	6
K9(контроль)	27,8	0,45	5,29	9
3	70,0	0,80	3,22	25
9	121,7	1,35	4,65	29
18	111,7	1,30	4,60	28
33	86,1	1,30	3,83	34

В культуральному середовищі отриманих рекомбінантних штамів 25-34% від загального вмісту флавінів припадає на ФМН, в той час як у вихідного штамів L20105 та штамів K9 вміст ФМН не перевищує 10%.

Етап 3. Конструювання плазміди для введення в геном додаткової копії гену FMN1 та селекція відповідних трансформантів

Для подальшого покращення продуцентів ФМН у геномі відібраних трансформантів вводять додаткові копії гену FMN1 *D. hansenii* під контролем промотора TEF1 *S. famata*. Для цього конструкцію, що містить промотор TEF1 з геном FMN1, переклонують у вектор, який містить ген ble *Staphylococcus aureus* (забезпечує стійкість до флеоміцину). Сконструйована плазміда отримала назву p19L2+ble+RIBCf+prTEF1+FMN1Dh. Її лінійна схема представлена на Фіг. 3.

Плазмідною p19L2+ble+RIBCf+prTEF1+FMN1Dh трансформують реципієнтний штам *S. famata* №18, який має підвищену активність РФ-кінази і нагромаджує в культуральній рідині 28% ФМН від загального вмісту флавінів (Табл. 3). 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 частини плазміди p19L2+ble+RIBCf+prTEF1+FMN1Dh, що містить ген FMN1 *D. hansenii* під промотором TEF1 *S. famata* та ген ble, перевіряють за допомогою ПЛР з використанням відповідної пари праймерів (P7-2B та Ko36) (Табл. 1). Інтегранти, що містять цю рекомбінантну конструкцію відбирають для подальшого аналізу.

Наявність декількох копій гену FMN1 підтверджують за допомогою Саузерн-блот аналізу [6]. Для перевірки активності РФ-кінази і продукції ФМН отримані трансформанти вирощують протягом 2 діб у середовищі з низьким вмістом заліза (0,01мг Fe/л). Відібрані рекомбінантні штами характеризуються в 3-4,5 рази вищою активністю РФ-кінази в порівнянні з реципієнтним штамом *S. famata* №18 і в 13-17 разів - порівняно із рекомбінантним штамом K9, отриманим трансформацією плазмідною без гену FMN1 (Табл. 2, 3). В культуральній рідині отриманих рекомбінантних штамів вміст ФМН у 4-5 разів вищий, ніж у реципієнтного штаму *S. famata* №18.

Таблиця 3

Активність РФ-кінази та вміст флавінів в культуральній рідині рекомбінантних штамів *S. famata*, що містять додаткові копії гену FMN1 *D. hansenii* під контролем промотора TEF1

Штам	Копійність	Активність РФ-кінази, мкмоль $\times 10^{-5}$ / хв $\times$ мг білка	Флавіни культуральної рідини, мг/л		
			ФМН	Сумарна кількість флавінів	% ФМН
18	2-3	107,3	1,30	4,60	28
18/13	не визначали	448,6	4,95	15,95	31
18/17	3-4	351,1	6,33	28,33	23
18/19	6-8	468,1	5,50	13,75	40
18/21	6-8	482,7	5,50	10,73	52

Етап 4. Отримання штамів, здатних до над-продукції ФМН, шляхом трансформації плазмідом р19L2+ble+RIBCf+prTEF1+FMN1Dh штаму *S. famata* ATCC 20849-надсинтетика рибофлавіну.

Зростання вмісту ФМН в культуральній рідині спостерігається тільки при вирощуванні рекомбінантних штамів в середовищі з низьким вмістом заліза, коли синтезується значна кількість РФ і є значно нижчим при достатньому забезпеченні залізом. Необхідність створення дефіциту заліза

становить значну перешкоду для отримання препарату ФМН у великих кількостях. Тому плазмідом р19L2+ble+RIBCf+prTEF1+FMN1Dh трансформують штам *S. famata* ATCC 20849, продукція РФ у якого не залежить від забезпечення залізом. Активність РФ-кінази і вміст ФМН визначають після 2,5 діб вирощування трансформантів в мінімальному середовищі Беркгольдера без додавання заліза. Результати представлено в табл. 4.

Таблиця 4

Активність РФ-кінази та вміст флавінів в культуральній рідині рекомбінантних штамів *S. famata* ATCC 20849, що містять FMN1 *D. hansenii* під контролем TEF1 промотора

Штам	Активність РФ-кінази, мкмоль $\times 10^{-5}$ / хв $\times$ мг білка	Флавіни культуральної рідини, мг/л		
		ФМН	Сумарна кількість флавінів	%ФМН
ATCC 20849	43,9	2,67	28,47	10
2	241,4	5,33	13,33	44
6	238,9	17,8	30,24	59
7	234,0	8,0	16,9	48
11	287,7	5,3	8,9	60
13	390,0	24,9	36,50	69
16	299,9	8,9	22,2	40

Отримані рекомбінантні штами мають в 5-9 разів вищу активність РФ-кінази у порівнянні з реципієнтним штамом *S. famata* ATCC 20849 та приблизно у 20 разів вищу, ніж у штаму L20105. В культуральній рідині отриманих рекомбінантних штамів вміст ФМН вищий, ніж у реципієнтного штаму *S. famata* ATCC 20849. Відсотковий вміст ФМН від загального вмісту флавінів становить 40-70%, в той час як у реципієнтного штаму *S. famata* ATCC 20849 - лише 10%.

Джерела інформації:

1. Березовский В.М. Химия витаминов. - М.: Пищевая промышленность, 1973. - 632 с.
2. Stahmann K.P. et al. Microbiol. and Biotechnol. - 2000. - Vol. 53, N5 - P. 509-516.

3. Сибірний А.А. і співавт. Мікробний синтез флавінів, Київ: Наукова думка, 2006. - 192 с.

4. Патент США №5.514574, опубл. 7 травня 1996.

5. Manstein D.J. and Pai E.F.J. Biol. Chem. - 1986. - Vol. 261, №34. - P. 16169-16173.

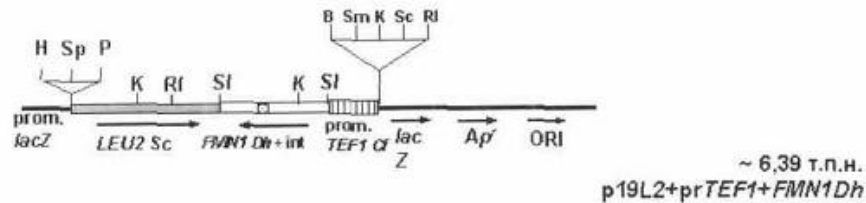
6. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

7. Voronovsky A.A. et al. // FEMS Yeast Research. - 2002. - Vol. 2. - P. 381-388.

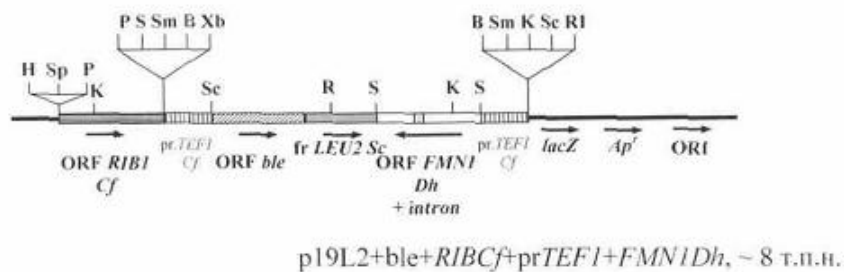
8. Wach A., Pick H., Philipsen P. In: Molecular Genetics of Yeast. A Practical Approach (Johnston, J.R., Ed.), IRL Press, Oxford. - 1994. - P. 1-16.

ATGACGAGACCTGAAACTCACGTTCCCGACACCCTACCTGCTCCATTTCCAATACATGGTA  
 CTCCAACATCATCAGTGGTTTTTGAAGAGGATCATCAGAATTGGGTATTCCAACAGCAAATAT  
 CCCCATTAGCATAGCATTACATAGCTTACCAACAGGTATCTACTATGGATGGTGTAAAGTGATA  
 CCAAATGACAAAGCGGACATATCAGAACACACCCGAGACGATGGTCAACCAATCATGTTCAATA  
 ATGGTACCAATTTGGAGAAAGAAGAATTAGGCATTTTTCCTATGGTTATGTCTATTGGATGGAA  
 TCCATTTTATCACAATAAAGAGAAAGCTGCTGAGGTACATATAATTCACAAGTTTGGTGATAAT  
 TTTTATGGGGCATTAATAAAATATAATGTGTTGGGGTATATCAGACCAGAATTAAATTATACGA  
 CAAAGGGTACGTAAAACCATATTTTTTACTAGTTGATAGATTAAATCCAGCTGTCCTGAACT  
 TGCTGAATATCAATTCCTATCTATTCTGACACTATAATACTAATCTATTCAGAAAGCATTAATAG  
 ACGACATGAACTTGGATATTAATAATTGCGCTTGAAGCCCTTTCAAAGAGTCATATATAAAGGC  
 GCAAGATACATTATAGACTCCCTAGGACGCCGTGGCCAGATGGAATCGCAATGAAGCATGTTCT  
 TACTTTATTAGTTTCTATTCTGGATAATTCATCTGCTGCCTTAATTCAGATGTATACTTAAAA  
 CCATATTCGGTTAGAAAATATAGACATCTTCCCGTTCTATTTTGGGGTACTTTTACTTAAGG

Фир. 1



Фир. 2



Фир. 3