

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246658 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **435341**

(22) Data zgłoszenia: **2020.09.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.07.19 BUP 16/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.24 WUP 08/2025**

(51) MKP:

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12P 25/00 (2006.01)

C12R 1/72 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Rzeszowski, Rzeszów, PL
PODKARPACKIE CENTRUM INNOWACJI
SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Rzeszów, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

ANDRIY SYBIRNYY, Rzeszów, PL
JUSTYNA RUCHAŁA, Miocin, PL
DARIA FEDOROVYCH, Lwów, UA
ALICJA WOJTUŃ, Trzeźniów, PL
AGATA ZNAMIROWSKA, Rzeszów, PL
KOSTYANTYN DMYTRUK, Lwów, UA
ANDRIJ TSYRULNYK, Lwów, UA

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Sas, Tyczyn, PL

(54) Tytuł:

Szczep drożdży Candida famata BCRP zdolny do nadprodukcji ryboflawiny oraz
zastosowanie szczepu drożdży Candida famata BCRP do wytwarzania ryboflawiny

PL 246658 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest szczep drożdży *Candida famata* BCRP zdolny do nadprodukcji ryboflawiny oraz zastosowanie szczepu drożdży *Candida famata* do wytwarzania ryboflawiny.

Ryboflawina, czyli 7,8-dimetylo-10-(1'-D-rybitylo)izoalloksazyna, nazywana witaminą B₂, jest prekursorem koenzymów flawinowych FAD oraz FMN, uczestniczących w reakcjach oksydoredukcyjnych organizmu, w tym za tlenowe oddychanie w komórkach. Ryboflawina z reguły nie ma bezpośrednich funkcji metabolicznych w żywej komórce, a służy jedynie jako prekursor do syntezy FMN oraz FAD (Abbas, Sibirny, 2011).

Ryboflawina jest szeroko rozpowszechniona we wszystkich komórkach i dlatego, znalazła szerokie zastosowanie jako dodatek do pasz (pokarmu zwierząt hodowlanych) oraz żywności. Jej głównymi źródłami są mleko oraz przetwory mleczne, mięso, jaja lub suche nasiona roślin strączkowych np. fasola. Dobrym źródłem są również zboża, tłuste ryby oraz niektóre owoce i warzywa, zwłaszcza ciemnozielone warzywa zawierają dość wysokie stężenia ryboflawiny.

Ryboflawina ma także swój udział w przemianie białka, węglowodanów i tłuszczu oraz w oddychaniu. Jest również odpowiedzialna za prawidłowe funkcjonowanie procesów oksydacyjno-redukcyjnych, przemianę aminokwasów i lipidów, a także układu nerwowego. Wraz z witaminą A uczestniczy w prawidłowym funkcjonowaniu śluzówki przewodu pokarmowego, nabłonka naczyń krwionośnych i skóry oraz błon śluzowych dróg oddechowych. Odgrywa również istotną rolę w procesie widzenia. Na niedobór witaminy B₂ narażeni są alkoholicy, dzieci i młodzież, diabetycy, ludzie w podeszłym wieku oraz kobiety w ciąży. Głównymi objawami niedoboru witaminy B₂ są zmiany w obrębie jamy ustnej, owrzodzenia i pęknięcia w kącikach warg, zapalenie śluzówki nosa i jamy ustnej. Mogą wystąpić także zmiany w narządzie wzroku, bezsenność czy zawroty głowy a nawet światłowstręt. Ze względu na ograniczoną zdolność wchłaniania witaminy B₂ z przewodu pokarmowego nie obserwuje się szkodliwych skutków jej przedawkowania (Abbas, Sibirny 2011; Gawęcki, 2002).

Ryboflawina jest w około 80%-ach stosowana w rolnictwie jako dodatek do pasz, a także w przemyśle spożywczym jako żółty barwnik (10%) i medycynie (10%). W dniu dzisiejszym ryboflawina jest pozyskiwana w przemyśle wyłącznie poprzez syntezę mikrobiologiczną. Rynek ryboflawiny wynosi około 250 milionów US\$ rocznie. W ostatnich latach intensywnie rozwija się sektor biotechnologicznej produkcji ryboflawiny, który polega na wykorzystaniu genetycznie zmodyfikowanych bakterii i grzybów. W syntezie mikrobiologicznej wykorzystywane są wyselekcjonowane szczepy, których hodowla zoptymalizowana jest pod względem doboru składników pożywki oraz warunków hodowli. Substratami do hodowli i produkcji ryboflawiny są glukoza oraz tłuszcze, które generują duże koszty związane z produkcją ryboflawiny i wpływają na cenę gotowych preparatów. Zastosowanie wysokowydajnych szczepów mikroorganizmów z gatunków *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii* czy *Eremothecium* pozwala na przeprowadzenie fermentacji, jednocześnie znacznie redukując koszty produkcji i potencjalnego recyklingu substancji odpadowych. Perspektywicznymi producentami ryboflawiny są drożdże *C. famata* (Abbas and Sibirny, 2011).

Drożdże *C. famata* należą do grupy tzw. „drożdży flawinogennych”, zdolnych do nadprodukcji ryboflawiny w warunkach niedoboru żelaza. Niektóre szczepy *C. famata* należą do najbardziej aktywnych flawinogennych organizmów i do niedawna były wykorzystywane w przemysłowej produkcji ryboflawiny w USA. *C. famata* charakteryzuje się wysoką tolerancją na zasolenie, przy stężeniach NaCl do 2,5 M. Stosunkowo niedawno nastąpił rozwój podstawowych narzędzi do inżynierii metabolicznej *C. famata*, takich jak system transformacji, markery selekcyjne, mutageneza insercyjna, system reporterowy i inne. Opracowane narzędzia wykorzystuje się do klonowania i identyfikacji genów strukturalnych oraz regulatorowych syntezy ryboflawiny. Umożliwia to konstrukcję ulepszonych szczepów drożdży wytwarzających ryboflawinę, FMN i FAD, w oparciu o przemysłowe szczepy wytwarzające ryboflawinę (Dmytruk, Sibimy, 2012; Dmytruk et al., 2011, 2014; 2020).

Przez wiele lat drożdże *C. famata* uważano za anamorficzną odmianę *Debaryomyces hansenii*. Odróżniała je m. in. zdolność do nadprodukcji ryboflawiny u *C. famata*. Późniejsze badania wykazały, że obecnie *C. famata* i *D. hansenii* są różnymi gatunkami, a nie odmianami anamorficznymi i teleomorficznymi tego samego gatunku. *C. famata* można wyizolować z różnych źródeł naturalnych, ale najczęściej z przetworzonych produktów spożywczych. Rzadziej szczep ten pozyskiwany jest z próbek klinicznych, zwykle związanych ze skórą. Testy asymilacji źródeł węgla dla *C. famata* są dodatnie dla glukozy, galaktozy, maltozy, sacharozy, trehalozy, D-ksylozy, melezytozy, glicerolu, rafinozy, celobiozy, L-arabinozy, D-mannitolu, D-glucitolu, rybitolu, salicyny, DL- kwasu mlekowego i kwasu bursztynowego;

zmienne dla laktozy, melibiozy, erytrytolu, skrobi, L-ramnozy, D-arabinozy, L-sorbozy, D-rybozy, galaktitolu i kwasu cytrynowego; ujemne w stosunku do azotanu potasu i inozytolu (Dmytruk, Sibimy, 2012).

Wcześniej uzyskano już wysokowydajny szczep *C. famata* dzięki nadekspresji białka drożdży *Debaryomyces hansenii* IMH3 oraz własnych białek SEF1, RIB1, RIB7 (Dmytruk et al., 2011; 2014), a także genów biosyntezy purynowych nukleotydów de novo PRS3 oraz ADE4 (Dmytruk et al., 2020). Celem wynalazku jest uzyskanie nowego szczepu *C. famata*, zdolnego do bardziej wydajnej produkcji ryboflawiny. Wszystkie ulepszone szczepy wykazywały zdolność do nadprodukcji ryboflawiny w podłożu z glukozą lub sacharozą. Niedawno uzyskano także nadproducentów ryboflawiny *C. famata* poprzez nadekspresję genu drożdży *D. hansenii* RFE1 homologicznego genu ssaków BCRP, który koduje ekskretazę ryboflawiny. (Tsurulnyk et al., 2020a).

Wynalazek dotyczy szczepu *Candida famata* BCRP zdolnego do nadprodukcji ryboflawiny z serwatki kwaśnej zdeponowanego w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie pod numerem depozytowym KKP2078p.

Wynalazek dotyczy zastosowania nowego szczepu *Candida famata* BCRP zdeponowanego w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie pod numerem depozytowym KKP2078p do wytwarzania ryboflawiny z serwatki kwaśnej.

Główną zaletą rozwiązania według wynalazku jest uzyskanie ryboflawiny z wykorzystaniem odpadu produkcji mleczarskiej, jakim jest serwatka, obniżając tym samym znacznie koszt jej wytwarzania.

Rozwiązanie według wynalazku zilustrowano przykładami wykonania.

Przykład 1

Oznaczenia dokonano przy użyciu spektrofotometru dla biomasy przy długości fali 590 nm (absorbancja 3,4 odpowiada 1 mg/ml biomasy). Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność ryboflawiny, próbki rozcieńczano, a następnie ogrzewano przez minimum 30 min w 80°C. Oznaczenie wykonywano przy długości fali 445 nm, a stężenie RF obliczano ze wzoru:

$$RF = \frac{Abs_{445nm} \times rozcz}{0,0306} \left[\frac{mg}{l} \right]$$

Przykład 2

Uzyskanie bardziej wydajnego producenta ryboflawiny osiąga się przy pomocy nadekspresji białka drożdży *C. famata* RFE1 lub drożdży spokrewnionych *D. hansenii*, homologicznego do białka BCRP zabezpieczającego ekskrecję ryboflawiny w komórkach gruczołu mlekowego ssaków. Szczepy te syntetyzują zwiększone ilości ryboflawiny w podłożu z glukozą (Tsurulnyk et al., 2020; dane zgłoszenie patentowe). Homologi genu BCRP z drożdży *C. famata* oraz *D. hansenii* zostały nadekspresjonowane w komórkach *C. famata* dzięki ekspresji pod kontrolą silnego konstytutywnego promotora TEF1.

Aby uzyskać rekombinowane szczepy o zwiększonej syntezie witaminy B₂ stabilny producent ryboflawiny *C. famata* #91 (AF-4/ SEF1 / RIB1 / RIB7) (Dmytruk et al., 2014) metodą elektroporacji transformuje się plazmidem pUC57_TEF1_BCRP_ble (Fig. 1). Plazmid ten zawiera gen RFE1 *D. hansenii* odpowiedzialny za wydalenie ryboflawiny z komórek, pod kontrolą silnego konstytutywnego promotora DhTEF1. Po transformacji komórki wysiewa się na pożywkę selektywną YPD zawierającą antybiotyki ampicylinę (100 mg/l) i fleomycynę (20 mg/l). Kolonie zdolne do wzrostu na pożywce selektywnej pojawiają się po 3–5 dniach inkubacji z szybkością około 50 transformantów na 1 µg plazmidowego DNA. Transformowane komórki stabilizuje się przez hodowlę w nieselektywnej pożywce przez 15–17 pokoleń, a następnie poprzez przeniesienie do pożywki selektywnej z fleomycyną. Obecność genu RFE1 w genomie transformantów potwierdza się metodą PCR. Zdolność do nadprodukcji ryboflawiny testowano po 72 godzinach wzrostu w bogatej pożywce YPD. Uzyskano szereg transformantów, które produkują więcej ryboflawiny niż szczep biorcy *C. famata* #91. Bardziej szczegółowo badano zdolność jednego z otrzymanych transformantów BCRP o najwyższym poziomie syntezy ryboflawiny w pożywce YPD.

Przykład 3

Aby przetestować zdolność do syntezy ryboflawiny szczep *C. famata* hoduje się na szalce Petriego na pożywce YPD w temperaturze 28°C przez 1 dzień. Otrzymaną hodowlę wysiewa się do kolby (100 ml) z 10 ml pożywki YNB lub YNB z dodatkiem ekstraktu drożdżowego i różnymi źródłami węgla, inkubuje przez 4 dni na wytrząsarce obrotowej przy prędkości 200 obr./min w temperaturze 28°C, a następnie oznacza się biomasę i zawartość ryboflawiny w płynie hodowlanym według przykładu 1. Wyniki badań przedstawiono na rysunku Fig. 2. Uzyskany szczep drożdży jest zdolny do nadprodukcji

ryboflawiny nie tylko w pożywce z glukozą i sacharozą, ale także z laktozą. Ponadto lepiej rośnie i syntetyzuje ryboflawinę po dodaniu ekstraktu drożdżowego (0,5%) do pożywki YNB.

Przykład 4

Laktoza jest jednym z głównych składników serwatki. Zawartość tego cukru w serwatce wynosi 3,2–5,1%, a w serwatce skoncentrowanej – 15%. Aby przetestować zdolność do syntezy ryboflawiny szczepu *C. famata* hodowano na szalce Petriego na pożywce YPD w temperaturze 28°C przez 1 dzień. Uzyskaną hodowlę wysiano do kolb (100 ml) z 10 ml pożywki z serwatką, i inkubowano przez 4 dni na wytrząsarce kołowej przy prędkości 200 obr/min w temperaturze 28°C, a następnie określono zawartość ryboflawiny w płynie hodowlanym. Wyniki badań przedstawiono na rysunku Fig. 3.

Wzrost w pożywce z serwatką przy stężeniach laktozy 2,5 i 5% jest słabszy w porównaniu z pożywkami kontrolnymi YPD i YNB + ekstrakt drożdżowy, jednak po dodaniu dodatkowego źródła azotu ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L badany szczep gromadzi do 10 mg/ml biomasy. Dodanie dodatkowego źródła azotu – siarczanu amonu do serwatki znacząco, bo nawet do 10 razy zwiększa produkcję ryboflawiny przez rekombinowany szczep zawierający dodatkowy gen RFE1, a akumulacja ryboflawiny w tej pożywce jest wyższa niż w bogatych podłożach YPD i YNB z dodatkiem ekstraktu drożdżowego i wynosi do 1,2 g/L. Gdy szczep *C. famata* BCRP hodowano w stężonej serwatce z 15% laktozy, nie zaobserwowano żadnego wzrostu, a dodatek siarczanu amonu tego nie zmienił.

Testowano wpływ innych źródeł azotu – mocznika, kombinacji mocznika i siarczanu amonu, fosforanu diamonu i difosforanu amonu – na zdolność do nadprodukcji ryboflawiny przez szczep *C. famata* BCRP. Wszystkie badane związki zawierające azot zwiększają produkcję ryboflawiny w pożywce z serwatką co pokazano na rysunku Fig. 4. Dlatego, aby uzyskać wysoki poziom ryboflawiny syntetyzowanej przez szczep *C. famata* BCRP w serwatce jako źródło azotu można użyć mocznika, połączenia mocznika i siarczanu amonu, siarczanu amonu, difosforanu amonu i fosforanu dwuamonowego.

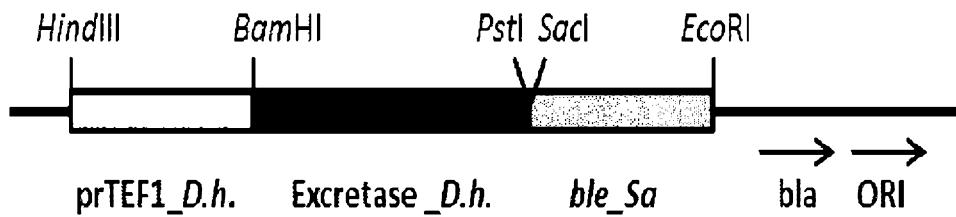
Przykład 5

Aby zbadać skuteczność pobierania laktozy z pożywki przez szczep *C. famata* BCRP, przeprowadzono analizę zawartości tego cukru w pożywce przez 120 godzin hodowli. Skład chemiczny, czyli zawartość tłuszczu, białka i laktozy, kwaśnej serwatki określono za pomocą urządzenia Analizator Mleka na podczerwień (Infrared Milk Analyzer Bentley B-150, Bentley Instruments, USA). Podczas hodowli, stężenie laktozy w pożywce stopniowo maleje, jednak znaczna ilość, czyli ok. 1% pozostaje, nawet po 100 godzinach hodowli. Na rysunku Fig. 5. pokazano powolne spożywanie laktozy przez szczep drożdży *C. famata* BCRP z nadekspresjonowanym genem RFE1.

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep drożdży *Candida famata* BCRP zdolny do nadprodukcji ryboflawiny zdeponowany w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie pod numerem depozytowym KKP2078p.
2. Zastosowanie szczepu *Candida famata* BCRP zdeponowanego w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie pod numerem depozytowym KKP2078p do wytwarzania ryboflawiny z serwatki kwaśnej.

Rysunki



Wykres liniowy plazmidu

Fig. 1

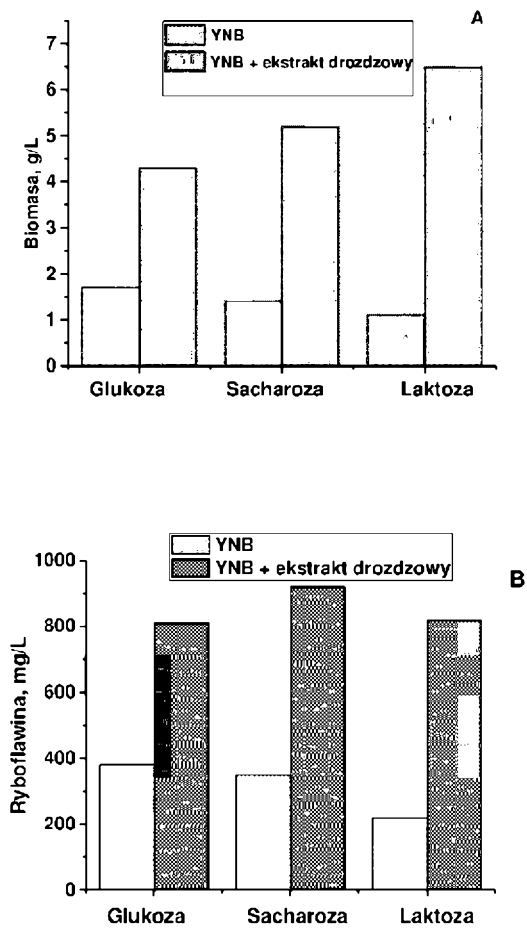
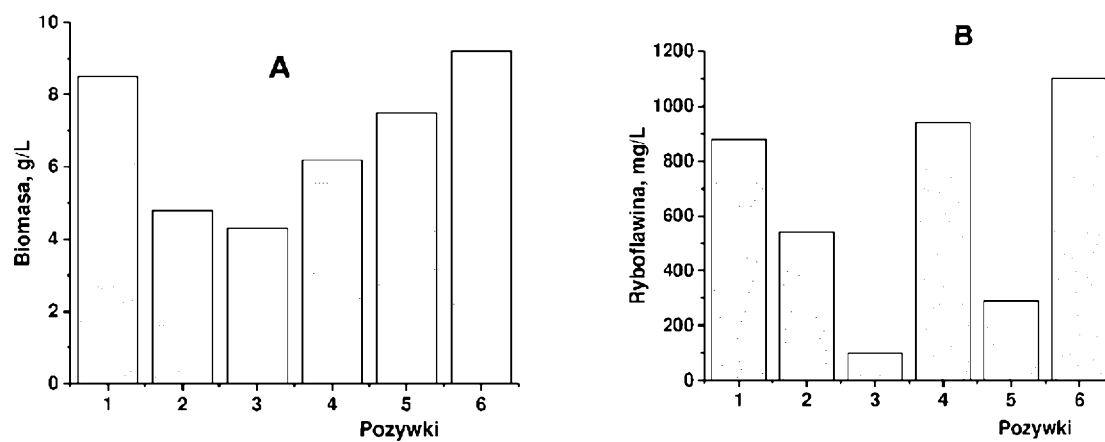


Fig. 2



1 – YNB + ekstrakt drożdżowy (0.5%)

2 – YPD

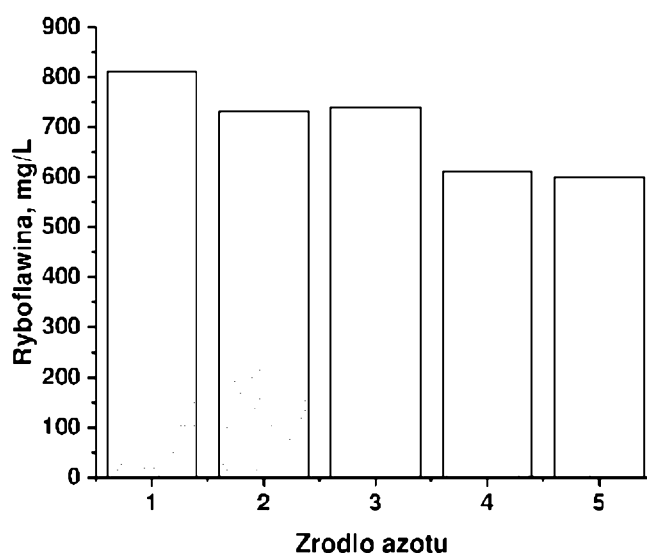
3 – Serwatka o zawartości laktozy, 2.5%

4 – Serwatka o zawartości laktozy, 2.5% + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L

5 – Serwatka o zawartości laktozy, 5%

6 – Serwatka o zawartości laktozy, 5% + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L

Fig. 3



- 1 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L
- 2 – Mocznik, 1 g/L
- 3 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L + Mocznik, 1 g/L
- 4 – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3 g/L
- 5 – $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, 5.19 g/L

Fig. 4

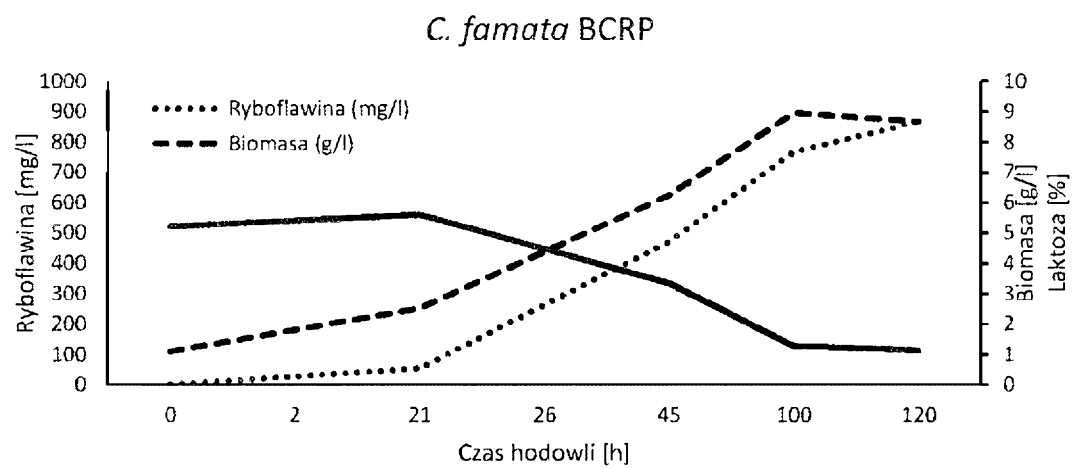


Fig. 5