

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191360** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.08.11

(51) Int. Cl. *C12P 25/00* (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.11.11

(54) **УСОВЕРШЕНСТВОВАННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ РИБОФЛАВИНА**

(31) 62/767612

(32) 2018.11.15

(33) US

(86) PCT/EP2019/080835

(87) WO 2020/099303 2020.05.22

(71) Заявитель:
ДСМ АйПи АССТЕС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Фаррелл Кристофер Марк, Пото
Себастьян Эрик, Прагай Золтан, Аная
Майкл Патрик (СН)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Данное изобретение относится к усовершенствованному способу получения витамина В₂ с использованием генетически модифицированных клеток-хозяев, содержащих гетерологичный фермент с пиридоксальфосфатазной активностью. При использовании указанных модифицированных клеток-хозяев выход рибофлавина можно увеличить по меньшей мере на около 5%.

A1

202191360

202191360

A1

УСОВЕРШЕНСТВОВАННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ РИБОФЛАВИНА

Данное изобретение относится к усовершенствованному способу получения витамина В₂ с использованием генетически модифицированных клеток-хозяев, содержащих гетерологичный фермент с пиридоксальфосфатазной активностью. При использовании указанных модифицированных клеток-хозяев выход рибофлавина можно увеличить по меньшей мере на около 5%.

Рибофлавин синтезируется у всех растений и у многих микроорганизмов, но у высших животных он не образуется. Рибофлавин критически важен для основного обмена веществ, так как является предшественником коферментов, например флавинадениндинуклеотида (FAD) и флавинмононуклеотида (FMN), необходимых в процессах ферментативного окисления углеводов. У высших животных недостаток рибофлавина в организме вызывает выпадение волос/шерсти, воспалительные явления в коже, расстройство зрения и задержку роста.

Биосинтез рибофлавина начинается с гуанозинтрифосфата (GTP) и рибулозо-5-фосфата. Гены, участвующие в биосинтезе рибофлавина, известны у таких организмов, как, например, *Bacillus subtilis*, *Ereothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*, *Candida flareri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* (см., например, Европейский патент № 405370, фиг. 2 в Европейском патенте № 1186664 или главу «Витамины» в 7-м издании Энциклопедии Ульмана по промышленной химии (Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry)).

Чтобы наладить промышленный способ производства с использованием микроорганизмов, например представителей рода *Bacillus*, требуются некоторые изменения клеток-хозяев и/или условий производства (см., например, Kil et al., Mol. Gen. Genet. 233, 483-486, 1992; Mack et al., J. Bacteriol., 180:950-955, 1998). Поток метаболитов по пути биосинтеза рибофлавина должен держаться на высоком уровне за счет обеспечения внутриклеточной концентрации рибулозо-5-фосфата выше насыщающей концентрации субстрата 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфат—синтазы (или максимально близко к этому значению), которая, как считается, катализирует реакцию, лимитирующую скорость биосинтеза рибофлавина.

Транскрипция рибофлавинового оперона с промотором *rib* (P_{rib}) регулируется РНК-переключателем (рибопереключателем) – не транслируемым регуляторным лидерным участком длиной почти 300 нуклеотидов, расположенным в 5'-области *rib*-оперона между

сайтом начала транскрипции и стартовым кодоном трансляции первого гена оперона, а именно *ribG*. Элонгация образующейся рибофлавиновой РНК зависит от присутствия/отсутствия FMN или FAD: в присутствии этих веществ образуется шпилька (так называемый *rib*-терминатор), в результате чего транскрипция прекращается, а в их отсутствие образуется антитерминатор, в результате чего происходит сквозная транскрипция *rib*-оперона.

Таким образом, разработка промышленного способа с использованием микроорганизмов затрагивает сложный процесс с участием многих ферментов, в котором несколько «узких» мест, например необходимость поддерживать достаточный поток метаболитов в одном направлении на протяжении всего процесса.

Мы обнаружили, что, как ни странно, определенная фосфатаза, известная как участник пути биосинтеза витамина B₆, играет важную роль в ферментативном образовании рибофлавина, и что ее использование в этом процессе повышает его выход по меньшей мере на около 5%.

В частности, данное изобретение относится к клеткам-хозяевам, продуцирующим рибофлавин, как, например, рекомбинантные клетки-хозяева, в которых имеются (и экспрессируются) гены биосинтеза рибофлавина, в том числе продуцирующие рибофлавин представители рода *Bacillus*, содержащие гетерологичный фермент с пиридоксальфосфатазной [ЕС 3.1.3.74] активностью.

По данному изобретению клетками-хозяевами, продуцирующими рибофлавин, являются любые пригодные для этого клетки, способные производить рибофлавин, то есть в которых имеются (и экспрессируются) гены биосинтеза рибофлавина. Предпочтительно, источником генов биосинтеза рибофлавина, служат бактерии из рода *Bacillus*, в частности *Bacillus subtilis*, несущие, например, гены биосинтеза рибофлавина *ribG* (*ribD*), *ribB* (*ribE*), *ribA* и *ribH*.

Гетерологичный фермент с пиридоксальфосфатазной [ЕС 3.1.3.74] активностью, присутствующий в клетках-хозяевах, продуцирующих рибофлавин, которые описаны в настоящем документе, может быть получен из различных источников, например, животных, растений, микроорганизмов, включая бактерий и грибы, в том числе дрожжи. В одном из воплощений данного изобретения указанный гетерологичный фермент выбирают из полипептидов, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере на около 70%, например на 75, 80, 85, 90, 95, 98% или до 100%, идентична последовательности SEQ ID NO:2, которая экспрессируется по полинуклеотиду с последовательностью SEQ ID NO:1.

Полипептид с последовательностью SEQ ID NO:2 был выделен из бактерий *Sinorhizobium meliloti* IFO 14782 (номер доступа в базе данных UniProt - A7BK78). Источники полипептидов, по меньшей мере на 70% идентичных последовательности SEQ ID NO:2, которые можно использовать для клеток-хозяев, продуцирующих рибофлавин, по данному изобретению, включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) представителей группы клубеньковых бактерий, например *Sinorhizobium* sp. RAC02, *Sinorhizobium meliloti* (штамм USDA1021-ATCC 14580), *Rhizobium leguminosarum* (номер доступа в базе данных GenBank- WP_018068721), *Sinorhizobium meliloti* (штамм BL225C; номер доступа в базе данных GenBank - AEG03018.1) или те организмы, которые указаны в таблице 4.

В настоящем документе рекомбинантными или модифицированными клетками-хозяевами называются клетки-хозяева, продуцирующие рибофлавин и несущие гены биосинтеза рибофлавина, например микроорганизмы, в частности бактерии из рода *Bacillus*, предпочтительно *Bacillus subtilis*, содержащие гетерологичный фермент, обладающий, как говорится в настоящем документе, пиридоксальфосфатазной [ЕС 3.1.3.74] активностью, в частности гетерологичный фермент/полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на около 70% идентична последовательности SEQ ID NO:2.

В настоящем документе не модифицированными или дикого типа клетками-хозяевами, продуцирующими рибофлавин, называются клетки, несущие гены биосинтеза рибофлавина, например микроорганизмы, в частности бактерии из рода *Bacillus*, предпочтительно *Bacillus subtilis*, в которых отсутствуют (не экспрессируются) ферменты с активностью гетерологичного фермента согласно определению последнего, приведенному в настоящем документе.

В настоящем документе термин «гетерологичный фермент» относится к ферменту, не эндогенному для данных клеток-хозяев, а именно для клеток-хозяев, продуцирующих рибофлавин. Для того, чтобы указанный фермент экспрессировался в продуцирующих рибофлавин клетках-хозяевах, например в бактериях из рода *Bacillus*, в них нужно ввести соответствующую ДНК, кодирующую данный фермент. Таким образом, данное изобретение относится к клеткам-хозяевам, продуцирующим рибофлавин, в частности к бактериям из рода *Bacillus*, предпочтительно к *B. subtilis*, в которые ввели полинуклеотид, кодирующий фермент, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 70% идентична последовательности SEQ ID NO:2, и который обладает пиридоксальфосфатазной [ЕС 3.1.3.74] активностью, и указанный полинуклеотид экспрессируется (активен) в этих клетках.

Введение в клетки последовательности ДНК, кодирующей такой гетерологичный фермент, может осуществляться, например, как добавление или вставка этой последовательности ДНК в хромосомную ДНК клетки-хозяина путем трансформации, конъюгации или трансдукции или же указанная последовательность ДНК включается в ДНК реплицирующейся плазмиды, то есть в подходящий экспрессионный вектор. Такое добавление или вставка происходит в результате рекомбинации, что приводит (или не приводит) также к удалению или делеции некоторого количества нуклеотидов хромосомной ДНК. Методы введения последовательностей ДНК в клетки-хозяева, например в микроорганизмы, в частности сайт-специфическое введение, хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в работах Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N. Y. и Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.). Термины «модифицированный» или «трансформированный» применительно к клеткам-хозяевам в настоящем документе употребляются взаимозаменяемо. Методы создания модифицированных клеток-хозяев, какие описаны в настоящем документе, и/или пригодные для этого экспрессионные векторы, известны специалистам в данной области техники.

По одному из воплощений данного изобретения в модифицированные клетки-хозяева, описанные в настоящем документе, могут быть введены и будут экспрессироваться в них одна или более копий (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более копий) нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный фермент, описанный в настоящем документе, предпочтительно полипептид с пиридоксальфосфатазной активностью [EC 3.1.3.74], по меньшей мере на около 70% идентичный последовательности SEQ ID NO:2 например полипептид, кодируемый полинуклеотидом с последовательностью SEQ ID NO:1. Полинуклеотид, кодирующий гетерологичный фермент, описанный в настоящем документе, по одному из аспектов данного изобретения регулируется сильным и/или конститутивным или индуцируемым промотором или модифицирован, например в результате мутации гена, кодирующего этот гетерологичный фермент, или введения и/или генетической модификации регулятора транскрипции и/или трансляции, включая инактивацию ингибиторов транскрипции и/или трансляции. Такие методы известны специалистам в данной области техники.

Конститутивные промоторы, пригодные для осуществления данного изобретения, включают, например, промотор гена *veg* (*Pveg*), который функционально связан с сайтом связывания рибосомы (RBS) прокариот, например с RBS гена *spoVG B. subtilis*, например с нуклеотидной последовательностью, соответствующей положениям с 1-го по 46-е

последовательности SEQ ID NO:3 (ATG-71 п.н. -- ATG-26 п.н.) и положениям с 55-го по 71-е последовательности SEQ ID NO:3 (ATG-17 п.н. -- ATG-1 п.н.). По данному изобретению можно также использовать сильный промотор *P_{spo15}*. Введение такого сильного промотора в модифицированные клетки-хозяева, описанные в настоящем документе, может вызывать увеличение образования рибофлавина, которое составит по меньшей мере 50%, 75%, 100%, 200%, 250%, 300%, 350%, 500% или даже более 1000% по сравнению с не модифицированными клетками-хозяевами. Таким образом, в одном из воплощений данного изобретения гетерологичный фермент, указанный в настоящем документе, используется вместе с определенным промотором, в том числе *P_{veg}*, который функционально связан с сайтом связывания рибосомы.

В одном из воплощений данного изобретения модифицированные клетки-хозяева способны продуцировать рибофлавин с выходом, по меньшей мере на около 5%, например по меньшей мере на около 7, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50% или больше, превышающим выход рибофлавина, продуцируемого не модифицированными клетками-хозяевами.

В одном из воплощений данного изобретения активность эндогенного гена *ribC* в продуцирующих рибофлавин модифицированных клетках-хозяевах, указанных в настоящем документе, понижена или отсутствует, в частности понижена по меньшей мере на около 20%, предпочтительно, например, по меньшей мере на около 50, 60, 70, 80, 90%; наиболее предпочтительно, чтобы активность гена *ribC* отсутствовала, то есть была бы понижена до нуля. Это достигается путем нокаута гена *ribC* или его частей, как описано в настоящем документе (см., например, патент США № 5837528).

Каким образом осуществляются генетические манипуляции или модификации клеток-хозяев, например снижение или ликвидация активности гена *ribC*? известно специалистам в данной области техники. Пригодные для этого методы включают (не ограничиваясь перечисленным здесь), например, замещение, амплификацию или разрушение гена, трансфекцию, трансформацию с использованием плазмид, вирусов или иных векторов.

Модификации с целью вынудить клетки-хозяева производить меньше копий гена *ribC* и/или соответствующего белка (или не производить их вовсе) включают использование слабых промоторов или мутаций (например, вставок, делеций или точковых мутаций) гена *ribC* или его частей, в частности регуляторных элементов этого гена. Также снижения или ликвидации специфической активности *ribC* можно добиться с помощью ингибиторов *ribC* или других специфичных к этому гену веществ. Эти известные в данной области техники методы можно применять для того, чтобы создать

продуцирующие рибофлавин клетки-хозяева, в которых понижена или отсутствует активность гена *ribC* и которые содержат гетерологичный полипептид, обладающий пиридоксальфосфатазной [ЕС 3.1.3.74] активностью, как описано в настоящем документе..

Модифицированные клетки-хозяева, описанные в настоящем документе, могут быть дополнительно модифицированы иначе: например, можно повысить уровень экспрессии одного или более генов биосинтеза рибофлавина, в частности гена *ribA*, или ввести множество копий *rib*-оперона в клетки-хозяева, например в штамм *B. subtilis* RB50 (см., например, Европейский патент № 405370). Путем генетического изменения микроорганизма, а именно соединив гены *rib* с сильным промотором, образование рибофлавина увеличивается по меньшей мере на 100%, 200%, 250%, 500% или даже более чем на 750% по сравнению с *B. subtilis* RB50. По одному из аспектов данного изобретения микроорганизм, содержащий описанный в настоящем документе гетерологичный фермент с пиридоксальфосфатазной [ЕС 3.1.3.74] активностью, при необходимости объединенный с введенным сильным промотором и/или множественными копиями *rib*-оперона, может быть дополнительно модифицирован путем разрыва связи между клеточным ростом и образованием рибофлавина, например в результате ауксотрофного режима культивирования, как описано в Европейском патенте № 1186664 для, например, биотина, и/или в сочетании с введением модифицированного гена транскетолазы, как, например, описано в публикации WO2007051552, и/или в сочетании с использованием модифицированных нуклеотидных последовательностей лидерной области *rib*-оперона, как, например, описано в публикации WO2010052319.

По данному изобретению в качестве клеток-хозяев, продуцирующих рибофлавин, особенно предпочтительны бактерии *B. subtilis*. Наиболее предпочтителен штамм *B. subtilis* RB50::[pRF69]_n, у которого имеется множество (n) копий (например, от около 5 до около 20 копий) плазмиды pRF69, кодирующей *rib*-оперон, модифицированный сильным промотором *Pspo15* для усиления транскрипции генов *rib* (см., например, Европейский патент № 405370 и работу Perkins et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 22:8-18, 1999, где описывается конструирование штамма и условия культивирования для продуцирования рибофлавина).

Термин «экспрессия» в настоящем документе включает любой этап образования полипептида, в том числе (не ограничиваясь перечисленным здесь) транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

Термины «идентичность/степень идентичности последовательностей» и «гомология/степень гомологии последовательностей» в настоящем документе

употребляются взаимозаменяемо. Для того, чтобы определить степень идентичности (в процентах) двух аминокислотных или нуклеотидных последовательностей, сравниваемые последовательности выравнивают для оптимального сравнения. Для достижения оптимального выравнивания в любую из двух сравниваемых последовательностей можно вносить пропуски. Такое выравнивание можно делать по всей длине сравниваемых последовательностей. Или же выравнивание проводят частично, то есть берут отрезки последовательностей, например длиной более около 20, около 50, около 100 или больше нуклеотидов или аминокислотных остатков. Степень идентичности двух аминокислотных или нуклеотидных последовательностей в процентах определяют с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Этот алгоритм пригоден как для аминокислотных, так и для нуклеотидных последовательностей. Алгоритм Нидлмана-Вунша используется в компьютерной программе NEEDLE. Для целей данного изобретения использовали программу NEEDLE из пакета программ EMBOSS (версия 2.8.0 или более поздняя, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. *Trends in Genetics* 16, (6) pp276—277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белков использовали матрицу замен EBLOSUM62, для полинуклеотидов – EDNAFULL. Оптимальные параметры: штраф за внесение пропуска 10, штраф за удлинение пропуска 0,5. Специалистам в данной области техники ясно, что при различных параметрах получаются несколько различающиеся результаты, но на общую степень идентичности (в процентах) двух последовательностей использование различных алгоритмов влияет мало. После выравнивания с помощью программы NEEDLE, как описано выше, степень идентичности в процентах между искомой последовательностью и последовательностью по данному изобретению рассчитывают следующим образом: количество соответственных положений в выравнивании, в которых аминокислотные остатки или нуклеотиды одинаковы в обеих сравниваемых последовательностях, нужно разделить на суммарную длину выравнивания за вычетом суммарного количества пропусков. Степень идентичности последовательностей по этому определению получают в программе NEEDLE по опции NOBRIEF; в выходной информации этой программы она отмечена надписью «longest-identity» (наиболее протяженная идентичность).

Нуклеотидные последовательности и аминокислотные последовательности белков по данному изобретению можно далее использовать как искомые последовательности для поиска в общедоступных базах данных, например, с целью выявить других членов того же семейства белков или родственные последовательности. Такой поиск осуществляют с

помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) согласно работе Altschul S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403—10. Поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных полинуклеотидам по данному изобретению, с помощью BLAST осуществляют, используя программу NBLAST при следующих параметрах: вес = 100, длина слова = 12. Поиск аминокислотных последовательностей, гомологичных полипептидам по данному изобретению, с помощью BLAST осуществляют, используя программу XBLAST при следующих параметрах: вес = 50, длина слова = 3. Для выравнивания с делециями в целях сравнения последовательностей используют программу Gapped BLAST, как описано в работе Altschul S.F. et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно брать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. также главную страницу сайта Национального центра биотехнологической информации США по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Термин «синтетическая молекула/вещество» в настоящем документе, относится, например, к синтетическим нуклеиновым кислотам/полинуклеотидам или синтетическим полипептидам/аминокислотным последовательностям, полученным путем химического или ферментативного синтеза *in vitro*. Этот термин включает (не ограничиваясь перечисленным здесь) варианты нуклеиновых кислот/полинуклеотидов, полученные в результате оптимизации кодонов для выбранного организма-хозяина.

Синтетические нуклеиновые кислоты/полинуклеотиды оптимизируют по использованию кодонов предпочтительно согласно способам, описанным в публикациях WO2006077258 и/или WO2008000632, включая оптимизацию пар кодонов. С помощью метода оптимизации пар кодонов, в котором нуклеотидные последовательности, кодирующие данный полипептид, которые были модифицированы относительно своего предпочтения кодонов, в частности пар кодонов, оптимизируют с целью повысить уровень экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей нужный полипептид, и/или усилить продуцирование этого полипептида. Пара кодонов – это два последовательных триплета нуклеотидов (кодона) в кодирующей нуклеотидной последовательности. Как известно специалистам в данной области техники, использование кодонов должно быть приспособлено соответственно тому предпочтению кодонов, которое свойственно данному виду организма-хозяина; в результате возможны варианты, значительно отклоняющиеся от гомологии с последовательностью SEQ ID NO:2, но тем не менее кодирующие полипептид по данному изобретению. В одном из своих воплощений данное изобретение относится к гетерологичным нуклеотидным последовательностям, кодон-оптимизированным для экспрессии в подходящих клетках-

хозяевах, продуцирующих рибофлавин. Пример такой кодон-оптимизированной последовательности, пригодной для экспрессии в *Bacillus subtilis*, представлен последовательностью SEQ ID NO:4.

В настоящем документе термины «вариант» и «мутант» употребляются взаимозаменяемо. Они относятся как к полипептидам, так и к полинуклеотидам. Варианты включают последовательности с заменами, вставками, делециями, укорочениями, перестановками и/или инверсиями в одном или более положениях по сравнению с референсной/исходной последовательностью. Варианты получают путем, например, сайт-насыщающего мутагенеза, сканирующего мутагенеза, инсерционного мутагенеза, неспецифического (случайного) мутагенеза, сайт-направленного мутагенеза и направленной эволюции, а также путем различных других подходов с использованием методов рекомбинантных ДНК, известных специалистам в данной области техники. Также варианты генов/полинуклеотидов можно синтезировать искусственно методами, известными в данной области техники.

В настоящем документе термины «удельная активность» или «активность» применительно к ферментам означают каталитическую активность, то есть способность катализировать превращение определенного субстрата в определенный продукт. Удельная активность – это количество превращенного субстрата и/или образовавшегося продукта в данный промежуток времени в расчете на определенное количество белка при определенной температуре. Как правило, удельную активность выражают в микромолях превращенного субстрата или образовавшегося продукта за одну минут в расчете на один миллиграмм белка. Обычно мкмоль/мин сокращенно обозначают МЕ или Ед. Таким образом, единица удельной активности фермента обозначается мкмоль/мин/(мг белка) или МЕ/(мг белка), или Ед./(мг белка), которые употребляются в настоящем документе взаимозаменяемо. Фермент является активным, если он проявляет свою каталитическую активность *in vivo*, то есть в клетках-хозяевах, или в системе в присутствии подходящего субстрата. Методы количественного определения ферментативной активности, в частности пиридоксальфосфатазной активности или активности ферментов биосинтеза рибофлавина, указанных в настоящем документе, известны специалистам в данной области техники. Также известны аналитические методы, позволяющие определять свойства нужных ферментов, в том числе методы их выделения и очистки.

Увеличение удельной пиридоксальфосфатазной [ЕС 3.1.3.74] активности измеряется следующим образом: до генетических манипуляций с клетками-хозяевами определяют удельную активность указанного фермента и принимают ее за 100%. После модификаций/мутаций клеток-хозяев, приводящих к появлению активности

гетерологичного фермента, теми же методами измеряют указанную ферментативную активность, то есть активность, превышающую 100%, применяя известный в данной области техники способ, описанный в работе Sarge S. et al., *Chembiochem*. 2015 Nov;16(17):2466.

Ясно, что живые организмы, например микроорганизмы, грибы, водоросли или растения, включают формы, названия которых синонимичны или базионимичны названиям видов с такими же физиологическими свойствами согласно определениям Международного кодекса номенклатуры прокариот или Международного кодекса номенклатуры водорослей, грибов и растений (Мельбурнского кодекса).

В настоящем документе термин «рибофлавин» включает также предшественники рибофлавина, флаavinмоноклеотид (FMN), флаvинадениндинуклеотид (FAD) и их производные. Предшественники и производные рибофлавина, флаvинмоноклеотид и флаvинадениндинуклеотид включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) 2,5-диамино-6-рибозиламино-4(3H)-пиримидинон-5'-фосфат (DRAPP); 5-амино-6-рибозиламино-2,4(1H,3H)-пиримидиндион-5'-фосфат; 2,5-диамино-6-рибитиламино-4(3H)-пиримидинон-5'-фосфат; 5-амино-6-рибитиламино-2,4(1H,3H)-пиримидиндион-5'-фосфат; 5-амино-6-рибитиламино-2,4(1H,3H)-пиримидиндион; 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин (DMRL) и флаvопротеины. Производные рибофлавина включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) рибофлавин-5-фосфат и его соли, например рибофлавин-5-фосфат натрия.

В настоящем документе термины «рибофлавин» и «витамин В₂» употребляются взаимозаменяемо. Гены, участвующие в биосинтезе рибофлавина, и способы ферментативного получения рибофлавина, в частности ферментативного получения рибофлавина с использованием представителей рода *Bacillus*, известны – см., например, Европейский патент № 405370 или главу «Витамины» в 7-м издании (2007 г.) Энциклопедии по промышленной химии Ульмана. Эти способы применимы также для получения рибофлавина с использованием модифицированных клеток-хозяев, в частности из рода *Bacillus*, как описано в настоящем документе.

Данное изобретение также относится к способу получения рибофлавина, в котором продуцирующие рибофлавин клетки-хозяева, например указанные в настоящем документе модифицированные клетки-хозяева, инкубируют в водной среде в условиях, в которых возможно образование рибофлавина из данного субстрата. При использовании указанных модифицированных клеток-хозяев в способе получения рибофлавина выход продукта увеличивается по меньшей мере на около 5%, например по меньшей мере около 7, 8, 10,

15, 20, 30, 40, 50% или более по сравнению с продуцированием рибофлавина не модифицированными клетками-хозяевами.

В способе получения рибофлавина по данному изобретению в качестве источника углерода можно использовать ряд субстратов. Особенно подходящие источники углерода выбирают из веществ, содержащих 3, 5 или 6 атомов углерода, например, D-глюкозы, глицерина, сиропа, декстрозы, крахмала, сахарозы или рибозы. Предпочтительным источником углерода является D-глюкоза. В настоящем документе термины «источник углерода», «субстрат» и «субстрат для продуцирования» применительно к вышеуказанному способу употребляются взаимозаменяемо.

По данному изобретению средой для указанного способа с использованием модифицированных клеток-хозяев может быть любая среда, пригодная для продуцирования рибофлавина. Как правило, эта среда является водной, содержит, например, соли, один или более субстратов и имеет определенный pH. Среда, в которой субстрат превращается в рибофлавин называется также средой для продуцирования. Пример среды, пригодной для продуцирования рибофлавина, описан в публикации WO2004113510 (среда VF); эта среда особенно подходит для *Bacillus* и может использоваться для целей данного изобретения.

В настоящем документе ферментацией, или продуцированием, или ферментативным получением называется применение размножающихся клеток с использованием сред, условий и манипуляций, известных специалистам в данной области техники, или применение не размножающихся (так называемых покоящихся) клеток после того как их культивировали с использованием сред, условий и манипуляций, известных специалистам в данной области техники, в условиях, подходящих для превращения соответствующих субстратов в рибофлавин.

Продуцируемые клетками рибофлавин выделяют любыми подходящими для этого методами. Выделение означает, что образовавшийся рибофлавин отделяют от среды для продуцирования. При необходимости образовавшийся продукт ферментации может быть подвергнут дальнейшей обработке, например, очистке.

Один из аспектов данного изобретения касается того этапа предлагаемого способа с использованием описанных в настоящем документе модифицированных клеток-хозяев, продуцирующих рибофлавин, который состоит в выращивании этих клеток в водной среде, а именно в культуральной среде, содержащей необходимые для этих клеток питательные вещества для нормального роста и размножения в аэробных условиях. Выращивание указанных клеток может осуществляться, например, в периодической культуре, в периодической культуре с подпиткой, в непрерывной или полу-непрерывной

культуре, причем предпочтителен периодический режим с подпиткой или непрерывное культивирование. В подробностях методы ферментации известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Европейском патенте № 405370.

Продолжительность периода культивирования в способе по данному изобретению может варьировать в зависимости, например, от специфики клеток-хозяев, от pH, температуры и состава культуральной среды; продолжительность этого периода составляет от около 10 часов до около 10 суток, предпочтительно от около 4 суток до около 7 суток, более предпочтительно от около 2 суток до около 6 суток, в зависимости от используемого микроорганизма. Оптимальные условия культивирования пригодных по данному изобретению микроорганизмов должны быть известны специалистам в данной области техники.

Культивирование по данному изобретению проводится при pH, например, около 7,0; предпочтительно в диапазоне от около 6 до около 8, более предпочтительно от около 6,5 до 7,5. Для культивирования по данному изобретению подходит температура, например, от около 13°C до около 70°C, предпочтительно от около 30°C до около 39°C, более предпочтительно от около 35°C до около 39°C, наиболее предпочтительно от около 36°C до около 39°C. Культуральная среда для размножения указанных клеток, как правило, содержит такие питательные вещества, как ассимилируемый источник углерода, например D-глюкозу, глицерин, сироп, декстрозу, крахмал, сахарозу или рибозу; усвояемый источник азота, например, такие органические субстанции, как пептон, дрожжевой экстракт и аминокислоты. Эта среда содержит или не содержит мочевины, и/или кукурузный сироп, и/или дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*). В качестве источника азота можно использовать также различные неорганические вещества, например нитраты и соли аммония. Также указанная культуральная среда обычно содержит неорганические соли, например сульфат магния, сульфат марганца, фосфат калия и карбонат кальция. Клетки, полученные описанным выше образом, далее инкубируют практически в том же режиме и при тех же pH и температуре, которые указаны выше, в присутствии описанных выше субстратов, которые таким образом превращаются в желаемый продукт ферментации. Инкубация проходит в среде, богатой азотом, а именно содержащей, например, органические источники азота, например пептон, дрожжевой экстракт, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, мочевины, аминокислоты и кукурузный сироп, или неорганические источники азота, например нитраты и соли аммония; в этих условиях культивируемые клетки будут продолжать размножаться, продуцируя желаемый продукт ферментации. Или же инкубацию проводят в среде, бедной азотом, и тогда клетки в

основном не смогут размножаться, а будут в состоянии покоя или биотрансформации (метаболизма). В любом случае среда для инкубации содержит неорганические соли, например сульфат магния, сульфат марганца, фосфат калия и хлорид кальция. Специалистам в данной области техники должно быть известно, какие условия требуются в зависимости от клеток-хозяев.

Принятый в данной области техники термин «продукция» или «продуктивность» в контексте данного изобретения относится к концентрации рибофлавина, образовавшегося за данный промежуток времени в данном ферментационном объеме (например, килограмм продукта/час/литр). Термин «эффективность» включает величину промежутка времени, необходимого для достижения определенного уровня продуцирования (например, сколько времени требуется клеткам для достижения определенных темпов образования продукта ферментации). Термин «выход» в данной области техники включает эффективность превращения источника углерода в продукт (то есть в рибофлавин); обычно он выражается в килограммах продукта на 1 килограмм источника углерода. Выражение «увеличение выхода и/или продукции» данного вещества означает, что увеличилось количество выделенных молекул или нужных выделенных молекул данного вещества в данном количестве культуры за данный промежуток времени.

Аналитические методы для определения выхода/продукции рибофлавина известны в данной области техники. Эти методы включают (не ограничиваясь указанным здесь) высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC) или использование индикаторных штаммов (см., например, Bretzel et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22, 19-26, 1999).

Иллюстрации

Фигура 1. Схема генеалогии штаммов *Bacillus subtilis*.

Фигура 2. Выход рибофлавина в процентах (по оси ординат) при наличии гена *pdxP* (BS9646 или BS8638) или в отсутствие этого гена (BS9645 или BS4905) (Подробнее см. Пример 4, таблица 3.)

Нижеследующие примеры носят чисто иллюстративный характер и никоим образом не ограничивают объем данного изобретения. Содержание всех литературных материалов, патентных заявок, патентов и публикаций, на которые имеются ссылки в настоящем документе, в частности Европейских патентов №№ 405370 и 1186664, патента США № 5837528, публикаций WO2007051552, WO2006077258, WO2008000632, WO2017036903, WO2010052319 и WO2004113510 включаются в настоящий документ путем отсылки.

Примеры

Пример 1. Основные методы, штаммы и плазмиды

Все используемые в приведенных ниже примерах среды и методы, за исключением особо оговоренных, описаны в публикации WO2017036903. Генотипы использовавшихся штаммов *Bacillus subtilis* приведены в таблице 1.

Для выделения плазмидной ДНК *B. subtilis* использовали набор QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) согласно инструкциям производителя. Клетки собирали путем центрифугирования из 10 мл культуры со средой VY, содержащей ампициллин (конечная концентрация 100 мкг/мл) и инкубировали при температуре 37°C при перемешивании со скоростью 250 об/мин до оптической плотности на длине волны 600 нм (OD_{600nm}) ~0,8-1,2. Буферный раствор для лизиса содержал лизоцим (конечная концентрация 1 мг/мл); им разрушали клеточные стенки *B. subtilis* в течение 10 мин при температуре 37°C.

Для амплификации ДНК путем полимеразной цепной реакции (PCR) брали 0,1 мкг хромосомной ДНК *Sinorhizobium meliloti* или *B. subtilis*; объем реакционной смеси составлял 50 мкл; в нем содержалось 25 мкл смеси 2X Phusion high-fidelity PCR master mix (New England Biolabs) и 1 мкл соответствующих праймеров (см. таблицу 2). Условия PCR: 29 циклов из трех последовательных этапов: (i) этап денатурации при температуре 95°C в течение 30 секунд; (ii) этап отжига при температуре 55°C в течение 30 секунд; (iii) этап элонгации при температуре 72°C в течение 1 минуты на 1 килобаз. Циклам PCR предшествовал этап денатурации при температуре 95°C в течение 2 минут.

Для трансдукции *B. subtilis* лизатом бактериофага SPP1 получали донорный лизат путем внесения единичной колонии донорного штамма в 3 мл среды VY. Культивировали в роллерном инкубаторе в течение ночи при температуре 37°C. На следующий день смешивали 100 мкл предварительной культуры со 100 мкл свежей среды VY и 30 мкл лизата бактериофага SPP1. Инкубировали на водяной бане в течение 15 минут при температуре 37°C, после чего прибавляли 4 мл свежей среды V, содержащей CaCl₂ (конечная концентрация 5 мМ). Инфицированную культуру держали в роллерном инкубаторе в течение 4 часов при температуре 37°C. Лизированную культуру центрифугировали, супернатант стерилизовали путем фильтрации. Полученный донорный лизат хранили при температуре +4°C для дальнейшего использования. Для получения реципиентного штамма вносили единичную колонию донорного штамма в 3 мл среды VY и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C в роллерном инкубаторе. На следующий день вносили 500 мкл предварительной культуры в 10 мл свежей среды VY и инкубировали при температуре 37°C и перемешивании со скоростью 250 об/мин до оптической плотности на длине волны 600 нм (OD_{600nm}) ~0,8-1,2. Затем 900 мкл

полученной культуры инфицировали 10 мкл или 100 мкл донорного лизата. Прибавляли 9 мл свежей среды VY, содержащей $MgSO_4$ (конечная концентрация 10 мМ). Инкубировали на водяной бане в течение 30 минут при температуре 37°C, после чего собирали клетки путем центрифугирования со скоростью 3500 об/мин в течение 10 минут. Клетки суспендировали в 150 мкл среды 1X SSЮ, высевали на селективную агаровую среду и инкубировали при температуре 37°C в течение 1 суток.

Определение продуцирования рибофлавина проводили в титровальных микропланшетах с глубокими лунками следующим образом. Вносили единичную колонию в 3 мл среды VY, содержащей, где нужно, селективные антибиотики, и выращивали культуру в течение ночи. Эту предварительную культуру инкубировали при температуре 39°C, перемешивании со скоростью 550 об/мин и влажности 80%. На следующий день предварительную культуру с исходной оптической плотностью на длине волны 600 нм (OD_{600nm}) $\sim 0,05$ вносили в 3 мл среды RS. Культуры вносили в лунки указанных планшетов, повторяя каждый вариант три раза. Планшеты закрывали крышками, пропускающими воздух, и инкубировали при температуре 39°C, перемешивании со скоростью 550 об/мин и влажности 80% в течение 48 часов. Из полученной культуры брали 250 мкл, прибавляли 20 мкл раствора NaOH (4 М) и перемешивали со скоростью 300 об/мин в течение 1 мин, чтобы кристаллы рибофлавина растворились. Прибавляли 230 мкл буферного раствора фосфата калия (1 М; pH 6,8) и перемешивали со скоростью 300 об/мин в течение 1 мин. Определяли рибофлавин путем высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на хроматографе Agilent 1100 с насосом для четырехкомпонентных смесей, автоматическим дозатором, ультрафиолетовым и флуоресцентным детекторами. Использовали колонку Supelcosil LC-8 DB (150 мм x 4,6 мм x 5 мкм). Оптимальная температура колонки была 20°C. Подвижная фаза: градиент от 100% 0,1М уксусной кислоты до 50/50 0,1М уксусная кислота/метанол за 15 мин при общем времени прогона 33 мин; скорость потока 1,0 мл/мин; объем вводимой пробы 5 мкл. Регистрировали показания ультрафиолетового детектора и использовали их для определения аналита. Калибровку делали в диапазоне концентраций 0,1-500 мкг/мл. Кроме того, определяли накопление глюкозы в культуральной среде путем HPLC на хроматографе Waters с насосом для двухкомпонентных смесей, автоматическим дозатором, ультрафиолетовым и рефрактометрическим детекторами. Использовали колонку CAPCELL PAK NH2 UG80 (4,6 мм x 250 мм, 5 мкм; Shiseido). Оптимальная температура колонки была 40°C. Подвижная фаза: смесь ацетонитрил/деионизованная вода в соотношении 65:35; скорость потока 1,0 мл/мин; объем вводимой пробы 5 мкл или

10 мкл. Регистрировали показания рефрактометрического детектора и использовали их для определения аналита. Калибровку делали в диапазоне концентраций 0,3-3 мг/мл.

Таблица 1. Штаммы *Bacillus subtilis*

Штамм	Генотип	Источник сведений
BS168-SP1	CIP106309 Trp+	WO2017036903
BS9645	CIP106309 Trp+ pВНА12 «шаттл» <i>E. coli/B. subtilis</i> бифункциональный вектор	Данный патент
BS9646	CIP106309 Trp+ pBV213L (P _{amyQ} _pdxP)	Данный патент
BS9502	CIP106309 Trp+ amyE::Pveg_pdxP*	Данный патент
BS4905	CIP106309 Trp+ Pspo15_triple ribO_del mro175rib ribC820	WO2017036903
BS8638	CIP106309 Trp+ Pspo15_triple ribO_del mro175rib ribC820 amyE::Pveg_pdxP*	Данный патент

Пример 2. Клонирование гена *pdxP Sinorhizobium meliloti* в реплицирующемся векторе и введение в клетки-хозяева *Bacillus subtilis*

Ген *pdxP* из штамма IFO14782 *S. meliloti* (SEQ ID NO:1) амплифицировали путем полимеразной цепной реакции, используя праймеры P1 (SEQ ID NO:5) и P2 (SEQ ID NO:6). Эти олигонуклеотиды содержат сайты рестрикции BamHI (GGATTC) и NheI (GCTAGC) соответственно. Полученный фрагмент длиной 0,8 килобаз очищали путем электрофореза в агарозном геле и выделяли из этого геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Очищенный продукт полимеразной цепной реакции клонировали по сайтам BamHI и NheI в полилинкере бифункционального («шаттл») вектора pВНА12 *E. coli/B.subtilis*, описанного в публикации WO2008000632. Этот вектор обеспечивает экспрессию гена *pdxP* под контролем промотора, происходящего из гена *amyQ Bacillus amyloliquefaciens*. В процессе клонирования и трансформации *B. subtilis* промежуточным хозяином служили *E. coli*. Сначала продуктами лигирования трансформировали химически компетентные клетки TOP10 *E. coli* (Invitrogen). Выделяли несколько колоний *E. coli*? устойчивых к ампициллину, и выделяли рекомбинантную плазмиду pBV213L (см. фиг. 1), используя набор QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Штамм *Bacillus subtilis* BS168-SP1 является прототрофным по триптофану штаммом, производным от штамма 168 Marburg (Germany), полученным путем замены гена с мутацией *trpC2* не мутантным геном *trpC* из штамма *B. subtilis* ATCC 6051. Конструирование BS168-SP1 подробно описано в публикации WO2017036903. Штамм BS168-SP1 является интактным в

отношении усиленного продуцирования рибофлавина. На следующем этапе трансформировали компетентные клетки штамма BS168-SP1 10 мкл плазмиды pBHA12 (WO2008000632) или 10 мкл плазмиды pBV213L; отбирали клоны, устойчивые к канамицину (конечная концентрация 10 мкг/мл.), используя чашки с основой из кровяного агара и триптозы (ТВАВ). Полученные в результате штаммы BS9645 и BS9646 содержали соответственно пустой вектор pBHA12 (BS9645) либо рекомбинантный вектор pBV213L с геном *pdxP* *S. meliloti* (BS9646). Нуклеотидные последовательности, в которых показан стартовый кодон кодирующих последовательностей, представлены в таблице 2 (SEQ ID NO даны по списку последовательностей, который прилагается к настоящему документу).

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности гена *pdxP*, выделенного из *S. Meliloti*, и гена *pdxP*, кодон-оптимизированного для экспрессии в *B. subtilis* (*pdxP**). Стартовый кодон кодирующих последовательностей подчеркнут. (Подробнее см. текст и список последовательностей.)

Ген	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	SEQ ID NO:
pdxP	<u>ATGGCCAATCGGGTCGCAGGTGAACAAACCGT</u> TTTTGCTTC GCAAGCCGGCCGTGTCATAAACCCGCCCATGAAGAAGCT CGACCGCATGCCGACCCACGCCGAATTCGCCCATGTCACC GACTGGGTCTTCGACCTCGACAACACGCTCTATCCGCATC ACGTCAATCTGTTCTCACAGATCGACCGCAACATGACGGC СТАТГТТGCCGAАCTCCTGTCGCTGGAGCCTGCGGAGGCG AAGAAGCTGCAGAAGGAATACTACCGCGACCACGGCACC ACGCTTCAGGGCCTGATGCTTCATCACGGCATCGATCCCA ATGATTTCTCGAAAGAGCCCACGCCATCGACTATAGCGT GGTGCCGGCCGATCCGGCGCTCGGCGAGGCGATCAAGGC GCTGCCCGGACGCAAGTTCATCTTCACCAACGGCAGCGTC GCCCATGCGGAGATGACCGCGCGGGCGCTCGGCATTCTC GAGCATTTCAACGACATCTTCGACATCGTCGCCGCCGGCT TCATACCGAAGCCCGCCGGCGACACCTACGACAAGTTCA TGGGCCTTCACCGCATCGACACGGCGAATGCGGTGATGTT CGAGGATCTGCCGCGCAACCTGGTCGTCCCTAAGGCGCTC GGCATGAAGACGGTGCTGCTCGTGCCGCGCAATCTCGAA TACGAGTTCGCCGAGGCCTGGGAAACGTCGAGCGACGCG GACGATCAGATCGACTACGTCACGGAAGACCTGGCGGGT TTCCTGCGCAGTGTGATTGTTAA	1
Pveg; spoVG RBS	TTAAATTTTATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTTGTACAAT AAATGTTACTAGAGAAAGGTGGTGAАCTACTATG	3

pdxP*	<p>ATGGCTAATCGTGTGGCGGGTGAACAGACGGTGCTGCTG CGGAAAGCGGGTTCGGGTGATCAATCCTCCTATGAAAAA CTGGACAGAATGCCGACACATGCTGAATTTGCCCATGTTA CAGATTGGGTGTTTGGATCTGGATAACACACTGTATCCGCA TCATGTCAACTTATTTTCTCAAATCGATAGAAACATGACA GCATACGTTGCGGAACTGCTTTCATTAGAACCGGCTGAAG CCAAAAAAGTGCAAAAAGAATACTACAGAGATCATGGCA CAACACTGCAGGGACTTATGTTACATCATGGAATTGATCC GAACGATTTTCTTGAACGCGCACATGCGATCGATTATTCT GTGGTGCCTGCTGATCCGGCACTGGGAGAAGCAATTA GCGCTTCCGGGAAGAAAATTTATCTTTACAAACGGCTCTG TGGCTCATGCCGAAATGACAGCACGCGCGCTGGGCATTCT TGAACATTTAAACGATATCTTTGATATCGTTCGCAGCGGGC TTTATCCCGAAACCGGCAGGAGATACATACGATAAATTTA TGGGACTTCATAGAATCGATACAGCTAACGCCGTTATGTT TGAAGATCTTCCGCGCAATTTAGTCGTTCCGAAAGCTCTT GGCATGAAAACAGTGTACTGGTCCC GCGCAATTTAGAAT ATGAATTTGCAGAAGCGTGGGAAACATCAAGCGATGCCG ACGACCAGATTGACTACGTTACGGAAGACTTGGCAGGCT TTTTACGGAGCGTGATTGTTAA</p>	4
-------	---	---

Пример 3. Встраивание гена *pdxP* *S. meliloti* в хромосому клеток-хозяев *B. subtilis*,
продуцирующих рибофлавин

Кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность гена *pdxP* (SEQ ID NO:4), кодирующую тот же белок, что и природная последовательность, вставили в локус *amyE* хромосомы реципиентного штамма BS168-SP1. Чтобы получить фрагмент ДНК, несущий ген *pdxP**, фланкированный нуклеотидными последовательностями *amyE*-5' и *amyE*-3', применяли PCR с перекрывающимися праймерами (продлением перекрывания; SOE-PCR), что обеспечивало стабильную вставку в хромосому BS168-SP1 путем двойного кроссинговера. Также между фланкирующей последовательностью *amyE*-3' и геном *pdxP** вставляли (в ориентации, противоположной *pdxP**) генетический модуль, содержащий ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (E.C 2.3.1.28) придающий устойчивость к антибиотике хлорамфениколу. Вначале амплифицировали по отдельности путем PCR (i) участок ДНК длиной 1,9 килобаз, содержащий фланкирующую последовательность *amyE*-3' и кассету, обеспечивающую устойчивость к хлорамфениколу, из плазмиды pDG1662 (коллекция Bacillus Genetic Stock Center, Университет штата Огайо, США; база данных GenBank U46197); при этом использовали пару праймеров P3 (SEQ ID NO:7) и P4 (SEQ ID NO:8); (ii) участок ДНК длиной 0,9 килобаз, содержащий ген *pdxP**; при этом использовали пару праймеров P5 (SEQ ID NO:9) и P6 (SEQ ID NO:10). Кодированную последовательность гена *pdxP** *S. meliloti* IFO14782 (SEQ ID NO:4), экспрессия которой регулируется промотором гена *veg* *B. Subtilis* и сайтом связывания рибосомы (RBS) гена *spoVG* *B. subtilis* (SEQ ID NO:3) была получена синтетически и клонирована в векторе

pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) в компании Genscript (Пискатауэй, шт. Нью-Джерси, США). Этот рекомбинантный вектор использовали в качестве матрицы для PCR; (iii) участок ДНК длиной 0,5 килобаз, содержащий фланкирующую последовательность *amyE*-5' из плазмиды pDG1662; при этом использовали пару праймеров P7 (SEQ ID NO:11) и P8 (SEQ ID NO:12). Полученные три PCR-продукта разделяли путем электрофореза в агарозном геле и выделяли из геля, используя набор QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Благодаря перекрытию этих участков ДНК их объединили во фрагмент длиной 3,2 килобаз, используя праймеры P3 и P8. Полученный в результате SOE-PCR продукт очищали путем электрофореза в агарозном геле и выделяли из геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Выделенной ДНК в количестве 1 мкг трансформировали компетентные клетки *B. subtilis* BS168-SP1. На чашках с ТВАВ, содержащей хлорамфеникол (5 мкг/мл), отбирали колонии, устойчивые к хлорамфениколу (CmR). Включение *pdxP** в хромосомный ген α -амилазы *amyE* клеток BS168-SP1 подтверждали методом гидролиза крахмала с окрашиванием йодом. Нужный генотип полученного штамма BS9502 подтверждали с помощью PCR. Затем встраивали ген *pdxP** в хромосомный локус *amyE* штамма *B. subtilis* BS4905, продуцирующего рибофлавин (описан в публикации WO2017036903), используя бактериофаг SPP1, как описано выше, и лизат BS9502 для трансдукции штамма *B. subtilis* BS4905. На чашках с ТВАВ, содержащей хлорамфеникол (5 мкг/мл) отбирали колонии, устойчивые к хлорамфениколу (CmR). Включение *pdxP** в хромосомный ген α -амилазы *amyE* клеток BS168-SP1 подтверждали методом гидролиза крахмала с окрашиванием йодом. Нужный генотип полученного штамма BS9638 подтверждали с помощью PCR.

Пример 4. Определение продуцирования рибофлавина в присутствии и в
отсутствии гена *pdxP*

Уровень экспрессии гена *pdxP* повышен в штаммах BS9646 (реплицирующийся вектор; см. Пример 2) и BS8638 (встраивание в хромосомную ДНК; см. Пример 3). Продуцирование рибофлавина определяли в культуре на среде RS в титровальных микропланшетах с глубокими лунками, как описано выше. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Продукция рибофлавина различными штаммами *B. subtilis*, имеющими разные генотипы. Генотипы штаммов BS9645 и BS9646 отличаются друг от друга вставкой *pdxP*, так же, как и штаммы BS4905 и BS8638. (Подробнее см. текст.)

Штамм	Генотип	Выход рибофлавина (г/100 г глюкозы)		
BS168-SP1	Дикий тип	<0,003		
BS9645	pBHA12	<0,003		
BS9646	pBV213L (pBHA12 с <i>Pveg pdxP</i>)	0,54		
BS4905	Усиленное продуцирование рибофлавина	6,21		
BS8638	Усиленное продуцирование рибофлавина + <i>Pveg pdxP</i>	7,11		

Выход рибофлавина в случае штамма BS9646 был выше по меньшей мере на 18000% по сравнению с исходным штаммом BS9645 (см. фиг. 2А). Поскольку в культуре штамма BS9645 рибофлавин практически не выявлялся, продуцирование рибофлавина штаммом BS9646 сравнивали с пределом детекции применявшегося метода определения рибофлавина (0,003 г/100 г глюкозы). В случае штаммов с усиленным продуцированием рибофлавина его выход возрастал на 14,5 % по сравнению с исходным штаммом (BS8638 в сравнении с BS4902; см. таблицу 3 и фиг. 2В). Эти результаты показывают, что экспрессия гена *pdxP* положительно влияет на продуцирование рибофлавина как у штаммов *B. subtilis* с продуцированием дикого типа, так и с усиленным продуцированием.

Пример 5. Идентификация и клонирование гомологов гена *pdxP*

Поиск гомологов гена *pdxP* *S. meliloti* выявил несколько таковых у других представителей клубеньковых бактерий (см. таблицу 4).

Таблица 4. Гомология (идентичность, %) аминокислотных последовательностей белка *pdxP* у различных видов клубеньковых бактерий

Вид	Степень идентичности, %
<i>Sinorhizobium meliloti</i> sp.	97-100 %
<i>Sinorhizobium medicae</i>	95 %

<i>Sinorhizobium saheli</i>	91 %
<i>Sinorhizobium americanum</i> sp.	90-91 %
<i>Sinorhizobium fredii</i> sp.	89-90 %
<i>Rhizobium arenae</i>	86 %
<i>Pararhizobium polinicum</i>	84 %
<i>Rhizobium oryzae</i>	78 %
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	74 %

Гомологи клонировали в клетках-хозяевах, продуцирующих рибофлавин, например в *B. subtilis*, как описано выше, и определяли продуцирование рибофлавина, как описано в Примере 4.

У штаммов с усиленным продуцированием рибофлавина при использовании гомологов *pdxP* выход рибофлавина увеличивается на 5-20%, что соответствует данным, приведенным в таблице 3.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, которая содержит гены биосинтеза рибофлавина (*rib*-оперон) и гетерологичный фермент с пиридоксальфосфатазной [ЕС 3.1.3.74] активностью.

2. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, по пункту 1, которая содержит гены биосинтеза рибофлавина из бактерий рода *Bacillus*.

3. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, по пункту 1 или 2, которая содержит полипептид, по меньшей мере на около 70% идентичный последовательности SEQ ID NO:2.

4. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, по пункту 3, в которой экспрессируется полинуклеотид, кодирующий полипептид, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO:2.

5. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, по любому из предыдущих пунктов, гетерологичный фермент которой выбирают из ферментов бактерий, предпочтительно клубеньковых бактерий, более предпочтительно представителей рода *Sinorhizobium*.

6. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, по любому из предыдущих пунктов, в которой активность эндогенного гена *ribC* понижена.

7. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, по любому из предыдущих пунктов, в которой выход рибофлавина повышен по меньшей мере на около 5% от количества данного источника углерода по сравнению с продуцированием рибофлавина клетками-хозяевами, в которых не экспрессируется полинуклеотид, кодирующий полипептид, по меньшей мере на около 70% идентичный последовательности SEQ ID NO:2.

8. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, по любому из предыдущих пунктов, выбираемая из представителей родов *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Lactococcus* или *Streptomyces*, предпочтительно из группы, состоящей из *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus licheniformis*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium difficile*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces coelicolor*, *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium glutamicum*.

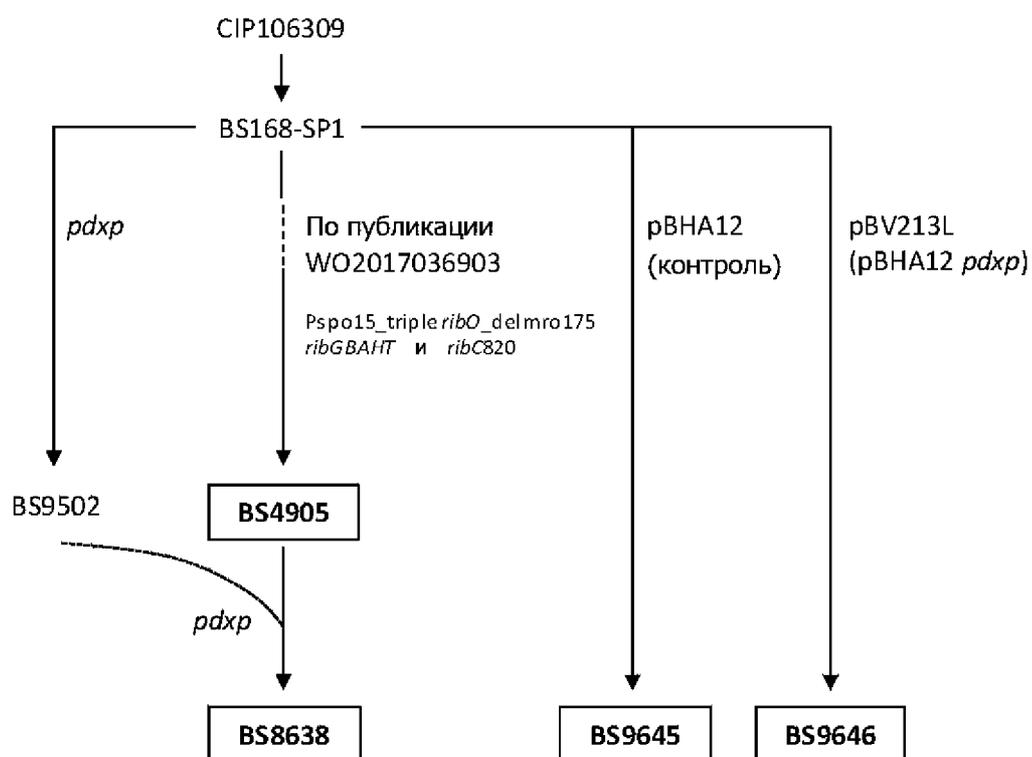
9. Способ получения рибофлавина, в котором клетки-хозяева, продуцирующие рибофлавин, по любому из предыдущих пунктов инкубируют в водной среде в условиях, пригодных для образования рибофлавина из данного субстрата.

10. Способ по пункту 9, в котором выход рибофлавина повышен по меньшей мере на 5% по сравнению со способом, в котором в клетках-хозяевах не экспрессируется полинуклеотид, кодирующий полипептид, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO:2.

11. Способ по пункту 9 или 10, включающий этапы: (a) получение клеток-хозяев, продуцирующих рибофлавин, по любому из пунктов 1-7; (b) инкубирование указанных клеток-хозяев водной среде в условиях, пригодных для образования рибофлавина из данного субстрата; и при необходимости (c) выделение и очистка рибофлавина из культуральной среды..

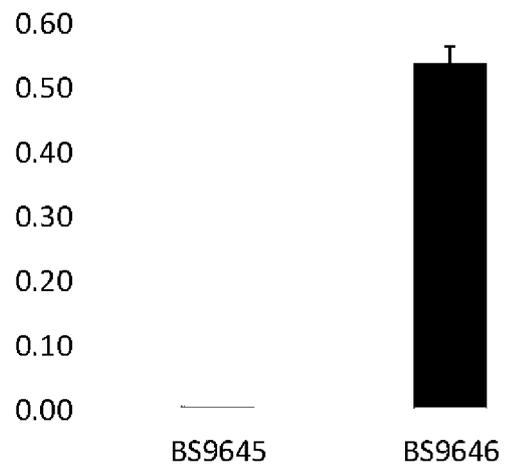
12. Применение полипептида, по меньшей мере на 70% идентичного последовательности SEQ ID NO:2, или клеток-хозяев, продуцирующих рибофлавин, по любому из пунктов 1-8 в способе получения рибофлавина.

13. Клетка-хозяин, продуцирующая рибофлавин, которая содержит гены биосинтеза рибофлавина (*rib*-оперон) и гетерологичный фермент с пиридоксальфосфатазной [EC 3.1.3.74] активностью и используется в способе получения рибофлавина.

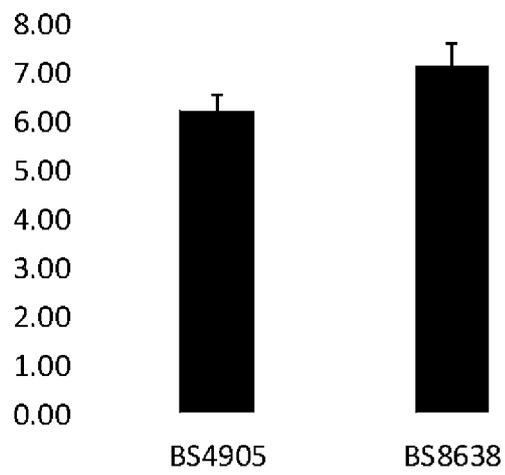


Фиг. 1

A.



B.



ФИГ. 2