



УКРАЇНА

(19) UA (11) 90754 (13) C2
(51) МПК (2009)
C12N 1/19
C12P 25/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA* IMB Y-5034 - ПРОДУЦЕНТ РИБОФЛАВІНУ (ВІТАМІНУ B₂)

1

(21) а200804793
(22) 14.04.2008
(24) 25.05.2010
(46) 25.05.2010, Бюл.№ 10, 2010 р.
(72) СИБІРНИЙ АНДРІЙ АНДРІЙОВИЧ, ДМИТРУК
КОСТЯНТИН ВАСИЛЬОВИЧ, ФЕДОРОВИЧ ДАРІЯ
ВАСИЛІВНА

2

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ
(56) US A 5164303, 17.11.1992.
UA A 200612203, 20.11.2006.
(57) Штам дріжджів *Candida famata* IMB Y-5034 -
продуцент рибофлавіну.

Винахід відноситься до галузі мікробіологічно-го синтезу біологічно активних сполук і є новим штамом дріжджів *Candida famata* - продуцентом вітаміну B₂. Новий штам може бути використаний для отримання рибофлавіну (РФ), який застосовується як лікарський препарат, а також як кормова і харчова добавка, оскільки в організмі людини і тварин він не утворюється.

Відомо, що для отримання РФ мікробіологічним шляхом використовують цвільові гриби *Ashbya gossypii* та *Eremothecium ashbyi*, рекомбінантні штами бактерій *Bacillus subtilis*, а також дріжджів *Candida famata*, які дають приблизно однаковий вихід кінцевого продукту - 15-20г РФ/л [1]. Однак цвільові гриби потребують складних та багатих середовищ, які легко заражаються сторонньою мікрофлорою, а культурі бактерій загрожує фаголізис. Перевагою дріжджів є здатність швидко рости на простих живильних середовищах, напівпродуктах та відходах харчової промисловості при температурі 30-37°C. Описано штами *Candida famata*, які утворюють 3,8г РФ/л за 7 діб культивування [2], 5г РФ/л після 6 діб культивування [3], 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 [4], а також *C.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 [5].

Основним недоліком 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 дріж-

джів у ферментерах. Це знижує рентабельність процесу біотехнологічного отримання РФ.

Найближчим аналогом штаму, що заявляється, є рекомбінантний штам дріжджів *C.famata* IMB Y-5033, який характеризується підвищеною в 4 рази стабільністю порівняно з вихідним штамом *C.famata* ATCC 20849 і забезпечує зростання продуктивності синтезу РФ у 3-4 рази [6]. Однак, незважаючи на підвищену стабільність за ознакою „надсинтез РФ”, вихід цільового продукту (РФ) у штама IMB Y-5033 є невисоким.

В основу винаходу поставлено завдання шляхом комбінації мутагенезу *C.famata* та введення гену, залученого в регуляцію біосинтезу РФ, сконструювати штам-надсинтетик РФ з високою стабільністю за ознакою „надсинтез РФ”.

Поставлене завдання досягається тим, що за допомогою класичного мутагенезу *C.famata* ВКМ У-9 та використання селективних середовищ отримують штами з підвищеною флавіногенною активністю, в геном яких вводять додаткову копію гену SEF1 *D.hansenii*, що забезпечує підвищення стабільності за ознакою „надсинтез РФ” з одночасним зростанням продукції вітаміну B₂.

Штам дріжджів *C.famata* IMB Y-5034 зберігається в депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму *C.famata* IMB Y-5034. Вегетативні клітини штаму, вирощені в рідкому пивному суслі концентрацією 7°Б при 30°C, мають овальну форму, розміром 2,2-7,8х3,2-9,3мкм, містяться поодинокі, парами, іноді короткими ланцюжками чи невеликими гронами. Зрідка утворюють псевдоміцелії. На агаризованому середовищі колонії віком 7 діб округлі, діаметром 2-3мм, профіль припіднятий, краї рівні, поверхня гладка бли-

(13) C2

(11) 90754

(19) UA

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

Клітини штаму *C.famata* IMB Y-5034 асимілюють сахарозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, целобіозу, крохмаль, янтарну кислоту, глутамінову кислоту, сорбітол, лактозу, лактат, манніт, гліцерин; слабо ростуть на мальтозі, арабінозі, інозиті, етанолі, маннозі, ксилізі, рамнозі, ксиліті, дульцин, рафінозі, меліцитозі, трегалозі, сорбозі, проте не використовують яблучну кислоту.

Клітини сконструйованого штаму не ферментують сахарозу, глюкозу, галактозу, ксиліозу, лактозу, крохмаль, трегалозу, рафінозу, целобіозу та меліцитозу. Як джерело азоту штам *C.famata* IMB Y-5034 використовує сульфат амонію, діамоній фосфат, сечовину, але не нітрат натрію.

Штам *C.famata* 1MB Y-5034 належить до облигатних аеробів. Оптимум температури становить 30°C, оптимум pH становить 6,5-9,0.

Штам зберігається на агаризованому суслі-агарі в холодильнику. Клонуються двічі на рік, на 4-5 день вирощування відсівають 3-4 клони з високою флавіногенною активністю.

Для конструювання штаму *C.famata* 1MB Y-5034 використовують такі методи: мутагенез за допомогою УФ-променів, N-метил-N'-нітро-N-нітрозоганідину або етилметансульфонату [7]. 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 *C.famata* проводять, як описано в [9]. Виділення сумарної ДНК з трансформантів *C.famata* проводять як для *S.cerevisiae* [10]. Вміст РФ визначають флуориметрично на приладі ЕФ-3М.

Отримання продуцента РФ *C.famata* IMB Y-5034 та його характеристика ілюструються графічними матеріалами.

На Фіг.1 зображено продукцію РФ штамами *C.famata*, отриманими на різних етапах селекції, де на осі абсцис позначено номер етапу селекції, а на осі ординат - вміст РФ у культуральній рідині.

На Фіг.2 зображена лінійна схема плазмиди pTb (4.0 т.п.н.), де відкриту рамку трансляції гену *ble* *Staphylococcus aureus* позначено товстою сірою лінією; промотор власного гену *TEF1* - товстим білим відрізком; бактерійна послідовність pUC57 - тонкою лінією; хвилястою лінією позначено хромосому ДНК інсерційного штаму, товстою посмугованою лінією позначено ген *SEF1*; скорочення сайтів рестрикції: H, HindIII; Sp, SphI; P, PstI; S1, SalI; Xb, XbaI; B, BamHI; Sm, SmaI; K, KpnI; Sc, SacI; R, EcoRI.

На Фіг.3 зображено зміни продуктивності флавіногенезу вихідного штаму *C.famata* AF4, IMB Y-5033 та IMB Y-5034 протягом 3 днів вирощування, де на осі абсцис відкладений час вирощування, а на осі ординат - продуктивність флавіногенезу (кількість утвореного РФ в перерахунку на мг біомаси).

Штам дріжджів *C.famata* IMB Y-5034 - продуцент РФ з високою стабільністю за ознакою „надсинтез РФ" отримують у декілька етапів.

Етап 1. Селекція штамів і підвищеною флавіногенною активністю.

Вихідним штамом для селекції є колекційний штам з колишньої Всесоюзної (тепер Всеросійської) колекції мікроорганізмів ВКМ У-9. Відбір флавіногенного штаму методами класичної селекції включає 6 етапів. На першому, третьому, четвертому та п'ятому етапах селекції як мутаген використовують ультрафіолет, на другому - нітрозоганідин, а на шостому - етилметансульфонат. Доза мутагену підбирається таким чином, аби забезпечити 10% виживання клітин.

На першому етапі селекції використовують структурний аналог РФ - 7-метил-8-трифторметил-10(1'-рибітил)-ізоалоксазин (МТРІ). Він гальмує ріст штаму ВКМ У-9 лише за наявності в середовищі високих концентрацій йонів сульфату або фосфату. Тому селекцію резистентних мутантів ведуть в середовищі з МТРІ (200мкг/мл) та 0,6М K₂SO₄. Найбільш флавіногенний мутант, що нагромаджував у колбах Ерленмейєра об'ємом 50мл в середовищі Беркгольдера з оптимальним для росту вмістом заліза до 35мкг РФ/мл (Фіг.1), використовують для подальшої селекції.

На другому етапі як селекційний агент використовують 8-азаганідин. Відбирають мутанти, резистентні до 8-азаганідину (200мкг/мл) і перевіряють їх на здатність до надсинтезу РФ в середовищі з оптимальним для росту вмістом заліза. Найкращий штам, що утворював до 78мкг РФ/мл (Фіг.1), використовують для селекції на третьому етапі. У цьому випадку селекційним фактором служив 6-азаурацил (200мкг/мл). Мутант, стійкий до 6-азаурацилу, що нагромаджує до 176мг РФ/мл (Фіг.1), використовують як вихідний на четвертому етапі. Після УФ мутагенезу, відбирають найбільш флавіногенні мутанти, що стійкі до 2-діазо-5-оксо-L-норлейцину (80мкг/мл). Найкращим виявився штам, що синтезує до 380мкг РФ/мл (Фіг.1).

Нами виявлено, що ріст флавіногенних мутантів *C.famata* пригнічується гуанозином. Тому на п'ятому етапі отримують флавіногенні мутанти, стійкі до інгібуючої дії на ріст гуанозину (300мкг/мл). В результаті відібрано найкращий штам, що синтезує до 450мкг РФ/мл (Фіг.1).

Останній етап класичної селекції базується на нашому спостереженні, що флавіногенні мутанти *C.famata* практично не здатні до надсинтезу РФ при культивуванні в забуференому середовищі при pH6,8. Оброблені етилметансульфонатом клітини флавіногенного мутанта, отриманого на попередньому етапі селекції, висівають на агаризоване середовище Беркгольдера, що містить 0,1М К-фосфатний буфер, pH6,8 й і відбирають найжовтіші колонії. Їх флавіногенну активність перевіряють у незабуференому середовищі Беркгольдера. Найбільш флавіногенним серед 87 перевірених (жовтих на забуференому середовищі колоній) виявився штам AF4, що нагромаджує за 4 доби культивування на круговій качалці при 200об/хв до 688мг РФ/мл (Фіг.1).

Протягом кожного етапу селекції перевіряють здатність відібраних флавіногенних мутантів до росту в середовищі з етанолом як єдиним джерелом вуглецю і енергії і відбирають для подальшого поліпшення лише штами, які здатні утилізувати

етанол. Це дозволяє уникнути небезпеки реверсії флавіногенних штамів за ознакою здатності рости на етанолі, що корелює у промислового продуцента РФ, штаму ATCC 20849, з втратою здатності до надпродукції вітаміну B₂.

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

Для стабілізації отриманого штаму AF4 за ознакою „надсинтез РФ” в його геном вводять додаткову копію гену SEF1 *D.hansenii*. Ген SEF1 кодує транскрипційний фактор, залучений у регуляцію біосинтезу РФ у дріжджів [11]. Для ведення в геном мутанта AF4 додаткової копії гену SEF1 *D.hansenii* його трансформують плазмідом рTDhSEF1 (Фіг.2). Перевіряють здатність до надсинтезу РФ в отриманих трансформантів. Найвищу флавіногенну активність виявлено у штаму *C.famata* IMB Y-5034, який нагромаджує при вирощуванні в простому цукрово-мінеральному середовищі більше 1г РФ/л.

Штам дріжджів *C.famata* IMB Y-5034 пройшов лабораторне випробування.

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

Для перевірки стабільності штами *C.famata* IMB Y-5033 (прототип), AF4 та IMB Y-5034 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 Беркгольдера, що містить 1% етанол як джерело вуглецю, в кількості 15×10^6 клітин на чашку. Через 14 днів підраховують кількість колоній на чашці і розраховують частоту реверсії. Як видно з таблиці 1, сконструйований штам *C.famata* IMB Y-5034 характеризується високою стабільністю: після 14 днів культивування він зовсім не вищеплює нефлавіногенних клонів, здатних до утворення великих за розміром колоній при рості на середовищі з етанолом. Частота реверсії для раніше отриманого стабільного штаму *C.famata* IMB Y-5033 становить $13,8 \times 10^{-6}$ [6], а штаму AF4 - $0,4 \times 10^{-6}$.

Таблиця 1

Частота появи клонів, здатних до росту на етанолі у штамів *C.famata* AF4, IMB Y-5033 та IMB Y-5034

Штам	Частота реверсії
<i>C.famata</i> AF4	$0,4 \times 10^{-6}$
<i>C.famata</i> IMB Y-5033	$13,8 \times 10^{-6}$
<i>C.famata</i> IMB Y-5034	-

Для перевірки здатності до синтезу РФ штам *C.famata* IMB Y-5034 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 1-5 діб на круговій качалці (швидкість обертання 200об./хв) при 28°C, після чого визначають вміст РФ в культуральній рідині. Результати досліджень наведені в табл.2.

Таблиця 2

Динаміка продукування РФ штамом *C.famata* IMB Y-5034

Час росту, діб	Вміст РФ, мг/л
1	20,9±1,9
2	776,7±67,2
3	1108,2±5,0
4	1155,9±99,6
5	1210,4±105,1

За даними табл.2 РФ інтенсивно синтезується на 2 добу культивування, максимальний вихід продукту спостерігається на 5 добу.

Продуктивність флавіногенезу (кількість утвореного РФ в перерахунку на одиницю біомаси) сконструйованого штаму *C.famata* IMB Y-5034 на 3 добу культивування у 3 рази вища, ніж у штаму *C.famata* AF4 та IMB Y-5033 (Фіг.2).

Продукція РФ сконструйованим штамом *C.famata* IMB Y-5034 та штамми *C.famata* AF4 та IMB Y-5033, вирощеними на середовищах різного складу (середовище Беркгольдера (СБ) і СБ + дріжджовий екстракт (СБ+ДЕ), представлена у табл. 3.

Таблиця 3

Продукція РФ штамами *Candida famata* AF4, IMB Y-5033 та IMB Y-5034, вирощеними в колбах у середовищах різного складу

Штам	Вміст РФ (мг/л) в культуральному середовищі	
	СБ	СБ+ДЕ
AF4	107,7±76,2	528,6±48,1
IMB Y-5033	177,0±12,1	523,5±40,1
IMB Y-5034	277,1±28,2	1210,4±105,1

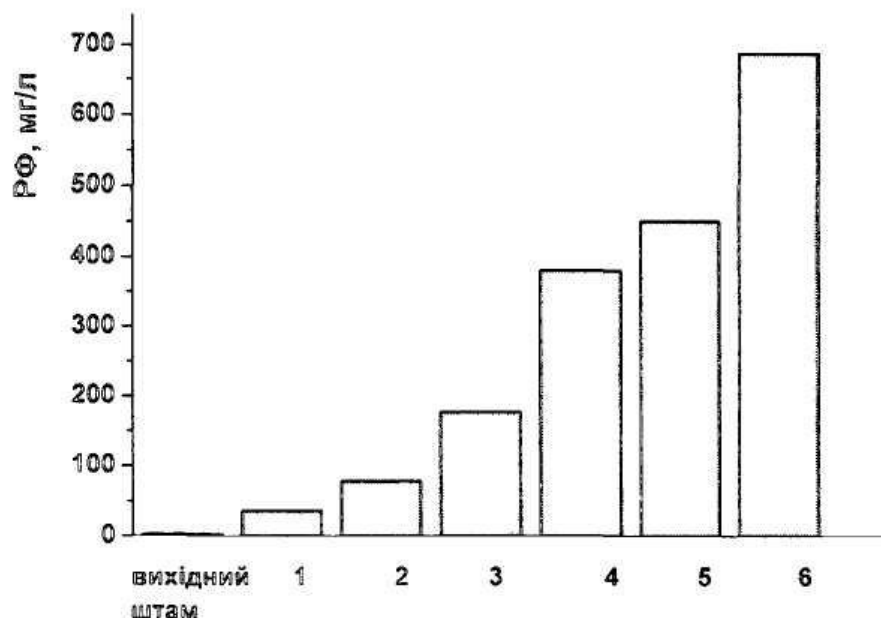
За даними табл. 3 штам *C.famata* IMB Y-5034 відрізняється від штаму AF4 та IMB Y-5033 більшою флавіногенною активністю на обидвох використаних середовищах. За умов культивування у колбах на круговій качалці (200об./хв) у середовищі, що містило 2% глюкози, 1% пептону та 0,5% дріжджового екстракту протягом 4 діб запропонований штам нагромаджує більше 1,2г РФ/л.

Сконструйований штам *C.famata* IMB Y-5034, завдяки підвищеній флавіногенній активності та високій стабільності за ознакою „надсинтез РФ“, може бути використаний у виробництві як ефективний продуцент РФ (вітамін B₂).

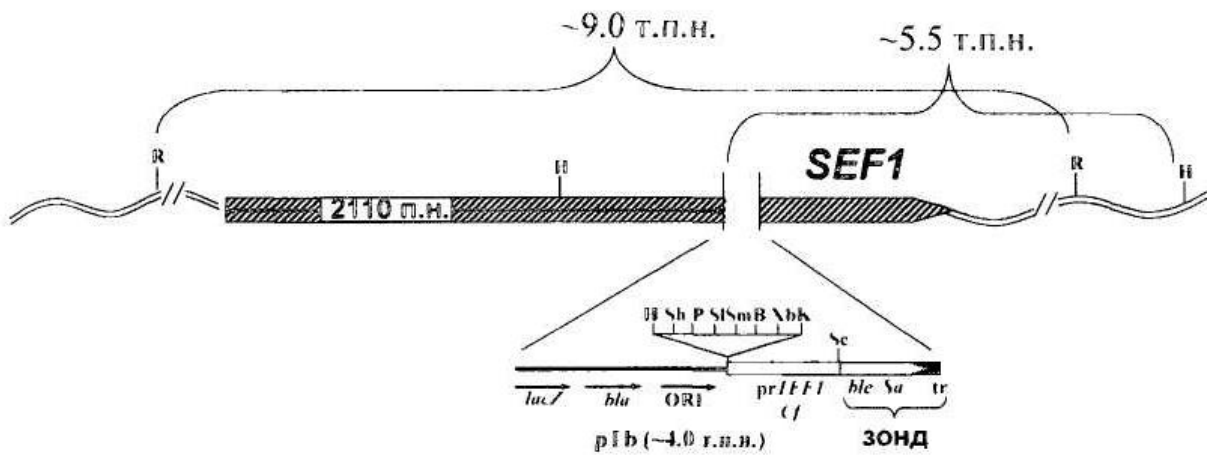
Джерела і інформації:

1. Stahmann K.P. et al. Microbiol. and Biotechnol. - 2000. Vol.53, N 5 - P.509-516.
2. Патент США №009822, опубл.15.12.1988.

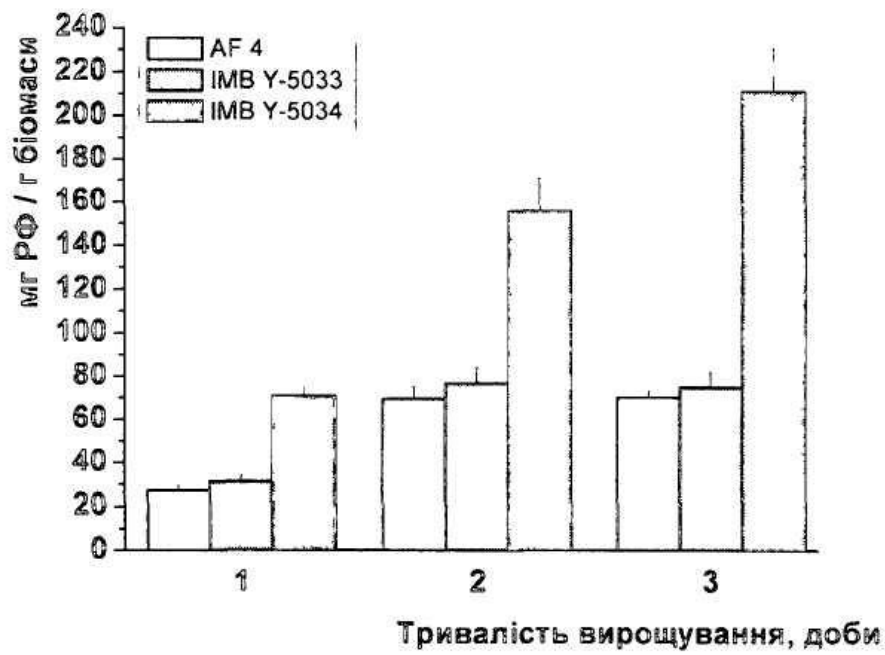
3. Патент США №811234, опубл.20.12.1985.
4. Патент США №5164303, опубл.17.11. 1992.
5. Патент США №5231007, опубл.27.07.1993.
6. Заявка на патент України №a2008 03778 від 25.03.2008.
7. Adelberg et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1965. - Vol.18. №5. - P.788-795.
8. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis 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, N 3. - P.183-191.



Фіг.1



Фіг.2



Фіг.3

В описі до патенту на винахід графічні зображення та текст подаються в редакції заявника

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Підписне

Тираж 26 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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