

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2220198⁽¹³⁾ **C1**
 (51) МПК⁷ **C12N1/14, C12N9/14**
C12N9/14, C12R1:80
**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ
 Статус: по данным на 08.09.2014 - действует
 Пошлина: учтена за 13 год с 02.07.2014 по 01.07.2015
(21), (22) Заявка: **2002117544/13, 01.07.2002**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.07.2002(45) Опубликовано: **27.12.2003**
 (56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: **SU 9988502, 23.02.1983. SU 1161550 A,**
15.06.1985. SU 1392902 A1, 01.09.1986. ЗЕРНОВ Ю.П.
и др. Выделение и характеристика эндонуклеазы I
из *Proteus vulgaris* 84. Биотехнология, 2002, № 1,
с.15-20. СЕНЧЕНКО В.Н. и др. Получение и
некоторые характеристики функционально-
гомогенного препарата нуклеазы S1 из
а-амилоризина. Молекулярная биология. 1979,
т.13, вып.6, с.1377-1383.

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-т 100-лет Владивостоку,
159, ТИБОХ ДВО РАН

(72) Автор(ы):

Балабанова Л.А.,
Пивкин М.В.,
Гафуров Ю.М.,
Рассказов В.А.

(73) Патентообладатель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения РАН
(54) ШТАММ ГРИБА *PENICILLIUM ESTINOGENUM* A.KOMATSU ET S. ABE EX G. SM. -
ПРОДУЦЕНТ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ P_{est} И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к производству ферментов, и может быть использовано для получения высокоактивной эндонуклеазы P_{est}[EC 3.1.4.21] - одноцепочечной нуклеат-5-олигонуклеотид гидролазы, которую можно использовать в молекулярной биологии при изучении первичной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты и строения рибосомальной, транспортной и вирусной рибонуклеиновой кислоты, в генетической инженерии для получения рекомбинантных молекул и при получении 5'-рибо- и 5'-дезоксирибонуклеотидов из рибонуклеиновой кислоты и дезоксирибонуклеиновой кислоты. Штамм-продуцент выделен из колониальной асцидии, обитающей возле о. Шикотан (Курильские острова), депонирован в коллекции Морских Микроорганизмов ТИ БОХ ДВО РАН под 4628. Способ получения эндонуклеазы предусматривает культивирование штамма-продуцента на питательной среде, экстракцию культуры 2,5 объемами 0,03 М Na-ацетатного буфера pH 3,2, термообработку экстракта при 75°C, отделение твердой части и последующее фракционированное концентрирование белков на хитозановом сорбенте. Очистку сырого ферментного препарата ведут с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-75. 2 с. и 1 з.п. ф-лы, 2 табл.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к производству ферментов, и может быть использовано для получения высокоактивной эндонуклеазы P_{est} [ЕС 3.1.4.21] - одноцепочечной нуклеат-5'-олигонуклеотидгидролазы, которая может найти применение в пищевой промышленности для ферментации продуктов, в молекулярной биологии при изучении первичной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты и строения рибосомальной, транспортной и вирусной рибонуклеиновой кислоты, в генетической инженерии для получения рекомбинантных молекул и при получении 5'-рибо- и 5'-дезоксирибонуклеотидов из рибонуклеиновой кислоты и дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Активными продуцентами нуклеаз являются микроскопические грибы [1]. Из культуры *Aspergillus* sp. , выделенной из зерен пшеницы, получена и использована для ферментации пищевых продуктов гетеросубъединичная нуклеаза с молекулярной массой 125000, имеющая специфичность к одноцепочечной ДНК и РНК [2]. Из наземных микроскопических грибов *Penicillium citrinum* и *Aspergillus oryzae* получены нуклеазы P1 и S1 соответственно [3].

Известен способ получения нуклеазы S1 из амилоризина путем экстракции сухого порошка, прогрева надосадочной жидкости при 70°C, осаждения сульфатом аммония (до насыщения 70-100%), последовательной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, на сульфосефадексе С-50 и хроматографии на сефадексе G-100 [4]. Выход продукта по этому способу не превышает 16%, а удельная активность фермента 450 ед/мг белка, не смотря на то, что для очистки нуклеазы в способе предусмотрена трехкратная хроматография, усложняющая процесс получения фермента.

Известен также способ получения нуклеазы S1, включающий экстрагирование "такадиастазы", осаждение сульфатом аммония (до насыщения 60-90%), диализ, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером рН 7,0, ступенчатое элюирование фермента 0,04 М калием фосфорнокислым однозамещенным и 0,2 М натрием хлористым в 0,01 М фосфатном буфере рН 7,0 и гельхроматографию на сефадексе G-75 [5]. Выход продукта невысок и составляет 3%. Полученный препарат имеет удельную активность 18425 ед/мг белка. Степень его очистки равна 1000. Однако получаемый по этому способу препарат включает примеси рибонуклеаз, фосфодиэстераз, ферментов, расщепляющих нативную ДНК, ухудшающих его качество.

Из всех известных способов наиболее близок к заявляемому способ получения нуклеазы S1 из культуральной жидкости гриба *Aspergillus oryzae*, выращенного на питательной среде, обогащенной сернокислым цинком [6]. Культуральную жидкость с нуклеазной активностью 220 ед/мл подкисляют до рН 5,7 и добавляют сульфат аммония до насыщения 65%, центрифугируют 40 мин при 4500 об/мин, добавляют сульфат аммония до насыщения 95% и оставляют на 20 часов. Раствор центрифугируют при 9000 об/мин в течение 1 часа, осадок растворяют в 0,02 М растворе ацетата аммония, содержащего 0,1 мМ ионов цинка, и диализуют против 0,02 М раствора ацетата аммония, содержащего 0,1 мМ ионов цинка. Наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 0,02 М раствором уксуснокислого аммония, содержащего 0,1 мМ ионов цинка, и элюируют градиентом от 0,02 до 0,5 М раствора аммония уксуснокислого, содержащего 0,1 мМ ионов цинка. Полученная нуклеаза является гомогенным белком с удельной активностью 23300 ед/мг белка и не содержит примесей других ферментов, расщепляющих РНК и нативную ДНК. Выход целевого продукта составляет 23%. Способ-прототип относительно неудобен по своей сложности, длительности и дороговизне сырья.

Получение гомогенных ферментных белков не является основной задачей при поиске и выделении нуклеаз из культуры микроскопических грибов. Прежде всего ставится задача найти и выделить нуклеазу с ценной для практических целей субстратной специфичностью, которая была бы пригодна для использования в качестве специфического реагента. Поэтому при получении ферментного белка, пригодного для использования в качестве специфического реагента, необходим способ, позволяющий освободить данную нуклеазу от примесей ферментов, мешающих ее использованию в качестве специфического реагента. Также ставится задача повысить продуктивность штамма, продуцирующего нуклеазу, и получить препарат с высокой активностью.

Поставленная задача решается выявлением нового штамма гриба, обладающего способностью продуцировать эндонуклеазу *P_{est}*-одноцепочечную нуклеат-5'-олигонуклеотид-гидролазу, и разработкой нового способа получения эндонуклеазы, предусматривающего культивирование продуцента на питательной среде, содержащей источники азота, углерода и минеральные соли, с получением культуры, обогащенной нуклеазной активностью, с последующим выделением целевого продукта, отличающегося тем, что в качестве продуцента используют штамм гриба *Penicillium estinogenum* A. Komatsu et S. Abe ex G. Sm., выделение продукта осуществляют путем экстракции культуры 2,5 объемами 0,03 М Na-ацетатного буфера рН 3,2, термообработки полученного экстракта при 75°C, отделении твердой части, фракционирования и концентрирования белков на хитозановом сорбенте и очистки сырого ферментного препарата с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-75.

Активность эндонуклеазы *P_{est}* определяют по расщеплению poly U. Стандартная инкубационная смесь в объеме 1 мл содержит 23 мМ poly U, 0,03 М ацетат Na, 1 мМ ZnSO₄, 0,5 М NaCl, рН 3,7. После 30 мин инкубации при 37°C реакцию останавливают добавлением 2 мл смеси 0,5 М HClO₄ и 0,1% LaNO₃. За единицу активности эндонуклеазы *P_{est}* принимают прирост оптической плотности в кислоторастворимой фракции на 1 единицу оптической плотности, измеренной при 260 нм.

Удельную активность выражают в единицах активности фермента на 1 мг белка. Концентрацию белка в растворе определяют по методу Бредфорд [7].

Гидрогель хитозана с бифункциональным сшивающим агентом готовят следующим образом: 2,75 г хитозана последовательно обрабатывают 6,0 н. растворами уксусной кислоты, едкого натра, дистиллированной воды до pH 7,0. К 50 мл полученного геля хитозана прибавляют 100 мл 2% раствора глутарового альдегида в 0,05 М натрийфосфатном буфере pH 7,0 и выдерживают при комнатной температуре 30 мин. Затем прибавляют 3,0 г глицина, растворенного в 50 мл 0,05 М натрийфосфатного буфера pH 7,0, и выдерживают при комнатной температуре 30 минут. Полученный сорбент отмывают от продуктов реакции дистиллированной водой и уравнивают [8].

Исследование свойств эндонуклеазы, продуцируемой штаммом *Penicillium estinogenum* A. Komatsu et S. Abe ex G. Sm. и выделяемой согласно изобретению, показало, что фермент имеет молекулярную массу 29 кДа, стабилен в области pH 2,9-8,0, проявляет максимальную активность в 0,03 М Na-ацетатном буфере, pH 3,7 в присутствии 1 mM ZnSO₄, 0,5 М NaCl или 0,3 М KCl. Эндонуклеаза P_{est} термостабильна и не теряет первоначальной активности после 30 мин инкубации при 75°C. Для проявления активности фермент требует присутствия ионов двухвалентных металлов. Ингибированный ЭДТА или цитратом Na фермент реактивируется добавлением в инкубационную смесь эквивалентного количества ZnSO₄. Фермент гидролизует одноцепочечную ДНК и РНК и проявляет предпочтение к poly U. Эндонуклеаза P_{est} успешно использована для получения 5'-моонуклеотидов и в геномной инженерии.

Штамм *Penicillium estinogenum* A. Komatsu et S. Abe ex G. Sm., обладающий способностью продуцировать эндонуклеазу, выделен из колониальной асцидии, собранной возле побережья о.Шикотан (Курильские острова).

Штамму *Penicillium estinogenum* A. Komatsu et S. Abe ex G. Sm. присвоен коллекционный номер KMM 4628 в Коллекции Морских Микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (официальный акроним KMM и номер 644 во Всемирной федерации коллекций культур - WFCC).

Штамм *Penicillium estinogenum* A. Komatsu et S. Abe ex G. Sm. характеризуется следующими свойствами.

Культуральные признаки: Колонии на среде Чапека бархатисто-войлочные, гладкие, однако приподнятые в центре, достигают 5 см в диаметре за две недели роста при температуре 20-25°C, в зоне образования конидий-голубовато-зеленые, с возрастом становятся от темно-зеленых до оливково-коричневых, покрываются паутиновым, воздушным светло-серым мицеллием. Запах плесневый. Иногда образуется экссудат в больших золотисто-желтых каплях. Янтарно-желтый пигмент диффундирует в окружающий агар.

На среде Чапека с дрожжевым экстрактом колонии растут быстрее, достигая 5,7 см в диаметре за две недели роста при температуре 20-25°C, такой же текстуры, как на среде Чапека, но радиально-складчатые, от зеленовато-серых до серо-коричневых в зоне конидиообразования, с белым краем из погруженного мицеллия, достигающим 3 мм ширины. Запах сильный, плесневый. Экссудат образуется обильно в ярко-желтых каплях. Янтарно желтый пигмент диффундирует в окружающий агар. Обратная сторона колоний, сначала янтарно-желтая, становится светло-красно-коричневой.

На среде сусло-агар колонии достигают 4,3 см в диаметре. Они плоские, бархатистые, голубовато-зеленые, с тонким белым растущим краем, порошачие, обильно образуют конидии. Экссудат не образуется. Пигмент в агаре отсутствует. Обратная сторона колоний от охряной в центре до бесцветной на краях колоний.

Морфологические признаки: Конидиеносцы, слегка шероховатые, образуются на субстратном мицеллии, несут мутовку из 4-6 метул, 8-16*2,5-4 мкм. Конидиогенные структуры симметричные. Каждая метула заканчивается мутовкой из 3-8 фиалид (стеригм), достигающих 8-12*2,5-3 мкм. Конидии от шаровидных до широкоовальных, гладкие или слегка шероховатые, до 3,5-4,5 мкм длины, образуются в длинных, параллельных колонках.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Штамм *Penicillium estinogenum* выращивают методом поверхностного культивирования при температуре 22°C в течение 168 ч на питательной среде следующего состава: отруби пшеничные 95%, опилки 5%, влажность среды 55% достигается 5%-ным экстрактом молока лососевых рыб (выварочные воды) на натуральной морской воде. Для получения фермента эндонуклеазы P_{est} культуру, выросшую на среде, экстрагируют 2,5 объемами 0,03 М Na-ацетатного буфера pH 3,2. Далее экстракт с концентрацией белка 1,0 мг/мл и удельной активностью эндонуклеазы 90 ед/мг белка выдерживают при температуре 75°C в течение 15 мин и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин. Осадок отбрасывают, супернатант разводят 0,03 М Na-ацетатным буфером pH 3,2 и пропускают через широкую колонку с 500 мл модифицированного гидрогеля хитозана, уравновешенного 0,03 М Na-ацетатным буфером pH 3,2. Колонку промывают 2,5 объемами 0,5 М NaCl для удаления примесей большинства пигментов, балластных белков, а также фосфатазной и фосфодиэстеразной активностей. Эндонуклеазу P_{est} элюируют с хитозанового сорбента 1 М NaCl, концентрируют ультрафильтрацией на мембране PM-10 (Amersham) до 1 мл и наносят на колонку с сефадексом G-75, уравновешенную 0,03 М Na-ацетатным буфером, содержащим 1 mM ZnSO₄, 0,5 М NaCl, 1% глицерина, pH 4,6. Элюцию фермента проводят тем же буфером со скоростью 13 мл/ч, отбирая фракции по 3 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу P_{est}, объединяют и концентрируют на мембране PM-10 до минимального объема.

Полученный препарат является гомогенным белком при электрофорезе в SDS-полиакриламидном геле и

не содержит примесей идентичных ферментов, расщепляющих РНК и ДНК. В табл.1 приводятся характеристики продукта в процессе очистки (см. в конце описания).

Пример 2. Штамм *Penicillium estinogenum* выращивают методом поверхностного культивирования при температуре 22°C на качалке (180 об/мин) в течение 168 ч на модифицированной среде Огата следующего состава: сахароза 5%, пептон 1%, соевая мука 0,5%, магний сернокислый 0,05%, кальций хлористый 0,01%, калий азотнокислый 0,2%, приготовленной на натуральной морской воде pH 7,8. Для получения фермента эндонуклеазы P_{est} культуральную жидкость освобождают от мицеллия и спор центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Далее культуральную жидкость, содержащую 0,2 мг белка/мл культуральной жидкости и удельную активность эндонуклеазы 250 ед/мг белка, выдерживают при температуре 75°C в течение 15 мин и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин. Осадок отбрасывают, супернатант разводят 0,03 M Na-ацетатным буфером pH 3,2. Далее выделение и очистку фермента осуществляют так же, как и в примере 1.

Полученный препарат является гомогенным белком при электрофорезе в SDS-полиакриламидном геле и не содержит примесей идентичных ферментов, расщепляющих РНК ДНК. В табл.2 приводятся характеристики продукта в процессе очистки (см. в конце описания).

Преимущества изобретения заключаются в том, что для приготовления питательной среды применяются отходы лесной и лесоперерабатывающей промышленности (опилки), отходы мукомольного производства (отруби пшеничные) и выварочные воды, получаемые при переработке молок лососевых рыб, что позволяет исключить использование таких препаратов, как сахароза, пептон, соевая мука, и сократить затраты на производство фермента. При этом утилизируются отходы и решаются экологические проблемы

Кроме того, и что очень важно, использование этой питательной среды позволяет увеличить продуктивность штамма гриба *Penicillium estinogenum* A. Komatsu et S. Abe ex G. Sm. и получить препарат эндонуклеазы с высокой активностью.

За счет использования твердой среды для культивирования штамма-продуцента (поверхностное культивирование) исключается аэрирование, что позволяет до 70% сократить энергетические затраты на производство фермента.

Литература:

1. Безбородова С.И. Нуклеазы микроскопических грибов, в кн.: "Нуклеазы микроорганизмов." под ред. А.М. Безбородова. - М.: Наука, 1974, с.188-295.
2. Ito K; Matsuura Y; Minamiura N Purification and characterization of fungal nuclease composed of heterogenous subunits archives of biochemistry and biophysics 1994, Vol 309, Iss 1, pp 160-167.
3. Maekawa K., Tsunasawa S., Dibo G., Sakiyama F. Primary structure of nuclease P1 from *Penicillium citrinum*. Eur. J. Biochem. 1991, 200: 651-661.
4. Сенченко В.Н., Колбановская Е.Ю. и Бочаров А.Л. Получение и некоторые характеристики функционально-гомогенного препарата нуклеазы 81 из α -амилоризина. "Молекулярная биология", 1979, т.13, 6, с.1377-1383.
5. Ando T. Biochim. et biophys. acta, 1966, 114, 158.
6. Авторское свидетельство 998502, кл. С 12 N 9/22, 1983.
7. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72(2): 248-254.
8. Авторское свидетельство 1811178, кл. С 08 В 37/08, 1989.

Формула изобретения

1. Штамм гриба *Penicillium estinogenum* A. Komatsu et. S. Abe ex G. Sm. KMM 4628 - продуцент эндонуклеазы P_{est} .
2. Способ получения эндонуклеазы P_{est} , предусматривающий культивирование продуцента на питательной среде, содержащей источники азота, углерода и минеральные соли, с получением культуры, обогащенной нуклеазной активностью, с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что в качестве продуцента используют штамм гриба *Penicillium estinogenum* A. Komatsu et. S. Abe ex G. Sm. KMM 4628, а выделение продукта осуществляют путем экстракции культуры 2,5 объемами 0,03 M Na-ацетатного буфера pH 3,2, термообработки экстракта при 75°C, отделения твердой части, фракционированного концентрирования белков на хитозановом сорбенте и очистки сырого ферментного препарата с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-75.
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что питательная среда содержит в качестве источника азота 5%-ный экстракт молок лососевых, в качестве источника углерода - отруби пшеничные и опилки, в качестве источника минеральных солей - натуральную морскую воду.

РИСУНКИ

[Рисунок 1](#), [Рисунок 2](#)