



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 90741

(13) C2

(51) МПК (2009)

C12N 1/19

C12P 25/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ШТАМ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA* IMB Y-5033 - СТАБІЛЬНИЙ ПРОДУЦЕНТ РИБОФЛАВІНУ (ВІТАМІНУ B₂)

1

(21) a200803778

(22) 25.03.2008

(24) 25.05.2010

(46) 25.05.2010, Бюл. № 10, 2010 р.

(72) ВОРОНОВСЬКИЙ АНДРІЙ ЯРОСЛАВОВИЧ,
ДМИТРУК КОСТЯНТИН ВАСИЛЬОВИЧ, СИБІР-

2

НИЙ АНДРІЙ АНДРІЙОВИЧ, ФЕДОРОВИЧ ДАРІЯ
ВАСИЛІВНА, ЯЦИШИН ВАЛЕНТИНА ЮРІІВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ

(56) US A 5120655, 09.12.1992.

UA A 200612203, 20.11.2006.

(57) Штам дріжджів *Candida famata* IMB Y-5033 -
продуцент рибофлавіну.

Винахід відноситься до галузі біотехнології і є новим штамом дріжджів *Candida famata* - продуцентом рибофлавіну (вітаміну B₂). Новий штам може бути використаний у мікробіологічній промисловості для отримання рибофлавіну (РФ), який застосовують як кормову і харчову добавку, оскільки в організмі людини і тварин він не утворюється, як лікарський та профілактичний препарат, а також як барвник у харчовій промисловості.

Відомо, що РФ може бути отриманий шляхом хімічного синтезу [1] або мікробіологічним шляхом з використанням рекомбінантних штамів бактерій *Bacillus subtilis*, цвільових грибів *Ashbya gossypii* та *Eremothecium ashbyi*, а також дріжджів роду *Candida* [2]. Хімічне виробництво РФ є багатоетапним і дорогим. Мутантні штами *A. gossypii*, *E. ashbyi* можуть синтезувати до 15г РФ на літр. Однак цвільові гриби ростуть на складних та багатих середовищах, які легко заражаються сторонньою мікрофлорою, а культурі бактерій загрожує фаголізис. Дріжджі здатні швидко рости на простих живильних середовищах, напівпродуктах та відходах харчової промисловості при температурі 30-35°C. Відомо, що дріжджі родів *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia* можуть продукувати від 10.5мг/л до 51мг/л РФ при культивуванні протягом 12 днів [3]. Описано штами *Candida famata*, які утворюють 3,8г РФ/л за 7 діб культивування [4], 5г РФ/л після 6 діб культивування [5], а також штам цього виду зі зниженою чутливістю до заліза та інгібіторів синтезу пуринів і РФ, який здатний утворювати при вирощуванні у ферментері на спеціально підібраному середовищі до 10г РФ за 6 діб вирощування [6].

Основним недоліком штамів *C. famata* як продуцентів РФ є їх генетична нестабільність, що виявляється у реверсії до штамів, нездатних до надсинтезу вітаміну B₂. При ферментації більш життєздатні ревертанти витісняють флавіногенні клітини, тому доводиться зупиняти процес та міняти культуру дріжджів у ферментерах. Це вимагає додаткових витрат, що ставить під сумнів рентабельність процесу біотехнологічного отримання РФ.

Найближчим аналогом штаму, що заявляється, є штам дріжджів *Candida famata* ATCC 20849, який синтезує 2,5г РФ/л, а у 450-літровому ферментері за спеціально підібраних умов продукція РФ після 200 годин ферментації становить 21г/л [7]. Недоліком цього штаму є висока частота реверсії за ознакою „надсинтез рибофлавіну” 54×10⁻⁶ клітин, що знижує рентабельність виробництва.

В основу винаходу поставлено завдання шляхом ідентифікації ключового гену, який спричинює втрату здатності *C. famata* ATCC 20849 до надсинтезу вітаміну B₂, сконструювати штам з підвищеною стабільністю та продуктивністю біосинтезу РФ.

Поставлене завдання досягається тим, що за допомогою інсерційного мутагенезу та селективних середовищ ідентифіковано ген, залучений у регуляцію біосинтезу РФ, а введення додаткової копії цього гена в геном штаму *C. famata* ATCC 20849 підвищує стабільність за ознакою „надсинтез РФ” з одночасним зростанням продуктивності біосинтезу вітаміну B₂.

(13) C2

(11) 90741

(19) UA

Штам дріжджів *S. famata* IMB Y-5033 зберігається в депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму IMB Y-5033. Вегетативні клітини штаму, вирощені в рідкому пивному суслі концентрацією 7°Б при 30°C, мають овальну форму, розміром 1,3-7,6×3,1-8,4 мкм, містяться поодинокі, парами, іноді короткими ланцюжками чи невеликими гронами. Іноді утворюють псевдо-міцелії. На агаризованому середовищі колонії віком 7 діб округлі, діаметром 2-4 мм, профіль припіднятий, краї нерівні складчасті, поверхня гладка блискуча, жовтуватого кольору.

На скошеному агарі 3-х добовий штрих гладкий однорідний блискучий, жовтуватого забарвлення.

Клітини штаму *S. famata* IMB Y-5033 асимілюють сахарозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу, арабінозу, целобіозу, рафінозу, меліцитозу, трегалозу, сорбозу, крохмаль, глютамінову кислоту, сорбітол, маннозу, манніт, гліцерин, дульцит, інозит; слабо ростуть на ксилосі, рамнозі, ксиліті, лактозі, лактаті, галактозі, етанолі; проте не використовують яблучну і янтарну кислоту.

Клітини запропонованого штаму не ферментують сахарозу, глюкозу, галактозу, ксилозу, лактозу, крохмаль, трегалозу, рафінозу, целобіозу та меліцитозу.

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

Штам *S. famata* IMB Y-5033 належить до облигатних аеробів. Штам росте при температурі 25-32°C, оптимум температури становить 30°C; оптимум pH становить 6,0-9,0.

За умов культивування у колбах на круговій качалці (200 об/хв) у середовищі, що містить 2% глюкози, 1% пептону та 0,5% дріжджового екстракту протягом 4 діб запропонований штам нагромаджує близько 400 мг РФ/л.

Штам *S. famata* IMB Y-5033 зберігається на агаризованому суслі-агарі в холодильнику. Клонується двічі на рік, відсівають 30-40 клонів. На 4-5 день вирощування відбирають клони за маркерною ознакою „здатність до надсинтезу рибофлавіну”

Для конструювання штаму 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 [8]. Трансформацію *S. famata* проводять, як описано в [9]. Виділення сумарної ДНК з трансформантів *S. famata* проводять як для *S. cerevisiae* [10]. Вміст РФ визначають флуориметрично на приладі ЕФ-3М.

Ідентифікація гену, що забезпечує стабільність за ознакою „надсинтез рибофлавіну”, та отримання стабільного надсинтетика цього вітаміну ілюструється графічними матеріалами.

На Фіг.1 зображена лінійна схема плазмід рТb (4.0 т.п.н.), де відкриту рамку трансляції гену ble *Staphylococcus aureus* позначено товстою сі-

рою лінією; промотор власного гену TEF1 - товстим білим відрізком; бактерійна послідовність рUC57 - тонкою лінією; хвилястою лінією позначено хромосомну ДНК інсерційного штаму, товстою посмугованою лінією позначено ген SEF1; скорочення сайтів рестрикції: H, HindIII; Sp, SphI; P, PstI; SI, Sall; Xb, XbaI; B, BamHI; Sm, SmaI; K, KpnI; Sc, SacI; R, EcoRI.

На Фіг.2 зображено лінійну схему плазмід рTDhSEFI/DhlMH3 (13.1 т.п.н.), де відкриту рамку трансляції гену ble *S. aureus* позначено товстою сірою лінією; промотор гену TEF1 - товстим білим відрізком; товстою шахованою лінією позначено послідовність гену IMH3 *D. hansenii*; товстою посмугованою лінією - ген позитивної регуляції біосинтезу РФ SEFI *D. hansenii*; послідовність рUC57 - тонкою лінією; скорочення сайтів рестрикції: H, HindIII; Sp, SphI; P, PstI; SI, Sall; Xb, XbaI; B, BamHI; Sm, SmaI; K, KpnI; Sc, SacI; R, EcoRI.

На Фіг.3 зображено зміни протягом 3 днів вирощування продуктивності флавіногенезу вихідного штаму *S. famata* ATCC 20849 та сконструйованого штаму IMB Y-5033, де на осі абсцис відкладений час вирощування, а на осі ординат - продуктивність флавіногенезу (кількість утвореного РФ в перерахунку на мг біомаси).

Штам дріжджів *S. famata* IMB Y-5033 - стабільний мутант-надсинтетик РФ отримують у декілька етапів.

Етап 1. Ідентифікація регуляторних генів, що спричинюють нестабільність штаму *S. famata* ATCC 20849.

Як інсерційну касету використовують інтегративну плазмиду з геном ble *Staphylococcus aureus*, що забезпечує резистентність до флеоміцину (Фіг.1) [11]. Перед трансформацією інсерційну касету лінеаризують рестриктазою EcoRI. Трансформацію проводять методом електропорації. Для позитивної селекції трансформанти штаму *S. famata* ATCC 20849 висівають на середовище з флеоміцином (5 мг/л) та етанолом (1%) як джерелом вуглецю. Втрата здатності до надсинтезу РФ у ревертантів штаму ATCC 20849 завжди корелює з появою здатності рости в середовищі з етанолом, в той час як вихідний штам ATCC 20849 надсинтезує РФ та не росте на етанолі як єдиному джерелі вуглецю. Після серії трансформацій відбирають штам, що росте у середовищі з етанолом та виявляє резистентність до флеоміцину. Кількість копій касети в геномі відібраного штаму визначають за допомогою гібридизації за Саузерном.

Для виділення касети з фланкуючими ділянками хромосомну ДНК інсерційного штаму обробляють рестриктазою HindIII, здійснюють самолігування та трансформують в *E. coli*. З бактерійних трансформантів, що з'являються на середовищі з антибіотиком ампіциліном, виділяють плазмідну ДНК. Плазмідна складається з вихідного вектора рUC57 та фрагменту геномної ДНК, що фланкує інсерційну касету. Послідовність нуклеотидів фланкуючої ділянки секвенують, використовуючи стандартні праймери (M13/pUC sequencing primer та M13/pUC reverse sequencing primer). Встановлено, що в ізолюваного штаму касета розірвала ген SEFI, що кодує потенційний транскрипційний фак-

тор (Фіг.1). Аналіз послідовності амінокислот виявив консервативний мотив, що відповідає за формування ДНК зв'язуючого домену Zn(2)-Cys(6), так званий цинковий палець. Він ідентифікований у багатьох дріжджових транскрипційних факторів.

З метою отримання доказів інсерції касети саме в локус SEF1 проводять комплементацию мутації відповідним геном дикого типу. Для цього на основі плазмиди pTDhSEF1 [11] сконструйовано плазмиду pTDhSEF1/DhIMH3 розміром 10.1т.п.н., яка містить новий домінуючий селекційний маркер для *C. famata* - ген IMH3 *Debaryomyces hansenii*,

що кодує інозинмонофосфат дегідрогеназу і визначає стійкість до мікофенольної кислоти (Фіг.2). Сконструйовану плазмиду, що містить новий селекційний маркер (ген IMH3) та ген SEF1D. *hansenii*, використовують для комплементации мутації інсерційного штаму ATCC 20849. У трансформантів інсерційного штаму ATCC 20849 плазмидою pTDhSEF1/DhIMH3 втрачається здатність рости в середовищі з етанолом (Табл.1), натомість відновлюється здатність до надсинтезу РФ, що свідчить про те, що ген SEF1 комплементує мутантний фенотип відібраного інсерційного штаму.

Таблиця 1

Ріст на етанолі та здатність до утворення РФ різними штамами *C. famata*

Штам	Ріст на етанолі	Утворення РФ
ATCC 20849	±	+
Δsef1	+	-
Ревертанти ATCC 20849		
I	+	-
II	+	-
III	+	-
IV	+	-
Трансформанти Δsef1/SEF1	-	+
Ревертанти ATCC 20849/ SEF1 трансформанти		
I	-	+
II	-	+
III	-	+
IV	-	+

Додатково отримано трансформанти з геном SEF1 D. *hansenii* чотирьох незалежних спонтанних ревертантів ATCC 20849 (I, II, III, IV), які з'являються з високою частотою на середовищі з етанолом. У відповідних трансформантів спостерігається аналогічний фенотип: відновлення здатності до надсинтезу РФ, а також втрата здатності рости в середовищі з етанолом (Табл.1). Таким чином, можна стверджувати, що ген SEF1 залучений у регуляцію біосинтезу РФ. Пошкодження цього гену у штаму ATCC 20849 призводить до втрати здатності надсинтезувати вітамін B₂.

Етап 2. Одержання рекомбінантних штамів *C. famata* з додатковою копією гену SEF1.

Стабілізацію штаму продуцента РФ *C. famata* ATCC 20849 здійснюють шляхом введення в його геном додаткової копії гену SEF1 D. *hansenii*. З цією метою його трансформують плазмидою pTDhSEF1 (Фіг.2). Стабільність штамів оцінюють за нездатністю до росту на середовищі з етанолом. Рекомбінантні штами, отримані шляхом трансформації спонтанних ревертантів (I, II, III, IV) *C. famata* ATCC 20849, та отриманого інсерційного штаму з розірваним геном SEF1 плазмидою pTDhSEF1/DhIMH3, не здатні до росту на середовищі,

що містить етанол як єдине джерело вуглецю (Табл.1).

Штам дріжджів *C. famata* IMB Y-5033 пройшов лабораторне випробування.

Етап 3. Перевірка стабільності сконструйованого штаму та його здатності до надсинтезу РФ.

Для перевірки стабільності штами висівають на чашки з середовищем YPD, через 1 добу засівають у 50мл цього ж середовища в колби об'ємом 100мл. Після вирощування протягом 1,5 доби клітини осаджують центрифугуванням, двічі промивають стерильною дистильованою водою і висівають на синтетичне середовище Берггольдера, 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 чітко корелює зі здатністю до надсинтезу РФ. Як видно з таблиці 2, сконструйований штам *C. famata* IMB Y-5033 з додатковою копією гену SEF1, характеризується підвищенням стабільності приблизно в 3-4 рази порівняно з штамом ATCC 20849.

Таблиця 2

Частота появи клонів, здатних до росту на етанолі у штамів *C. famata* ATCC 20849 і IMB Y-5033

Штам	Частота реверсії
<i>C. famata</i> ATCC 20849	54×10^{-6}
<i>C. famata</i> IMB Y-5033	$13,8 \times 10^{-6}$

Для перевірки здатності до синтезу РФ штам *C. famata* IMB Y-5033 вирощують на чашці Петрі на агаризованому середовищі Беркгольдера із 0,5% дріжджовим екстрактом при 30°C протягом 1 доби. Отриману культуру висівають в колби (300мл) із рідким середовищем Беркгольдера, що

містить 0,5% дріжджовий екстракт (50мл в колбі), витримують протягом 1-6 діб на круговій качалці (швидкість обертання 200об./хв) при 28°C, після чого визначають вміст РФ в культуральній рідині. Результати досліджень наведені в табл. 3.

Таблиця 3

Динаміка продукування РФ
штамом *C. famata* IMB Y-5033

Час росту, діб	Вміст РФ, мг/л
1	25,7±2,0
2	401,4±32,2
3	416,7±35,0
4	455,7±45,6
5	523,5±40,1
6	524,2±23,3

Продукція РФ сильно зростає після 1 доби культивування і досягає максимуму на 5 добу.

Продуктивність флавіногенезу (кількість утвореного РФ в перерахунку на одиницю біомаси) сконструйованого штаму *C. famata* IMB Y-5033 зростає у 3-4 рази порівняно вихідним штамом *Candida famata* ATCC 20849 (Фіг.3).

Флавіногенна активність штаму *C. famata* IMB Y-5033 і вихідного штаму *Candida famata* ATCC 20849, вирощених на середовищах різного складу, представлена в табл. 4. Культури обох штамів вирощують протягом 4-5 діб при 28°C у рідких синтетичних середовищах різного складу: СБ-цукрово-мінеральне середовище, СБ+ДЕ - те ж + 0,5% дріжджового екстракту.

Таблиця 4

Флавіногенна активність штамів *Candida famata* IMB Y-5033 та ATCC 20849

Тривалість вирощування, діб	Вміст РФ (мг/л) в культуральному середовищі			
	IMB Y-5033		ATCC 20849	
	СБ	СБ+ДЕ	СБ	СБ+ДЕ
4	112,9±10,6	445,7±40,6	94,7±5,4	295,6±19,5
5	177,0±12,1	523,5±40,1	157,0±12,1	400,4±32,0

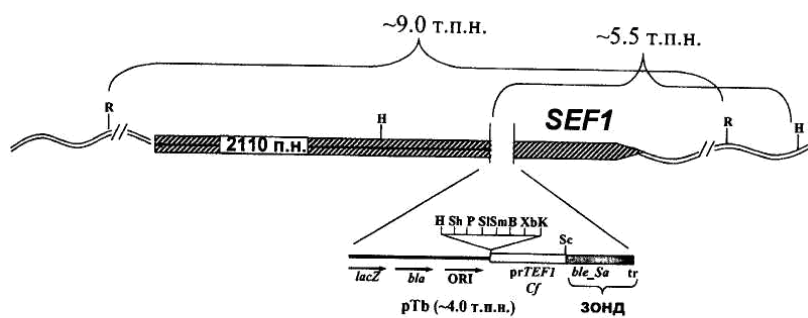
За даними табл. 4 штам *C. famata* IMB Y-5033 відрізняється від штаму ATCC 20849 більшою флавіногенною активністю на обидвох використаних середовищах.

Сконструйований штам *C. famata* IMB Y-5033 може бути використаний у виробництві як набагато ефективніший продуцент РФ завдяки підвищеній флавіногенній активності та високій стабільності за ознакою „надсинтез РФ”.

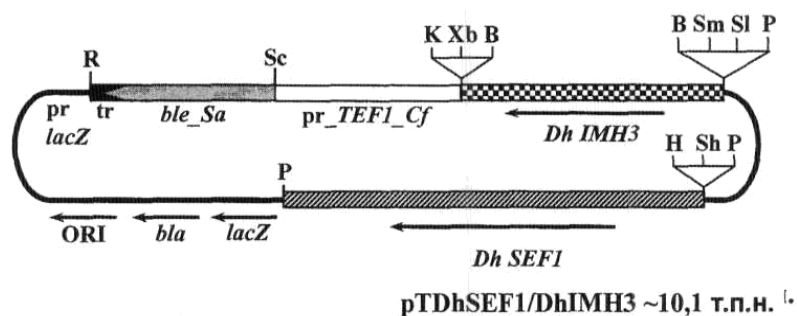
Джерела інформації:

1. Березовский В.М. Химия витаминов. - М.: Пищевая пром., 1973. - 632с.
2. Stahmann K.P. et al. Microbiol. and Biotechnol. - 2000. - Vol.53, N5 - P.509-516.
3. Патент США №3433707, опубл. 18.03.1969.

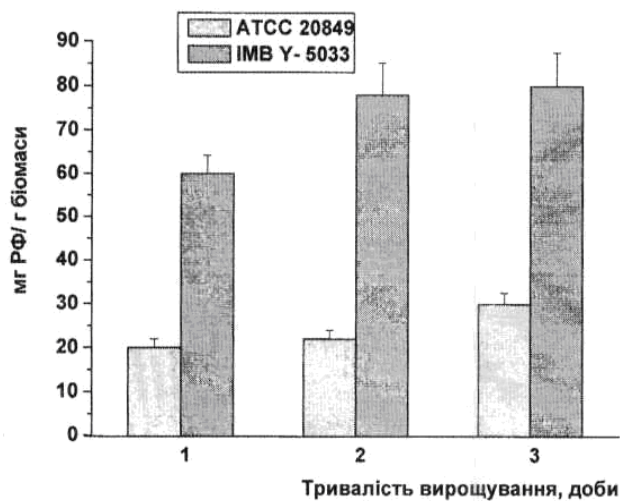
4. Патент США №009822, опубл. 15.12.1988.
5. Патент США №811234, опубл. 20.12.1985.
6. Патент США №5164303, опубл. 17.11.1992.
7. Патент США №5231007, опубл. 27.07.1993.
8. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
9. Voronovsky A.A. et al // FEMS Yeast Research. - 2002. - Vol. 2. - P. 381-388.
10. 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.
11. Dmytruk K.V. et al. // Curr Genet. - 2006. - Vol. 50, N3. - P. 183-191.



Фіг.1



Фіг.2



Фіг.3