



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118545** (13) **C2**  
(51) МПК**A23L 2/60** (2006.01)**A23K 20/163** (2016.01)**C07H 3/06** (2006.01)**C12P 19/18** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2015 03647</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Перес Крус Енріке Росендо (CU),</b> <b>Ернандес Гарсія Ласаро (CU),</b> <b>Мартінес Гарсія Дуньєскі (CU),</b> <b>Трухільо Толедо Луїс Енріке (CU),</b> <b>Менендес Родрігес Кармен (CU),</b> <b>Собріно Легон Аліна (CU),</b> <b>Рамірес Ібаньєс Рікардо (CU),</b> <b>Фейхоо Коста Гумерсіндо (ES),</b> <b>Лема Родісіо Хуан Мануель (ES)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>18.09.2013</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>СЕНТРО ДЕ ІНХЕНЬЄРІЯ ХЕНЕТИКА І</b> <b>БІОТЕКНОЛОХІЯ,</b> Avenida 31 entre 158 y 190, Playa, La Habana 11600, Cuba (CU)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>11.02.2019</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.</b> <b>№115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>2012-0138</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EP 0663442 A1, 19.07.1995 Lüscher Marcel et al. Cloning and functional analysis of sucrose:sucrose 1- fructosyltransferase from tall fescue / PLANT PHYSIOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US. – 01.11.2000. – vol. 124, № 3. – P. 1217- 1227 Rehm Jochen et al. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from Aspergillus foetidus / JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US. – 01.03.1998. – vol. 180, № 5. – P. 1305-1310 WO 9601904 A1, 02.01.1996 WO 2005051102 A1, 09.06.2005
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>18.09.2012</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>CU</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.08.2015, Бюл.№ 16</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.02.2019, Бюл.№ 3</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>РСТ/CU2013/000005,</b> <b>18.09.2013</b>	

**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ 1-КЕСТОЗИ****(57) Реферат:**

Винахід стосується способу отримання 1-кестози в промисловому масштабі, який включає перетворення сахарози в 1-кестозу в біореакторі з використанням рекомбінантної сахароза:сахароза-1-фруктозилтрансферази (1-SST) з *Festuca arundinacea*, експресованої під контролем конститутивного промотору в несхаролітичних дріжджах, де для отримання в

UA 118545 C2

промисловому масштабі необхідна початкова концентрація сахарози в біореакторі щонайменше 400 г/л; неочищеного ферментного препарату для перетворення сахарози в 1-кестозу та способу отримання сахароза:сахароза-1-фруктозилтрансферази.

## Галузь техніки

Даний винахід стосується харчової і цукрової промисловості, зокрема синтезу фруктоолігосахаридів (ФОС) із цукрової тростини/цукрового буряку або іншої сировини, яка містить сахарозу, такої як мед, патока, рослинні екстракти, сиропи і т. д.

## 5 Рівень техніки

ФОС складаються із лінійних ланцюгів із 1-9 залишками фруктози, зв'язаними із молекулами сахарози за допомогою  $\beta(2\rightarrow1)$  зв'язків (Yun, 1996, Enzyme Microb. Technol. 19:107-117). Значення цих сполук полягає в їх застосуванні як таких, які не засвоюються в організмі людини, і тваринних компонентів їжі, які мають пребіотичний ефект, оскільки вони здійснюють сприятливий вплив на здоров'я виборчим стимулюванням росту або активності однієї або декількох груп корисних мікроорганізмів у товстій кишці. До таких мікроорганізмів належать види родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* (Gibson and Roberfroid., 1995, J. Nutr. 125 (6): 1401-1412). В природних умовах ФОС продукуються рослинами, грибами, бактеріями і деякими дріжджами під дією ферментів, які називаються фруктозилтрансферазами (FTF, EC 2.4.1.9) і  $\beta$ -фруктофуранозидазами (EC 3.2.1.26) (Guio et al., 2009; Recent Patents on Food, Nutrition&Agriculture, 1 (3): 221-30).

У наш час промислове отримання ФОС здійснюється за наступними двома технологіями: часткове розщеплення інулінів (Yun., 1996; Enzyme Microb. Technol. 19:107-117; Franck., 2002; British Journal of Nutrition 87 (2): S287-S291) або ферментативний синтез із сахарози із використанням  $\beta$ -фруктофуранозидази із високою активністю трансфруктозилази або FTF, продукованої в основному грибами (*Aspergillus niger*, *A. japonicus*, *A. oryzae*, *A. aculeatus* and *Aureobasidium pullulans*) (Yun., 1996; Enzyme Microb. Technol. 19:107-117; Vankova et al., 2008; Chemical Papers 62 (4) 375-381). Згідно із обома технологіями отримують суміш ФОС, які мають різний ступінь полімеризації (СП) від 2 до 10, основними компонентами якої є: 1-кестоза ( $GF_2$ ), ністо́за ( $GF_3$ ), фруктозилністо́за ( $GF_4$ ), біфурко́за ( $GF_5$ ), інулобі́оза ( $F_2$ ), інулотрі́оза ( $F_3$ ) і інулотетр́оза ( $F_4$ ). З комерційної точки зору трисахарид 1-кестоза є найціннішим ФОС за рахунок його подвійної функції як природного пребіотика і низькокалорійного підсолоджувача, придатного як заміника цукру для хворих на цукровий діабет (Vega and Zuniga-Hansen., 2011; Bioresource Technology 102 (22), 10180-10186).

Технології і патентні документи, які стосуються отримання ФОС із сахарози, ґрунтуються на використанні клітин і ферментів (вільних або імобілізованих), виділених із різних мікроорганізмів дикого типу, таких як гриби *Aureobasidium pullulans* (Smith і Luenser, 1980, патент США № 4309505), *Aspergillus phoenicis* (Van Dooren і інш., 1988, патент США № 4849356), *Aspergillus niger* (Hidaka і інш., 1988, Agric. Biol. Chem. 1181), *Aspergillus aculeatus* (Fernandez-Arrojo і інш., 2009, міжнародна заявка WO 2010/103150 A1), дріжджі *Rhodotorula* sp. (Aguar de Oliveira і інш., 2007, заявка BRPI0705359 на патент A2-2) і бактерії *Microbacterium laevaniformans* (Hatcher і інш., 1988, патент США № 4927757), *Rahnella aquatilis* (Ohtsuka, K. et al. Biosci. Biotech. BioChem. 56 (9), 1373-1377, 1992), *Zymomonas mobilis* (Hatcher і інш., 1988, патент США № 4797360). Такі виробничі процеси здійснюються в реакторах різного типу, в основному із механічним перемішуванням і із нерухомим шаром, періодичної або безперервної дії. У періодичних процесах накопичення виділеної глюкози може інгібувати реакцію синтезу ФОС. З іншого боку, безперервні процеси, у яких використовуються клітини або ферменти, імобілізовані на різних носіях, дозволяють повторно використовувати біокаталізатор, але вони не можуть здійснюватися при високих швидкостях потоку через внутрішні дифузійні обмеження для субстрату, щоб отримати доступ імобілізованого ферменту. Тривалість реакції необхідно регулювати для запобігання гідролізу синтезованих фруктанів. Період інкубації залежить від вихідного рівня ферментативної активності із розрахунку на грам субстрату, який змінюється протягом від 8 до 24 годин, коли синтезується суміш 1-кестози, ністо́зи і фруктозилністо́зи.

Отримання чистих кристалів 1-кестози або препаратів 1-кестози із чистотою більше 90 % (Tetsuhiro і інш., 1995, патент США № 5463038; Koichiro і інш., 2010, заявка на патент Японії JP2010273580-A) є надзвичайно складним процесом, якщо він починається із найпоширеніших реакційних сумішей, які складаються із 20-25 % глюкози, 10-15 % сахарози, 5 % фруктози і 55-60 % загального об'єму ФОС, і із ФОС, які мають від 40 % до 60 % 1-кестози. Процес може бути економічно недоцільним для його застосування для харчових продуктів. Хроматографічне розділення 1-кестози економічно рентабельне тільки, якщо її вміст становить більше 80 % від загального об'єму фракції ФОС (Nishizawa і інш., 1996, патент США 6479657).

Реакційні суміші, у яких склад ФОС в основному представлений 1-кесто́зою (більше 80 % цукрів у суміші), є рідкими. Високі рівні 1-кестози були синтезовані ферментами FTF із грибів, таких як *Aspergillus aculeatus* (Hang and Woodams, 1995, Biotechnology Letters 17: 295-298) і *Aspergillus japonicus* ATCC 20236, при концентрації сахарози нижче ніж 227 г/л (Mussatto et al.,

2009, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 59: 76-81). В обох посиланнях вміст 1-кестози становив приблизно 71 % від загального об'єму фракції ФОС, присутньої в суміші, але при випробуванні концентрацій сахарози більше 500 г/л процент 1-кестози знижувався до значень близьких або нижчих ніж 60 % (Ghazi et al., 2005, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 35: 19-27).  $\beta$ -фруктофуранозидази із *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Penicillium roqueforti* і *Scopulariopsis brevicaulis* здатні продукувати до 76,7 %, 86,7 % і 91,3 % 1-кестози, відповідно, при концентрації сахарози 500 г/л (Nishizawa і інш., 2002, патент США 6479657 В1). Хоча ці проценти показують, що ферменти із *P. roqueforti* і *S. brevicaulis* є активнішими відносно виходу 1-кестози, ніж ферменти із *A. niger*, ситуація змінюється з точки зору продуктивності і стабільності. Крім того, жоден із цих організмів не визнаний як безпечний (GRAS або QPS; Загальноновизнаний безпечним або Кваліфікована презумпція безпеки) для використання в харчових продуктах (Наукова комісія EFSA по біологічних загрозах, 2009; EFSA Journal 7 (12): 1431; Cuenca-Estrella et al., 2003, Antimicrob Agents Chemother 47 (7): 2339-2341).

Ріст міцеліальних грибів є ще одним істотним виробничим обмеженням при промислових ферментаціях, оскільки їх міцеліальні нитки намотуються на лопаті гвинта і також часто закупорюють вентиляційні отвори ферментера (Ahmad et al., 2010, Bioprocess Eng Biosyst 33, 599-606).

Мutowаний варіант  $\beta$ -фруктофуранозидази *A. niger* був отриманий із використанням генної інженерії білків. Мutowаний ген був експресований в  $\beta$ -фруктофуранозидаза-дефіцитному штамі цього гриба. Фермент каталізував синтез 1-кестози, забезпечуючи її вміст 93,5 % від загального об'єму ФОС при реакції із сахарозою при концентрації 550 г/л (Nakamura і інш., 2010, патент США 7655449).

Однак відсутні технологічно прийнятні системи отримання FTF, які забезпечують можливість отримання таких ферментів у великих кількостях для промислового отримання ФОС (Vega and Zuniga-Hansen, 2011; Bioresource Technology 102 (22): 10180-10186). Культивування грибів і подальша екстракція і/або очищення їх ендогенних FTF є основними обмежуючими факторами. Необхідно дослідити застосування інших природних або рекомбінантних хазяїнів, більш придатних для великомасштабного отримання і виділення окремих FTF ферментів.

За результатами проведених фундаментальних досліджень в основному розкривається механізм синтезу фруктанів в рослинах, в різних документах описано виділення генів, які кодують ферменти FTF, здатні діяти на сахарозу як субстрат. Такі гени були виділені із різних видів, таких як: цикорій звичайний (de Halleux and van Cutsem, 1997, Plant Physiol 113:1003), ячмінь звичайний (H Chstrasser et al., 1998, FEBS Letters 440: 356-360), соняшник бульбоносний (Van der Meer et al., 1998, Plant J. 15:489-500), костриця очеретяна (Luscher et al., 2000, Plant Physiology 124 (3):1217-1227), агава текільна (Avila-Fernandez et al., 2007, Plant Science 173: 478-486), цибуля ріпчаста (Vijn et al., 1998, Plant Physiology 117:1507-1513), пажитниця багаторічна (Lasseur et al., 2009, Journal of Experimental Botany 57 (11):2719-2734) і пшениця м'яка (Schroeven et al., 2008, New Phytologist 180:822-831). Деякі із цих генів були експресовані в *Pichia pastoris* для проведення фундаментальних досліджень, в основному спрямованих на визначення субстратної специфічності, механізму дії ферментів і складу отриманих продуктів в експериментах in vitro, проведених в лабораторних умовах (Altenbach et al., 2004, FEBS Letters 567: 214-218). У всіх вищезгаданих посиланнях був використаний промотор алкогільоксидази I (pAOXI) для індукції експресії трансгена в *P. pastoris*. Вибір цього індукованого метанолом промотору є небажаним для процесів промислового масштабу через дуже велику кількість метанолу, необхідного під час дріжджового бродіння. Метанол є легкозаймистим і високотоксичним, тому його використання заборонене у виробництві харчових продуктів і харчових інгредієнтів. У цих експериментах вивчали тільки здатність ферменту сахароза:сахароза-1-фруктозилтрансферази (1-SST) каталізувати синтез 1-кестози при порівняно низьких концентраціях сахарози у діапазоні від 0,1 до 0,15 M (від 34,2 до 51,3 г/л). Також було встановлено, що даний фермент здатний гідролізувати або додатково полімеризувати 1-кестозу (Luscher et al., 2000; Plant Physiology 124 (3):1217-1227; Avila-Fernandez et al.; 2007 Plant Science 173: 478-486). Дуже низькі виходи ферментів 1-SST, продукованих *Pichia*, були отримані за рахунок проблем, пов'язаних із деградацією і нестабільністю.

До цього часу відсутні повідомлення, які стосуються застосування ферментів рослинного походження, або природних, або рекомбінантних, для отримання 1-кестози із сахарози у промислових масштабах.

У промислових масштабах був використаний тільки сік рослин цикорію звичайного і полімнії гостролистої, який складається із суміші ФОС різної СП, де 1-кестоза не є основним компонентом (Guio et al., 2009, Recent Patents on Food, Nutrition&Agriculture, Vol. 1 No. 3). Такі

фактори, як низький вихід, низький рівень виділення у позаклітинне середовище і деградація під дією протеаз під час його експресії із використанням технології рекомбінантної дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) у поєднанні із нестабільністю ферменту сприяли застосуванню грибів або ферментів FTF, продуктованих із них, в промисловому отриманні ФОС.

5 Застосування конститутивних промоторів для отримання FTF рослинного походження із *Pichia pastoris* не описано. Це найпридатніший варіант для отримання в промислових масштабах рекомбінантних ферментів із застосуванням в харчовій промисловості.

Мембранні біореактори (МБР) широко використовуються для зворотного водопостачання підприємств, очищення стічних вод для невеликих комплексів, обробки промислових відходів, обробки стічних вод звалищ і тому подібного (Judd S., 2008, Trends in Biotechnology 25 (2): 109-116). Тільки в двох повідомленнях приводиться опис безпосереднього застосування МБР для отримання ФОС (Sanchez et al., 2008; Food and bioproducts processing 86, 109-115). У одному із них мембрани використовуються для виділення мікроорганізмів із реакційної суміші, яка містить ФОС, у якій 1-кестоза не є основним продуктом. Аналогічний біореактор використовувався для виділення через нанофільтраційну мембрану виділеної глюкози (яка інгібує синтез ФОС) неімобілізованої  $\beta$ -фруктофуранозидазою *A. niger* ATCC 20611 в серійній реакції, де вихідна концентрація сахарози становила 300 г/л і продукт 1-кестоза доходив до забезпечення 38,7 % від загального об'єму фракції ФОС (Nishizawa et al., 2001; Food Sci Tech res. 7.1 39-44). В цих умовах промислове отримання 1-кестози не є рентабельним. Відсутні документи або патенти, які вказують на застосування МБР для безперервного отримання 1-кестози із сахарози із повторним використанням розчинної фруктозилтрансферази будь-якого походження.

Залишається великий інтерес до розробки способів і технологій для рентабельного отримання 1-кестози в промислових масштабах.

Докладний опис винаходу

25 Даний винахід вирішує вищезгадану проблему розробкою способу отримання 1-кестози із сахарози в промисловому масштабі простою, дешевою, ефективною і промислово масштабованою технологією. Спосіб за винаходом відрізняється перетворенням сахарози в 1-кестозу в біореакторі, де рекомбінантний фермент FTF виділяли із *F. arundinacea* і конститутивно експресували в несахаролітичних дріжджах, які використовуються як рекомбінантний хазяїн.

Спосіб, уперше описаний в даному винаході, комплексно направлений на вирішення основних технологічних обмежень, які існують в процесі отримання ФОС із сахарози, зокрема обмежень, пов'язаних із отриманням 1-кестози. Описаний метод охоплює дві основні стадії способу: 1) отримання ферменту або біокаталізатора і 2) отримання 1-кестози.

35 Для мети даного винаходу промисловий масштаб визначається як масштаб отримання 1-кестози, при якому повний або частковий об'єм отриманого продукту використовується в промисловому масштабі. Для цієї мети можна використовувати сучасне придатне обладнання, яке є на ринку.

40 У контексті даного винаходу несахаролітичні дріжджі визначаються як дріжджі дикого типу або мутовані дріжджі, які не мають ендогенної активності, за допомогою якої гідролізується або полімеризується сахароза. Прикладами таких дріжджів є: метилотрофні дріжджі *P. pastoris*, *Hansenula polymorpha* і мутантний штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* YSH 2.64-1A (Rehm et al., 1998, Journal of Bacteriology 180 (5):1305-1310).

45 У одному варіанті здійснення даного винаходу FTF являє собою сахароза:сахароза-1-фруктозилтрансферазу (1-SST). У винаході 1-SST, отримана технологією рекомбінантної ДНК, називається 1-SSTгес. Для оптимізації стадії отримання ферменту даний винахід починали із відбору і ідентифікації рослинних FTF, типу 1-SST, виділених із костриці очеретяної (*F. arundinacea*), цибулі (*A. сера*) і блакитної агави (*A. tequilana*), відповідно. Такий підхід був відсутній у літературі попереднього рівня, зв'язаний із промисловим отриманням ФОС. Гени, які кодуєть кожний із вказаних ферментів, клонували в експресійну касету для генетичної модифікації дріжджів *P. pastoris*. Незважаючи на можливі виробничі обмеження цих дріжджів для застосування як хазяїна для промислового виробництва, наприклад обмеження відносно вмісту розчиненого кисню в процесі їх росту, ці дріжджі відповідають вимогам відсутності ендогенних ферментів, які мають здатність взаємодіяти із сахарозою або фруктанами, і вони вважаються придатними як хазяїн для біотехнологічних цілей. *P. pastoris* можуть досягати високих виходів біомаси при культивуванні в контрольованих умовах в ферментерах, і відома їх здатність до продукування і секреції гетерологічних білків на високому рівні в культуральне середовище. Дріжджі мають статус GRAS з точки зору вимог по біологічній безпеці в харчовій промисловості. Отже, вищезгаданий спосіб отримання 1-кестози, у якому несахаролітичні дріжджі являють собою штам *P. pastoris*, є частиною даного винаходу.

На першій стадії даного дослідження був успішно використаний промотор алкогольоксидази I (pAOXI) для індукції експресії трансгена 1-SSTrec. Однак використання такого індукованого метанолом промотору не допустимо для процесів промислового масштабу за рахунок дуже великої кількості метанолу, необхідного під час дріжджового бродіння. Метанол також є легкозаймистим і летким. З іншого боку, його використання заборонено у виробництві харчових продуктів і харчових інгредієнтів. Несподівано було встановлено, що експресія гена 1-SST F. arundinacea під транскрипційним контролем промотору гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (pGAP) не викликала токсичність для клітин і забезпечувала отримання великих кількостей біомаси і високих рівнів експресії ферменту, секретованого у позаклітинне середовище, ніж дві інші FTF, тестованих у даному винаході. Це перше повідомлення відносно використання такого конститутивного промотору для експресії рослинного гена FTF.

Три трансформанти *P. pastoris* кожної із вищезгаданих конструкцій оцінювали на отримання біомаси і активність фруктозилтрансферази в періодичних ферментаціях із додаванням субстрату. Після культивування дріжджів в 5-літрових ферментерах протягом 72 годин культуральні бульйони центрифугували і отримували дві фракції: одна фракція інтактних клітин або біомаси і інша фракція культурального супернатанту. Визначали ферментативну активність обох фракцій інкубацією із 0,87 М розчином сахарози (300 г/л) в 0,02 М натрію-ацетатному буфері із рН 5,5 при 30 °C протягом 30 хвилин. У вказаних умовах три трансгенні клони дріжджів, які несуть ген 1-SST F. arundinacea, демонстрували найвищі рівні активності в обох, внутрішньоклітинній і позаклітинній, фракціях, виявляючи вищу активність порівняно із тією, яка спостерігається для інших аналізованих ферментів. Несподівано було встановлено, що 1-SSTrec, виділена із *F. Arundinacea*, була стабільнішою, ніж її гомологи, виділені із цибулі і агави, що забезпечує отримання 1-кестози у великому масштабі.

З метою підвищення виходу 1-SSTrec численні копії експресійної касети 1-SST F. arundinacea вставляли за допомогою подвійної або одиночної гомологічної рекомбінації в геном дріжджового хазяїна, після послідовної серії стадій повторної трансформації і широкого скринінгу клонів на активність FTF. Поступове збільшення дози трансгена здійснювало додатковий вплив на вихід 1-SSTrec без інгібування росту клітин. Відібраний клон, названий CIGB 308, містить не менше дев'яти копій гена, стабільно інтегрованих в геном, що було визначено Саузерн-блотингом із використанням гена, який кодує 1-SST, і 5'-області резидентного локусу AOX1 як гібридизаційних зондів. Встановлені патерни гібридизації забезпечують точну ідентифікацію мультикопійних штамів *P. pastoris*, у тому числі відібраного клону CIGB 308. Отже, спосіб отримання 1-кестози у промисловому масштабі, у якому штам *P. pastoris* містить численні копії гена, який кодує 1-SST, інтегровані в геном, також є об'єктом даного винаходу.

При культивуванні штаму *P. pastoris* CIGB 308 в ферментері отримують фермент 1-SSTrec. При цьому застосовують ферментер із періодичним, безперервним або підживлюваним режимом роботи, із використанням культурального середовища із додаванням дріжджового екстракту, мікроелементів і вітамінів, а також використовуючи як джерело вуглецю гліцерин або глюкозу. Однак переважним є використання сахарози або сировини, яка її містить, оскільки вищі виробничі виходи отримують із вказаним субстратом.

Таким чином, в одному аспекті винаходу FTF, використану в отриманні 1-кестози у промисловому масштабі, отримують із культурального супернатанту і/або клітинного осаду *P. pastoris*. У варіанті здійснення винаходу FTF отримують культивуванням рекомбінантного дріжджового хазяїна у ферментері із використанням періодичного, безперервного або підживлюваного режиму роботи. У конкретному варіанті здійснення джерело вуглецю, яке використовується для дріжджової культури, являє собою сполуку, вибрану із гліцерину, глюкози і сахарози будь-якого ступеня чистоти.

Активність позаклітинної 1-SSTrec, досягнута в даному винаході (~100,0 Од/мл безклітинного культурального супернатанту), переважно є аналогічною середньому рівню, описаному для ферментів пліснявих грибів (Driouch et al., 2010, Appl Microbiol Biotechnol 87:2011-2024), і це набагато вище, ніж значення, описані для FTF іншого походження, експресованої в дріжджах (Trujillo et al., 2002; Affinity 59 (500):365-370; Rehm et al., 1998, Journal of Bacteriology 180 (5):1305-1310). Відносно активності внутрішньоклітинної фракції поєднання високої активності із високою густиною клітин забезпечує виходи біомаси, які перевершують 38000 одиниць на літр культури, що в 6 або 7 разів вище найвищих значень, описаних в літературі для ферментів пліснявих грибів (Dorta et al., 2006; Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 33 (12): 1003-1009).

Незважаючи на вже перераховані обмеження для отримання *P. pastoris*, за допомогою вибору *P. pastoris* як хазяїна для експресії рекомбінантної 1-SSTrec долаються технічні

вищеописані обмеження, які стосуються використання грибів, як природних джерел FTF. З іншого боку, з точки зору вимог біологічної безпеки *P. pastoris* має статус GRAS організму для харчової промисловості.

У одному варіанті здійснення винаходу перетворення сахарози в 1-кестозу в промисловому масштабі проводять із використанням концентрації субстрату більш ніж 400 г/л. В конкретному варіанті здійснення винаходу перетворення сахарози в 1-кестозу здійснюється із використанням вільної або імобілізованої 1-SST.

У іншому аспекті винаходу перетворення сахарози в 1-кестозу проводиться в мембранному, із нерухомим шаром або із механічним перемішуванням біореакторі. У конкретному варіанті здійснення мембранний біореактор працює в безперервному або напівбезперервному режимі.

Крім того, метою даного винаходу є ферментний препарат для промислового перетворення сахарози в 1-кестозу, яка містить 1-SST, виділену із *F. arundinacea*, конститутивно експресовану в несхаролітичних дріжджах.

Для цілей даного винаходу ферментний препарат визначається як рідкий або твердий препарат із ферментативною активністю і який має здатність взаємодіяти із певним субстратом, перетворюючи його в продукт.

У одному варіанті здійснення винаходу сахаролітичні дріжджі, які використовуються для отримання 1-SSTrec, являють собою штам *P. pastoris*. У конкретному варіанті здійснення вказаний штам *P. pastoris* містить численні копії гена, який кодує 1-SST, інтегровані в його геном. З цієї культури дріжджів 1-SSTrec отримують в культуральному супернатанті і/або в клітинному осаді. Згідно із метою даного винаходу 1-SST можна використовувати в рідкому або твердому стані у вигляді вільного або імобілізованого ферменту. У одному варіанті здійснення винаходу концентрація сахарози, яка застосовується в способі промислового отримання 1-кестози із використанням ферментних препаратів, які містять 1-SST, становить більше, ніж 400 г/л.

Як показано в прикладах застосування препарати 1-SSTrec в рідкому або твердому стані у вільній або імобілізованій формі, отримані із культурального супернатанту або біомаси клітин штаму *P. pastoris* CIGB 308 із використанням загальноприйнятих методів очищення, сублімаційного сушіння і імобілізації білків, виявляють достатню термостабільність при зберіганні і продажу без необхідності охолодження. Нарешті, за рахунок цієї особливості такі препарати можна використовувати як біокаталізатори для промислового отримання ФОС, забезпечуючи другу стадію способу отримання 1-кестози за винаходом. Ферментні препарати за винаходом в своїх різних формах мають загальну перевагу, яка полягає в тому, що в присутності сахарози як субстрат, вони здатні продукувати ФОС із швидкістю перетворення вище 55 %, коли 1-кестоза, зокрема, становить більше 90 % від загального об'єму фракції ФОС.

У одному варіанті здійснення винаходу реакція синтезу 1-кестози відбувається за наступних умов: 200-800 г/л сахарози, переважно 600 г/л; рН від 4,0 до 7,0, оптимальний 5,5; температура 30-50 °C, переважно 40 °C; витрата ферменту/субстрат 2-40 Од/г протягом часу реакції від 1 до 24 годин, переважно від 15 Од/г протягом 3-годинної реакції. Дані умови застосовні до рідких або твердих препаратів 1-SSTrec, незалежно від типу біореактора і режиму роботи, які використовуються для отримання ФОС.

За допомогою способу за даним винаходом долаються обмеження, які відображають рівень техніки відносно способу промислового отримання ФОС, зокрема 1-кестози. Рекombінантний рослинний фермент використовується замість застосування грибів або грибової FTF, і несподівано було встановлено, що вказаний фермент на відміну від інших рослин, продукуючих FTF, стабільно секретується на високому рівні *P. pastoris* і ефективно продукує 1-кестозу в результаті його впливу на сахарозу. До даного винаходу рекombінантні рослинні ферменти не використовувалися для промислового отримання ФОС. З іншого боку, в технологіях застосування реактора із механічним перемішуванням, звичайно використовуваних для промислових ферментативних реакцій, фермент використовується тільки один раз, що приводить до низької продуктивності, коливань показників якості продукту (за рахунок відсутності стабільності від партії до партії) і тому подібному. У варіанті здійснення винаходу застосування мембранного біореактора, працюючого, як в періодичному, так і в безперервному або послідовному режимі (переважно останнє), дозволяє підвищити продуктивність, оскільки за менший період часу досягаються перетворення, аналогічні отриманим в реакторі із механічним перемішуванням, і де більше, ніж 55 % сахарози перетворюється в ФОС, при вмісті 1-кестози, який становить 90 % від складу ФОС. Отримані результати перевершують попередні повідомлення і вирішують недоліки існуючих технологій для промислового отримання ФОС, всі вони ґрунтуються на використанні міцеліальних грибів. З іншого боку, для способу за винаходом потрібна нижча інвестиційна вартість, нижче споживання енергії, знижена витрата ферменту на

кількість продукованої 1-кестози і скорочується кількість операцій при очищенні готового продукту.

Як вказано вище, за допомогою застосування способу за винаходом долаються обмеження, існуючі в описаних способах отримання ФОС, для будь-якого мікроорганізму і будь-якого типу реактора.

Вперше 1-SST F. *arundinacea* використовується для промислового отримання 1-кестози. Відсутні повідомлення про промислове отримання ФОС із використанням рекомбінантної рослинної FTF. Несподівано було виявлено, і на відміну від тестованих FTF із інших рослин, що даний фермент стабільно продукується на високому рівні, і він виділяється в культуральне середовище дріжджового хазяїна *P. pastoris*. У доповнення до цих технологічних переваг рекомбінантний фермент за винаходом в основному продукує 1-кестозу в результаті його впливу на сахарозу при концентрації більше, ніж 400 г/л.

Ферменти пліснявих грибів також каталізують синтез цього трисахариду, але його використовують практично із початку реакції як субстрат для отримання 1-ністози і фруктозилністози, що перевіряється стосовно кінцевого виходу 1-кестози.

З іншого боку, у наш час відсутні постачальники FTF для серійного виробництва ФОС на міжнародному ринку. Спосіб за винаходом створює нову технологію із низькою вартістю для промислового отримання рекомбінантної рослини, яка продукує дуже велику кількість 1-кестози, сприяючи комерційній доступності даного типу ферментів. Несподівано було встановлено, що використання рекомбінантної FTF F. *arundinacea* має як додаткову перевагу, яка здешевлює процес отримання ФОС, зокрема 1-кестози, порівняно із описаним раніше застосуванням інших технологій отримання ФОС.

Таким чином, винахід стосується способу отримання 1-SST в промисловому масштабі, який відрізняється тим, що мікроорганізм, культивований в ферментері, являє собою несахаролітичні дріжджі, які містять численні копії гена, який кодує 1-SST F. *arundinacea*, інтегровані в геном. Рекомбінантні дріжджі конститутивно експресують ген, який кодує 1-SST. У одному варіанті здійснення винаходу несахаролітичні дріжджі, конститутивно експресуючі ген, який кодує 1-SST, являють собою штам *P. pastoris*. Для цілей даного винаходу рекомбінантну 1-SST отримують із супернатанту і/або клітинного осаду культури *P. pastoris*.

Для цілей даного винаходу промисловий масштаб отримання 1-SST представляє масштаб, який включає культивування в ферментерах рекомбінантного штаму, продукуючого 1-SST, повний або частковий об'єм якого перевищує 10000 Од ферменту.

На відміну від повідомлень, виявлених в спеціальній літературі, в одному варіанті здійснення винаходу вперше застосування вказаного рослинного FTF комбінується із використанням мембранного біореактора. Така комбінація дозволяє оптимізувати процес для отримання високих виходів ФОС і 1-кестози. Результати, отримані із вказаною комбінацією, виявилися несподіваними, тобто із вищими значеннями виходу, ніж теоретично розраховані за допомогою математичних моделей. Крім того, за допомогою даного способу усуваються встановлені відсутність стабільності від партії до партії і варіабельність продукту при використанні інших типів реакторів. Це дозволяє повторно використовувати розчинну FTF і тим самим забезпечити придатні із техніко-економічної точки зору співвідношення фермент-субстрат, які в 10 разів вище, ніж при застосуванні реакторів із механічним перемішуванням. Дві цих переваги приводять до скорочення часу реакції до 3 годин, підвищення продуктивності за день щонайменше в 5 разів порівняно із застосуванням реактора із механічним перемішуванням, отже, зниженню витрат на виробництво. Крім того, скорочуються операційні стадії і потрібно менше фізичної площі для виробничого процесу.

Іншим аспектом даного винаходу є продукт харчування для людини або тварини, який містить 1-кестозу, отриманий способом за винаходом, який відрізняється перетворенням сахарози в 1-кестозу в біореакторі із використанням рекомбінантної FTF, виділеної із F. *arundinacea*, конститутивно експресованої в несахаролітичному дріжджовому хазяїні. У конкретному варіанті здійснення такий продукт харчування для людини або тварини із пробіотиком вноситься в рецептуру симбіотичних препаратів, які використовуються як нутрицевтик.

Короткий опис фігур

Фігура 1. Графічне представлення експресійних касет, отриманих в результаті вставки генів, які кодують відповідний фермент 1-SST, із костриці очеретяної (1-sstf), цибулі (1-sstc) і блакитної агави (1-ssta), у вектор pGAPZαA, B, C. Відповідні плазміди були позначені як p1-SSTF (1-SST костриці очеретяної), p1-SSTC (1-SST цибулі) і p1-SSTA (1-SST блакитної агави), відповідно. P<sub>GAP</sub>: промотор GAP, SP: сигнальний пептид α-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, His6: полігістидинова мітка, TT: термінатор транскрипції AOX1 *Pichia pastoris*.

Фігура 2. Методи, використані при конструюванні плазмід р1SSTF6x+6 додаткових копій експресійної касети для конститутивної експресії гена 1-sstf на високому рівні в штамі *Pichia pastoris* GS115. А. Конструкція із однією копією гена. В. Конструкція із шістьма копіями гена, відбір комплементарною гена гістидин4. С. Конструкція із дев'ятьма копіями гена і резистентністю до гігromіцину. P<sub>GAP</sub>: промотор GAP, 5'AOX1: промотор алкогольоксидази, SP: сигнальний пептид  $\alpha$ -фактора *Saccharomyces cerevisiae*, His6: полігістидинова мітка, TT: термінатор транскрипції AOX1, His4: немутований ген гістидин4.

Фігура 3. Динаміка синтезу ФОС ферментом 1-SSTrec в реакторі із механічним перемішуванням при періодичному режимі роботи. Умови реакції: 1-SSTrec 9000 Од/л, сахароза 600 г/л в 0,1 М натрій-ацетатному буфері (pH 5,5); температура 40 °C, швидкість перемішування 250 обертів за хвилину, час реакції 6 год. Умовні позначення: 1-кестоза (GF<sub>2</sub>), ністо́за (GF<sub>3</sub>), загальний вміст ФОС (ФОС = сума GF<sub>2</sub> і GF<sub>3</sub>); сахароза (GF); глюкоза (G); фруктоза (F).

Фігура 4. Хроматограми ВЕРХ, які показують склад отриманих продуктів у пробах, відібраних в різний час реакції (t<sub>r</sub>). А. Суміш стандартних зразків ністо́зи (GF<sub>3</sub>), 1-кестози (GF<sub>2</sub>), сахарози (GF), глюкози (G) і фруктози (F). Б. Синтез ФОС 1-SSTrec на час реакції t<sub>r</sub>=0. С. t<sub>r</sub>=180 хвилин. D. t<sub>r</sub>=360 хвилин.

Фігура 5. Схематичне зображення системи, призначеної для отримання ФОС у мембранному біореакторі.

Фігура 6. Динаміка синтезу 1-кестози ферментом 1-SSTrec в мембранному біореакторі протягом 3 послідовних циклів напівбезперервного режиму роботи. Умови реакції: 1-SSTrec 9000 Од/л, сахароза 600 г/л в 0,1 М натрій-ацетатному буфері (pH 5,5); температура 40 °C, швидкість перемішування 250 обертів за хвилину. Послідовність операцій: цикл № 1 реакція безперервного синтезу протягом 3 год. і виділення (D) протягом 30 хв.; цикли № 2-3 реакція безперервного синтезу протягом 2,5 год. і виділення (D) протягом 30 хв.

Фігура 7. Хроматограми ВЕРХ, які показують склад отриманих продуктів у пробах, відібраних після кожного послідовного циклу синтезу ФОС в мембранному біореакторі при напівбезперервному режимі роботи. А. Цикл № 1, В. циклу № 2 і С. цикл № 3. Умовні позначення: ністо́за (GF<sub>3</sub>), кестоза (GF<sub>2</sub>), сахароза (GF), глюкоза (G), фруктоза (F).

#### Приклади

##### Приклад 1

Порівняльне визначення рівнів активності фруктозилтрансферази (FTF), які проявляються трьома сахароза:сахароза-1-фруктозилтрансферазами (1-SST) із рослин, отриманих в *Pichia pastoris*

Для порівняння рівнів активності FTF трьох вищезгаданих ферментів кДНК, які кодують фермент 1-SST із костриці очеретяної (*Festuca arundinacea*), цибулі (*Allium cepa*) і блакитної агави (*Agave Текилана*), виділяли із їх природних хазяїнів полімеразною ланцюговою реакцією із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) із використанням праймерів, описаних раніше в літературі [Vijn et al. 1998, The Plant Journal 11:387-398; Luscher et al. 2000, Plant Physiology 124:1217-1227; Avila-Fernandez et al. 2007, Plant Science 173:478-486].

Ампліфіковані ПЛР-продукти, відповідні ДНК, яка кодує зрілий фермент (розміри: 1-SST костриці: 1668 п. н., 1-SST цибулі: 1668 п. н. і 1-SST агави: 2026 п. н.), заливали на їх 5'-кінці, в правильній рамці зчитування, із сигнальним пептидом  $\alpha$ -фактора *S. cerevisiae*, і на 3'-кінці із послідовностями, які кодують тус-епітоп і мітку із шести залишків гістидину, які знаходяться в промислово доступному векторі pGAPZaC (Invitrogen, цибуля-порей, Голландія). Цей промислово доступний вектор дозволяє провести відбір отриманих трансформантів по резистентності до антибіотика зеоцину.

У трьох отриманих конструкціях, позначених р1-SSTF (1-SST костриці), р1-1SSTC (1-SST цибулі) і р1-SSTA (1-SST агави), химерні гени, які кодують три ферменти 1-SST, вміщували під транскрипційний контроль промотору GAP і термінатора транскрипції алкогольоксидази 1 (AOX1TT), як показано на фігурі 1.

Три конструкції розщеплювали в одному сайті рестрикції AvrII в промоторі GAP і вставляли електропорацією в геном штаму дріжджового хазяїна X-33. У результаті отримували приблизно 20 трансформантів для кожної конструкції після культивування на середовищі YP із додаванням 2 % гліцерину і зеоцину 100 мг/мл. Для порівняльного дослідження 3 клони, резистентних до зеоцину, кожного із трьох варіантів культивували в 5-літровому (робочий об'єм) ферментері до досягнення клітинами стаціонарної фази. У кожний ферментер засівали по 200 мл інокуляту кожного клону, заздалегідь культивованих в шейкері.

Для підтримки вмісту розчиненого кисню вище 20 % на першій стадії ферментації перемішування автоматично збільшували від 500 до 900 об./хв. і аерацію підтримували на рівні

1 vvm (об'єм повітря/об'єму середовища/хв.). Після підвищення вмісту розчиненого кисню, показником якого було виснаження гліцерину, починали другу стадію підживлення.

Для початку другої стадії потік повітря збільшували до 2 об./об./хв. і культуру підживлювали 1,5 л додаткового розчину (з тим же вихідним джерелом вуглецю) із швидкістю потоку від 5 до 7 мл/л/год., які контролювали по зміні вмісту розчиненого кисню. Не спостерігали яких-небудь токсичних ефектів протягом 72 годин культивування для рекомбінантних штамів або штамів дикого типу, культивованих в аналогічних умовах.

Потім кінцеву культуру розділяли центрифугуванням із отриманням двох фракцій, клітинного осаду (або біомаси) і культурального супернатанту. Проби по 0,2 мл обох фракцій піддавали взаємодії протягом 30 хвилин із розчином сахарози із концентрацією до 300 г/л (0,87 М). Концентрацію глюкози, виділеної в результаті реакції трансфруктозилювання сахарози, використовували як показник рівня активності рекомбінантних клонів FTF.

Інтенсивність реакції трансфруктозилювання була визначена за калібрувальною кривою, яка встановлює залежність зміни у забарвленні проб від певної кількості глюкози. Відносна висока активність (проби ставали червоними із інтенсивністю, еквівалентною концентрації глюкози вище 5,5 мМ) спостерігалася після 30-хвилинних реакцій інтактних клітин і проб культурального супернатанту із трьох клонів, які експресують ген 1-SST костриці очеретяної. На противагу, жоден із клонів, які несуть або ген 1-SST цибулі, або ген 1-SST блакитної агави, не показав детектованої активності після 30-хвилинних реакцій. Незначна активність детектувалася (зміна кольору проби до світло-рожевого, еквівалентного концентрації глюкози у діапазоні 0,5-5,5 мМ) тільки після довшої інкубації протягом 3 і 5 год.

#### Приклад 2

Середні значення аналізованих параметрів під час проведення ферментації трьох клонів із однією копією гена 1-sstf із високою FTF активністю

Три клони, які несуть одну копію 1-sstf, вставлену в свій геном, порівнювали на рівні ферментера із використанням тих же експериментальних умов, які описані в прикладі 1.

Таблиця 1

Порівняння аналізованих параметрів, отриманих під час ферментації трьох клонів із високою активністю 1-SSTrec

Параметр	Значення
Вихід біомаси (г/л культури)	366±4
внутрішньоклітинна активність 1-SSTrec (Од/г вологої біомаси)	4,3±0,2
позаклітинна активність 1-SSTrec (Од/л культурального супернатанту)	3,7±0,1
Час культивування (год.)	69
Загальна активність 1-SSTrec (Од/л культури)	3955±211
Загальна активність 1-SSTrec в біомасі (Од/л культури)	1573,8±25,6
Продуктивність біомаси за активністю (Од/л/год.)	22,8

Одна одиниця 1-SSTrec (Од) являє собою кількість ферменту, яка виділяє 1 мікромоль глюкози за хвилину при взаємодії із 50 % (1,46 М) розчином сахарози в 0,1 М натрій-ацетатному буфері (pH 5,5) протягом 30 хвилин при 30 °C. Дані, наведені в таблиці 1, являють собою середні значення аналізованих параметрів, отриманих в трьох ферментаціях, що відповідають кожному досліджуваному клону ± стандартне відхилення.

Продуктивність цих трьох клонів була в 2 рази вище при використанні конститутивної експресійної системи порівняно із отриманою із метанол-індукованою системою за рахунок того, що була досягнута вища концентрація клітин (366 г/л) протягом коротшого періоду часу культивування (69 год.).

#### Приклад 3

Підвищення активності 1-SSTrec інтеграцією численних копій експресійної касети гена 1-sstf в локус AOX1 *Pichia pastoris*

Для розробки рентабельної технології промислового виробництва для отримання ФОС потрібні високі рівні активності 1-SSTrec, отже, виникає потреба в збільшенні дози гена в дріжджовому хазяїні.

Для отримання численних копій в тандемі експресійної касети плазмиду p1-SSTF, яка містить тільки одну копію експресійної касети, яка містить ген 1-sstf в своєму геномі, розщеплювали із

використанням рестриктаз BamHI і BglII. Із агарозного гелю вирізали отриману смугу, відповідну 2,82 т. п. н., яка містить експресійну касету, і повторно лігували із використанням T4-лігази.

Лігування за допомогою T4-лігази сайтів рестрикції BamHI (G-GATCC) і BglII (A-GATCT) генерує гібридну область із послідовністю GGATCT, яка не розпізнається жодним із цих двох ферментів. Під час реакції лігування два ці ферменти, BamHI і BglII, додавали для полегшення з'єднання різних кінців. Вирізали смугу, відповідну 5,64 т. п. н., яка містить дві копії експресійної касети, і знову обробляли ферментами BamHI і BglII, щоб гарантувати з'єднання експресійних касет у тому ж напрямку транскрипції.

Дану послідовність вставляли в ту ж плазмиду p1-SSTF, розщеплену BamHI і дефосфориловану лужною фосфатазою. Нова отримана конструкція (p1-SSTF3x) несе три копії в тандемі експресійної касети. P1-SSTF3x розщеплювали із використанням рестриктаз BamHI і BglII, вирізали смугу, відповідну 8,46 т. п. н., і повторно лігували, як описано на попередній стадії. Послідовність, відповідну 16,92 т. п. н., вставляли у вектор pAO815, розщеплений BamHI і дефосфорилований лужною фосфатазою.

Даний вектор дозволяє відбирати трансформанти *P. pastoris* GS115 комплементациєю по ауксотрофії *his4*. Отримана плазміда (p1SSTF6x) містить шість копій експресійної касети, розташованих в тандемі і тому ж напрямку транскрипції, вставленому між промотором AOX1 і 3'-фрагментом локусу AOX1 області термінатора (фігура 2).

Дану плазмиду розщеплювали BglII для трансформації електропорацією штаму *P. pastoris* GS115. За допомогою такого розщеплення два фрагменти, один, який дає смугу 22,23 т. п. н., який несе в центрі шість експресійних касет в тандемі і ген, комплементуючий ауксотрофію по *his4*, на 5'-кінці представляє промотор AOX1 і на 3'-кінці 3'-фрагмент локусу AOX1 області термінатора.

При використанні такої методики подвійна гомологічна рекомбінація, яка заміняє локус AOX1, є переважною. Колонії штаму GS115, трансформовані плазмидою p1-SSTF6x, відбирали на мінімальному середовищі YNB із додаванням 2 % глюкози. Для оцінки здатності трансформантів використовувати сахарозу як джерело вуглецю 93 колонії *His4+* культивували окремо в 100-ямковому планшеті із агаром YP (pH 5,5) із додаванням 5 % сахарози і індикатора pH, бромтимолового синього 0,025 %.

Клон GS115/p1-SSTF із однією копією гена 1-SST (PF1x) використовували як позитивний контроль в цьому експерименті. Два клони, позначених PF6Xb PF6Xa, змінювали колір середовища від вихідного зеленого (pH 5,5) до жовтого (pH≤6,0) в результаті реакції трансфруктозилювання сахарози за участю 1-SSTrec, у якій утворювалася молочна кислота за рахунок споживання мікроорганізмами виділеної глюкози із сахарози. Така зміна кольору середовища відбувалася швидше в мультикопійних штаммах, ніж у штамі, який несе один ген. Даний факт свідчить про те, що мультикопійні клони мають більшу ферментативну активність, ніж ті, які несуть одну копію гена.

Для підтвердження цього результату мультикопійні клони PF6Xb PF6Xa і однокопійний клон PF1x культивували в 10 мл рідкого середовища YP із додаванням 2 % гліцерину в орбітальному шейкері протягом 24 годин при 28 °C. Глюкозу, виділену за рахунок активності FTF рекомбінантних ферментів у фракціях, відповідних і осаду (біомаси або клітин), і культуральному супернатанту мультикопійних клонів і однокопійного клону, також визначали із використанням набору "глюкоза-Тріндер" (Sigma) на основі колориметричної реакції хромогенного ферментного комплексу оксидази/пероксидази/глюкози аналогічно тому, як описано в прикладі 1.

Два мультикопійних клони демонстрували вищу активність ферменту, ніж показана однокопійним клоном (таблиця 2), демонструючи, що збільшення копій гена 1-sstf, інтегрованих в геном *P. pastoris*, підвищує активність 1-SSTrec в цих двох рекомбінантних штаммах. Клон PF6Xb демонстрував активність 1-SSTrec в культуральному супернатанті на 31,4 % вище, ніж клон PF6Xa, і на 64,2 % вище, ніж однокопійний клон. У біомасі клон PF6Xb мав активність ферменту на 18 % вище, ніж клон PF6Xa, і на 36 % вище, ніж однокопійний клон.

У таблиці 2 показаний вплив кількості копій гена 1-sstf на ферментативну активність мультикопійних клонів *P. pastoris*. Як контроль використовували штам GS115 і однокопійний клон. Різні букви праворуч від даних вказують на статистично достовірні відмінності, визначені простої класифікації ANOVA із використанням статистичного пакету StatGraph3. Середні значення активності ферменту (n=3) порівнювали із використанням критерію Тьюкі HSD (p<0,01).

Таблиця 2

Порівняння активності 1-SSTrec в одно- і мультикопійних клонах

Штам	Питома ферментативна активність ( $\times 10^{-3}$ UAE/D.O <sub>600</sub> )	
	Біомаса (B)	Культуральний супернатант (S)
GS115	0,1081 $\pm$ 0,0015 <sup>d</sup>	0,1523 $\pm$ 0,0017 <sup>d</sup>
PF1X	2,5813 $\pm$ 0,0012 <sup>c</sup>	4,7830 $\pm$ 0,0015 <sup>c</sup>
PF6Xa	4,9717 $\pm$ 0,0020 <sup>b</sup>	9,1545 $\pm$ 0,0021 <sup>b</sup>
PF6Xb	7,3548 $\pm$ 0,0014 <sup>a</sup>	13,3512 $\pm$ 0,0016 <sup>a</sup>

Одиниці активності ферменту/оптична густина, визначена при довжині хвилі 600 нм (UAE/D.O<sub>600</sub>). Різні букви означають статистично достовірні відмінності між активністю ферментів порівняно один із одним із використанням критерію Тьюкі HSD ( $p < 0,01$ ).

Згідно із отриманими результатами, представленими вище, мультикопійний клон PF6Xb продемонстрував найвищу активність 1-SSTrec і в біомасі, і в культуральному супернатанті, і в результаті він був відібраний для подальших експериментів по експресії. З цього моменту даний відібраний клон був перейменований в PF6X.

#### Приклад 4

Підвищення активності 1-SST повторною трансформацією мультикопійного клону PF6X введенням шести додаткових копій експресійної касети в локус AOX1

Для підвищення ферментативної активності клону 1-SST PF6X була сконструйована нова плазміда, позначена pALS223. Для отримання цієї нової конструкції послідовність розміром 16,92 т. п. н., яка містить шість копій експресійної касети в тандемі і в тому ж напрямку транскрипції, які використовувалися для конструювання плазмиди P1-SSTF6x, вставляли у вектор pPICNaC AOX1-лінкер, заздалегідь розщеплений BamHI, і дефосфорилювали лужною фосфатазою.

Цей вектор забезпечує одну гомологічну рекомбінацію в AOX1 промоторі P. pastoris і подальший відбір трансформантів із антибіотиком гіроміцином. Після перевірки цієї генетичної конструкції рестрикційним аналізом і секвенуванням ДНК проводили лінеаризацію цієї нової плазмиди із використанням ферменту Hpa I і повторно трансформували клон PF6X даною новою конструкцією за допомогою електропорації клітин PF6X. Цей фермент розрізає в певному сайті AOX1 промотор, який сприяє інтеграції в геном дріжджів однією гомологічною рекомбінацією в локусі AOX1.

Трансформанти, які містять більше 6 копій експресійної касети, вставлені в геном дріжджового хазяїна, відбирали на твердому середовищі YP із додаванням гіроміцину 2 %, гліцерину 0,2 г/л. Ферментативну активність в біомасі і в культуральному супернатанті для більше, ніж 60 резистентних до гіроміцину (HigR) колоній визначали із використанням набору "глюкоза-Тріндер" на основі колориметричної реакції хромогенного ферментного комплексу оксидази/пероксидази/глюкози. У цей аналіз також були включені штами PF6x і PF1x як контроль.

Один клон резистентний до гіроміцину, позначений CIGB 308, демонстрував найвищу активність ферменту 1-SSTrec і в клітинному осаді, і в культуральному супернатанті. Цей новий клон виявляв вищу ферментну активність в супернатанті (в 1,87 разу) і біомасі (в 1,76 разу), ніж штам PF6X.

У порівнянні із однокопійним штамом активність 1-SST клону CIGB 308 була в 3,58 рази вище в супернатанті і в 2,41 рази вище в біомасі, підтверджуючи, що збільшення кількості копій гена 1-sstf, стабільно інтегрованих в хазяїна, також збільшує активність 1-SST в дріжджовому хазяїні. Результати саузерн-блотингу показали, що в клоні CIGB 308 було стабільно інтегровано 9 копій експресійної касети. Дані результати свідчать, що у разі повторної трансформації вставці піддавалося тільки три копії експресійної касети замість очікуваних 6 копій.

#### Приклад 5

Штам P. pastoris GIGB 308 має вищу ферментативну активність 1-SST і показує вищу продуктивність, ніж його попередники PF1X і PF6X в масштабі ферментерів

Клон P. pastoris CIGB 308 і його попередники, із однією і шістьма геномними інтегрованими копіями експресійної касети (PF1X, PF6X), відповідно, культивували в 7,5 літрових ферментерах із робочим об'ємом 5 л, при 28 °C, pH 5,5, 500-900 об./хв., із аерацією 1,2 об./об./хв. і контролювали вміст розчиненого кисню на рівні вище 20 %. Незалежно від різної кількості

інтегрованих копій експресійної касети три рекомбінантних штами демонстрували аналогічні показники росту.

Після 19 і 20 годин культивування вихідний вміст гліцерину зменшився, у той час як тиск розчиненого кисню в межах 20 % контролювали поступовим збільшенням швидкості перемішування від 500 до 900 об./хв. При зменшенні гліцерину спостерігалось швидке підвищення вмісту розчиненого кисню, і потім почали підживлення культури 50 % гліцерином (об./об.) протягом 72 годин процесу ферментації.

У цих умовах культивування загальна біомаса, отримана від трьох порівнюваних клонів, становила  $358 \pm 8$  г/л сирової маси, так що можна передбачити, що доза генів, а також виробництво і накопичення рекомбінантного ферменту не здійснювали впливу на ріст дріжджового хазяїна і не були токсичними для них.

Відразу ж через 70-72 години культивування клон GIGB 308 демонстрував самі високі поза- і внутрішньоклітинну активність 1-SST, досягаючи максимальних значень, відповідно,  $29,7 \pm 0,2$  Од/мл культури і  $12,4 \pm 0,2$  Од/мл культури (34 Од/г сирової маси), відповідно. Від загальної активності  $42,1 \pm 0,2$  Од/мл, встановленої після культивування CIGB 308, 70,6 % активності FTF було на основі отриманих в цьому порівняльному дослідженні результатів вирішено відібрати клон CIGB 308 для масового отримання 1-SSTrec.

На момент появи даного винаходу в літературі були відсутні повідомлення, які описують технологію ферментації для отримання рослинної 1-SSTrec, конститутивно експресованої із мультикопійного клону *P. pastoris*.

#### Приклад 6

Технологія культивування із підживленням для штаму *Pichia pastoris* CIGB 308 із використанням сахарози як джерела вуглецю

Вартість ферментації штаму *P. pastoris* CIGB 308 знижується при використанні дешевого джерела вуглецю іншого, ніж гліцерин, такого як сахароза або глюкоза. Штам *P. pastoris* GS115, який використовується як хазяїн, не має інвертазної активності, тому він не може використовувати сахарозу як джерело вуглецю. Однак за рахунок нової активності FTF, отриманої від дріжджового хазяїна, глюкоза виділяється в результаті реакції трансфруктозилювання сахарози, каталізованої 1-SSTrec, і потім глюкоза метаболізується безпосередньо для росту рекомбінантного дріжджового хазяїна. Така здатність рекомбінантного штаму дріжджів дозволяє знизити вартість ферментації в процесі виробництва.

Ферментація сахарози в партії із збільшеним вмістом культури проводили в 75-літровому ферментері із робочим об'ємом 50 л. Встановлені параметри представляли: температура 28 °C, pH 5,5, перемішування 600 об./хв., аерація 1,0 об./об./хв., робочий тиск 0,2 атм. Використовуванням джерелом вуглецю була сахароза в концентрації 50 г/л, яка міститься в цукрі-рафінаді, або цукрі-сирці, або меді.

При виснаженні джерела вуглецю (що детектувалося по підвищенню pH або підвищенню тиску кисню) приблизно через 20 годин після початку ферментації додавали розчин для підживлення (розчин того ж джерела вуглецю, використовуваного спочатку, але із концентрацією 500 г/л) із швидкістю підживлення 8 мл/л/год. від первинного об'єму культури. Потім параметри ферментації повторно встановлювали на наступних значеннях: перемішування 800 об./хв., аерація 1,5 об./об./хв., тиск кисню 0,4 атм. Ферментацію проводили протягом 72 год.

За таких умов культивування отримані виходи біомаси були аналогічні, отриманим із тим же клоном, але який культивували на гліцериновому середовищі. З іншого боку, загальна ферментативна активність (після 72 годин культивування) була значно вищою порівняно із культивуванням на сахарозовмісному середовищі незалежно від вихідного використовуваного сахарозовмісного матеріалу. Результати культивування штаму *P. pastoris* 308 CIGB із використанням різних джерел вуглецю наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Узагальнені результати, отримані після культивування штаму *P. pastoris* CIGB 308 в ферментерах із використанням гліцерину або сахарози як джерела вуглецю

Джерело вуглецю	Позаклітинна активність (Од/мл безклітинного супернатанту)	Внутрішньоклітинна активність (Од/мл культури)	Загальна кількість Од/мл культури	Сира маса (г/л)
Гліцерин	29,7±0,2 (70,6 %)	12,4±0,3 (29,4 %)	42,1±0,4	361±4
Цукор-рафінад	101,6±9,5 (62,02 %)	38,9±5,4 (37,98 %)	102,4±11,3	375±9
Цукор-сирець	53,9±3,3 (46,3 %)	39,9±2,9 (53,7 %)	74,2±3,1	363±4
Мед В	110,7±0,2 (58,5 %)	49,6±5,1 (41,5 %)	119,6±6,3	368±14

Значення в дужках представляють процент внутрішньоклітинної і позаклітинної ферментативної активності штаму *P. pastoris* CIGB 308 після 72 годин культивування. Ферментна одиниця (Од) являє собою кількість 1-SSTrec, яка виділяє 1 мікромоль глюкози в хвилину із початковою швидкістю реакції в розчині сахарози 1,75 М, в 0,1 М натрій-ацетатному буфері, рН 5,5, при 30 °С. Дані являють собою середнє значення ферментацій, проведених із кожним джерелом вуглецю ± стандартне відхилення.

На основі цих результатів був зроблений висновок, що і сахароза, і мед є придатними субстратами для здійснення промислового отримання цієї рекомбінантної FTF.

#### 5 Приклад 7

Отримання ферменту 1-SSTrec безперервним культивуванням

У літературі відсутні які-небудь повідомлення, у яких описано безперервне отримання рекомбінантних FTF, експресованих на високих рівнях в *P. pastoris*. Безперервне отримання 1-SSTrec проводили в 7,5 літровому ферментері INFORS HT із загальним робочим об'ємом 5 л. Встановили і реєстрували наступні параметри протягом всього процесу культивування із використанням програмного забезпечення Iris V 5.0: температуру підтримували на рівні 28 °С, у той час як значення рН 5,5 контролювали автоматичним додаванням NH<sub>3</sub>OH (28 % (об./об.)) і H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (40 % (об./об.)). Вміст розчиненого кисню підтримували протягом всього процесу культивування на рівні вище 20 % автоматичною зміною швидкості перемішування (від 500 до 900 об./хв.), потоку повітря (1-2 об./об./хв.) і тиску (0-0,7 атм).

Вихідний об'єм становив 3 л ферментаційного середовища, яке містить 22 г/л NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 18,2 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,5 г/л MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,5 г/л CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, дріжджового екстракту 5 г/л, слідові кількості солей і вітаміни в достатніх кількостях плюс сахарозу 50 г/л. Для стадії напівбезперервного підживлення використовували 1,5 л розчину сахарози із концентрацією 500 г/л. На стадії безперервного культивування використовували середовище, яке містить 200 г/л сахарози, 2,5 г/л дріжджового екстракту, 11 г/л NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 9,1 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,75 г/л MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,25 г/л CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O; слідові кількості солей і вітаміни.

Ферментер засівали 200 мл інокуляту, заздалегідь культивованого в шейкері. Після виснаження джерела вуглецю починали стадію напівбезперервного підживлення і культуру підживлювали із швидкістю потоку у діапазоні від 7 до 30 мл/л/год. При виснаженні підживлення безперервне культивування починали підживленням біореактора із швидкістю 1 день<sup>-1</sup> розведення (D). Після досягнення стійкого стану культивування продовжували протягом 45 діб із середнім виходом активності 70±5 Од/мл і концентрацією клітин 352±11 г/л сирої маси.

#### Приклад 8

Визначення оптимальних параметрів реакції 1-SSTrec для синтезу 1-кестози

Ферментний препарат, отриманий в ферментері супернатант, піддавали фільтрації із використанням фільтра Sarticon Slice 200 (виробництва Sartorius) із мембраною Hydrosart (0,2 мкм), слідуючи інструкціям виробника. Потім фільтрат концентрували в 10 разів діалізуванням із використанням аналогічного обладнання, але із ультрафільтраційною мембраною Hydrosart (10 кДа) проти 0,1 М натрій-ацетатного буфера із отриманням кінцевого препарату із активністю 1000 Од/мл. Необов'язково фільтрат піддавали ліофілізації із отриманням твердого ферментного препарату із активністю більше, ніж 8500 Од/г.

а) Визначення оптимального рН для активності 1-SSTrec:

Активність 1-SSTrec визначали у діапазоні значень рН від 4 до 8. Реакцію проводили протягом 1 години при 30 °С в 0,87 М розчині сахарози і 10 Од ферменту в кінцевому об'ємі 0,5 мл. Для діапазону значень рН від 4,0 до 5,5 використовували 0,1 М натрій-ацетатний буфер, а для рН у діапазоні від 6,0 до 8,0 0,1 М фосфатний буфер. Максимальні значення ферментативної активності 1-SSTrec встановили при значеннях рН від 5,5 до 6,0.

b) Температура і оптимальна концентрація субстрату для синтезу ФОС:

Для визначення цих параметрів 60 Од 1-SSTrec піддавали взаємодії в 0,1 М натрій-ацетатному буфері, рН 5,5 при концентраціях субстрату у діапазоні від 200 до 600 г/л, при 30 °С, 40 °С і 50 °С, відповідно, в кінцевому об'ємі реакційної суміші 10 мл при 250 об./хв. Після 1-годинної реакції визначали склад цукру в реакційній суміші за допомогою ВЕРХ. Для проведення хроматографії 20 мкл проби наносили на колонку Aminex HPLC 42-C (виробництва BioRad, Richmond) при швидкості потоку 0,6 мл/хв., тиску приблизно 52 бар і робочій температурі 81 °С. Як рухому фазу використовували воду і як рефрактометричний детектор використовували диференціальний рефрактометр Knauer. Цукор кількісно визначали із використанням програмного пакету BioCrom версія 3.0, IGBC, 1996-1997.

У таблиці 4 наведені склад і результати кількісного визначення цукрів (%), встановлений за різних умов реакції, швидкості синтезу 1-кестози і співвідношення трансфруктозилування і гідролітичної активності. Максимальна швидкість синтезу 1-кестози із відсутністю гідролітичної активності була досягнута при 40 °С і концентрації сахарози 600 г/л.

Таблиця 4

Вплив температури і концентрації субстрату на синтез ФОС

Температура	200 г/л						
	G	F	GF	GF <sub>2</sub>	GF <sub>3</sub>	г(GF <sub>2</sub> )	R <sub>т/н</sub>
30 °С	16,0	0,5	39,6	45,8	0,8	1,0	88
40 °С	13,1	0,9	41,2	43,7	1,1	1,0	50
50 °С	1,5	0,0	91,2	6,7	0,0	0,1	-
Температура	400 г/л						
	G	F	GF	GF <sub>2</sub>	GF <sub>3</sub>	г(GF <sub>2</sub> )	R <sub>т/н</sub>
30 °С	11,8	0,1	58,0	29,9	0,3	1,3	585
40 °С	11,0	0,4	48,6	39,3	0,8	1,8	111
50 °С	2,4	0,0	86,3	11,1	0,0	0,5	-
Температура	600 г/л						
	G	F	GF	GF <sub>2</sub>	GF <sub>3</sub>	г(GF <sub>2</sub> )	R <sub>т/н</sub>
30 °С	6,9	0,0	67,5	25,5	0,0	1,8	-
40 °С	9,9	0,0	54,7	34,7	0,8	2,4	-
50 °С	7,3	0,0	64,8	27,9	0,0	1,9	-

Склад реакційної суміші після проведення 1-годинної реакції: глюкоза (G), фруктоза (F), сахароза (GF), 1-кестоза (GF<sub>2</sub>), ністоза (GF<sub>3</sub>). Параметри реакції: г(GF<sub>2</sub>) швидкість синтезу 1-кестози, вказана в г/хв., співвідношення трансфруктозилування і гідролітичної активності (R<sub>т/н</sub>), виражене відношенням кількості 1-кестози і фруктози.

c) Період напіврозпаду вільної і імобілізованої 1-SSTrec:

Оцінювали термостабільність вільного і імобілізованого на Eupergit ферменту і клітин *P. pastoris* CIGB 308, імобілізованих на альгінаті кальцію. Обидві, вільну або імобілізовану, форми інкубували в 0,1 М натрій-ацетатному буфері, рН 5,5, при 30 °С, 35 °С і 40 °С. Для оцінки залишкової активності проби відбирали із кожної реакційної суміші із інтервалами 24 години при 30 °С, 1 година при 35 °С і 20 хвилин при 40 °С, відповідно. Потім визначали період напіврозпаду як час, за який кожний із аналізованих результатів, представлені в таблиці 5, показують, що ферментні препарати, які містять вільну 1-SSTrec, є значно стабільнішими, ніж клітини із активністю 1-SST, імобілізовані на альгінаті кальцію.

Крім того, несподівано було встановлено, що період напіврозпаду неочищеного екстракту в розчині 1-SSTrec при 30 °С, тобто в нереакційних умовах, становить 1432 годин. Такий час перевищує більше, ніж у 100 разів період напіврозпаду, зареєстрований на даний момент для рослинних ферментів типу 1-SST.

Таблиця 5

Період напіврозпаду різних препаратів 1-SSTrec у нереакційних умовах

Ферментний препарат	Період напіврозпаду (год.)		
	30 °C	35 °C	40 °C
Вільний 1-SSTrec (неочищений екстракт)	1432,0	6,1	0,7
клітини <i>P. pastoris</i> CIGB 308, імобілізовані на альгінаті кальцію	36,0	4,2	0,3
Імобілізований на Eupergit 1-SSTrec	1856,0	12,9	1,6

Дослідження термостабільності проводили із ліофілізованим ферментним препаратом. Результати свідчили про те, що твердий препарат має період напіврозпаду більше трьох років при 30 °C.

## Приклад 9

5 Перетворення сахарози в ФОС, каталізоване 1-SSTrec, у періодичній реакції із використанням реактора із механічним перемішуванням

Динаміку синтезу ФОС, каталізованого 1-SSTrec, визначали при концентрації сахарози 600 г/л із додаванням ферменту-субстрату в масовому співвідношенні 15 Од/г в 0,1 М натрій-ацетатному буфері, pH 5,5; при 40 °C, протягом 6 годин в 1 літровому реакторі при 250 об./хв. Кількісне визначення і склад отриманих цукрів визначали в пробах, які відбирали кожні 20

10 хвилин, із використанням ВЕРХ аналогічно тому, як описано в прикладі 8.  
Максимальна отримана кількість 1-кестози становила 320,8 г/л, що відповідало 53,4 % від всіх вуглеводів в суміші і 90,4 % від загального об'єму ФОС. На фігурі 3 показано, що максимальна отримана кількість 1-кестози досягалася в період між 2,7 і 3 годинами реакції, коли було витрачено більше, ніж 70 % вихідної сахарози. У цей момент максимальна концентрація 1-

15 кестози співпадає із початком появи тетрасахариду ністози.  
Даний факт є переважним для застосування 1-SSTrec в серійному виробництві 1-кестози, оскільки ністоза, яка утворилася в реакції перетворення сахарози, не з'являється доти, доки не витрачено 50 % вихідної сахарози, як показано на фігурі 4. На противагу, грибові FTF нагромаджують ністозу від початку реакції вже при синтезі перших молекул 1-кестози, а також

20 каталізують синтез пентасахариду фруктозилністози.  
Аналогічні значення і динаміка в процесі перетворення сахарози в 1-кестозу були отримані із використанням клітин із периплазматичною активністю 1-SSTrec, вільною або імобілізованою на альгінаті кальцію, або 1-SSTrec, ковалентно імобілізованою на Eupergit (виробництва Sigma) в аналогічних умовах реакції. У таблиці 6 наведені концентрації ФОС, отримані із різними

25 ферментними препаратами.

Таблиця 6

Концентрація синтезованих ФОС після  
3-годинної реакції із використанням різних 1-SSTrec ферментних препаратів

Синтезовані ФОС	Вільний 1-SSTrec	Вільна 1-SSTrec	Клітини, імобілізовані на альгінаті кальцію
Загальний об'єм ФОС	354,7 г/л	330,5 г/л	342,2 г/л
1-кестоза	320,8 г/л (90,5 %)	322,1 г/л (97,4 %)	318,3 г/л (93,0 %)
ністоза	33,9 г/л (9,5 %)	8,4 г/л (2,6 %)	23,9 г/л (7,0 %)

30 Реакційну суміш при трансфруктозилуванні, отриману після 3-годинного синтезу, піддавали пастеризації для інактивації ферменту. Потім сироп піддавали доочищенню, яке почалося фільтрацією із подальшою демінералізацією, знебарвленням, і закінчувалася хроматографічним розділенням із псевдорухом шаром (SMB) так, що після елюювання отримували багатий ФОС потік, який містить більше, ніж 90 % 1-кестози. Даний факт свідчить про технічну застосовність цього способу отримання багатого 1-кестозою сиропу, ФОС із найвищою пребіотичною дією і так далі, набуваючи великого промислового значення.

Технічна застосовність цього способу в промисловому масштабі була підтверджена масштабуванням реакції перетворення сахарози в 1-кестозу в реакторі об'ємом 30 і 100 л, відповідно. Масштабування цього способу було виконане методом, оснований на "принципі подібності", згідно із інформацією, отриманою в ході випробування, проведеного в 1 літровому дослідному реакторі. Концентрація 1-кестози, отримана в двох нових масштабах, в середньому становила  $322 \pm 7$  г/л. Даний результат не показує статистично достовірної різниці із результатами, отриманими в дослідному реакторі. Даний факт також показав, що реакція перетворення сахарози в 1-кестозу, каталізована 1-SSTrec, відтворюється в реакторах із механічним перемішуванням при вищих масштабах.

#### Приклад 10

Синтез 1-кестози із сахарози в мембранному біореакторі, працюючому в напівбезперервному режимі

Технологічний процес, описаний в прикладі 9, для синтезу 1-кестози із сахарози проводили із використанням вільної 1-SSTrec в біореакторі із механічним перемішуванням. Для цієї мети 1 літровий (робочий об'єм) біореактор із механічним перемішуванням з'єднували на його виході із ультрафільтраційною мембраною патронного типу (Prep/Scale TFF-1 30 кДа, Millipore, із номінальною площею фільтра  $0,09 \text{ м}^2$ ), дозволяючи розділення продуктів реакції і ферменту, як показано на фігурі 5.

Використовувані параметри представляли: початкова концентрація ферменту 9000 Од/л, початкова концентрація сахарози 600 г/л в 0,1 М ацетатному буфері, pH 5,5, температура  $40^\circ\text{C}$ , швидкість перемішування 250 об./хв., потік поживного середовища на виході мембранного біореактора 40 мл/хв.

Під час стадії синтезу обидва, ретентатний і пермеатний, потік на виході мембрани повертали в ферментативний біореактор. Кожні 30 хвилин проби пермеатного потоку аналізували методом ВЕРХ для визначення міри перетворення сахарози в 1-кестозу, як описано в прикладах 8 і 9.

Після 3-годинної реакції клапан рециркуляції пермеатного потоку в біореактор закривали, а раніше закритий клапан резервуара для збору ФОС відкривали. Клапан, відповідний ретентатному потоку, встановлювали для забезпечення пермеатного потоку 30 мл/хв.

Через 30 хвилин 90 % від загального об'єму реакційної суміші зливали і тому випускний клапан резервуара для збору пермеатного потоку закривали. Потім поворотний клапан біореактора відкривали і зафіксований клапан регулювали, таким чином, щоб швидкість повернення пермеатного потоку в біореактор становила до 5 мл/хв. У цей момент в біореактор завантажували 900 мл сахарози 600 г/л в 0,1 М ацетатному буфері, pH 5,5. Крім того, додавали 180 Од 1-SSTrec для підтримки того ж часу реакції і тієї ж міри перетворення 1-кестози, таким чином починаючи другий цикл синтезу.

Через 2 години і 30 хвилин після початку реакції проводили вивантаження продуктів реакції, як це виконувалося в першому циклі. Після повного вивантаження 90 % від об'єму реакційної суміші, відповідного другому циклу, біореактор знову завантажували таким же чином, як це робили у другому циклі. Ці стадії вивантаження реакційної суміші послідовно повторювали до завершення 10 операційних циклів, а потім проводили стадію очищення BRM. На фігурі 6 показана динаміка протягом перших 3 циклів, а на фігурі 7 показаний склад отриманих продуктів в кінці кожного послідовного циклу.

Використання послідовно працюючого BRM має продуктивність, аналогічну біореактору із механічним перемішуванням, при тій же потужності, але при зменшеному в 8 разів споживанні ферменту кількістю отриманої 1-кестози.

Аналогічні концентрації 1-кестози отримували при інших робочих умовах BRM в напівбезперервному режимі. До робочих умов, які можна змінювати без негативного впливу на склад отриманих продуктів, стосуються співвідношення фермент-субстрат (2-40 Од/г сахарози), концентрація сахарози 400-800 г/л, температура ( $30$ - $50^\circ\text{C}$ ), pH (5,0-6,5), із урахуванням того, що час завантаження завжди становить від 10 до 20 % часу, за який досягається максимальне отримання 1-кестози.

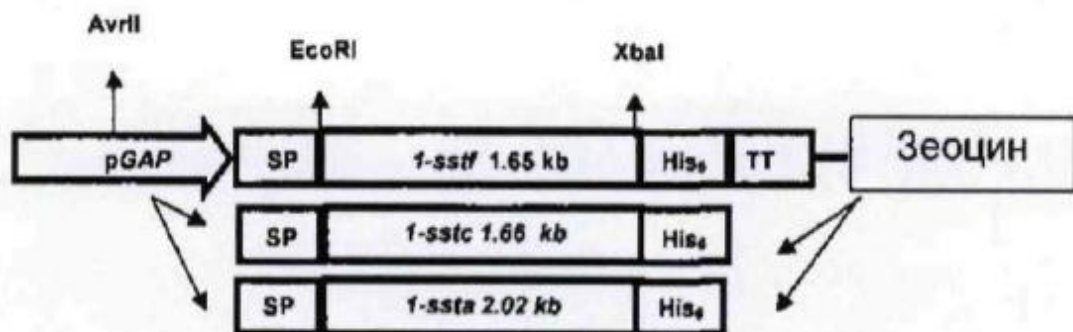
Час завантаження у вказаному діапазоні підходить для синтезу ністози і отримання фруктози із 1-кестози. До даного винаходу в літературі були відсутні повідомлення, у яких було описано отримання 1-кестози в BRM.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

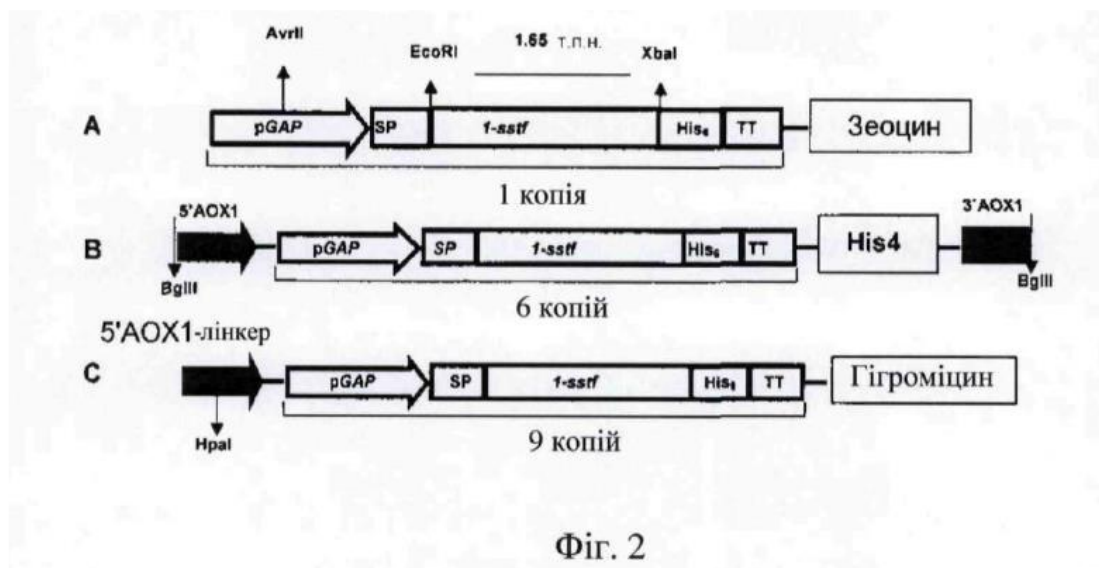
1. Спосіб отримання 1-кестози в промисловому масштабі, який відрізняється тим, що перетворення сахарози в 1-кестозу проводять в біореакторі з використанням рекомбінантної

сахароза:сахароза-1-фруктозилтрансферази (1-SST) з *Festuca arundinacea*, експресованої під контролем конститутивного промотору в несахаролітичних дріжджах, де для отримання в промисловому масштабі необхідна початкова концентрація сахарози в біореакторі щонайменше 400 г/л.

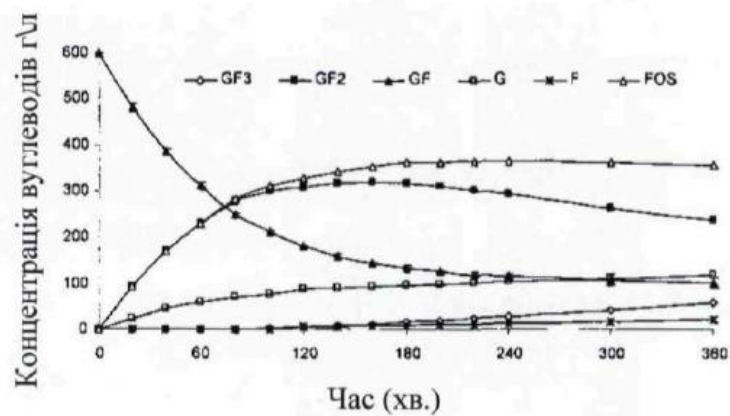
- 5 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що несахаролітичні дріжджі являють собою штам *Pichia pastoris*.
3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що штам *Pichia pastoris* містить численні копії гена, що кодує 1-SST, інтегровані в геном.
4. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що FTF виділяють з супернатанту і/або клітинного
- 10 осаду культури *Pichia pastoris*.
5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що 1-SST отримують культивуванням рекомбінантних дріжджів в ферментері з періодичним, безперервним або підживлюваним режимом роботи.
6. Спосіб за п. 5, в якому джерело вуглецю, що використовують для культивування дріжджів, являє собою сполуку, вибрану з гліцерину, глюкози і сахарози будь-якого ступеня чистоти.
- 15 7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перетворення сахарози в 1-кестозу здійснюють вільною або іммобілізованою 1-SST.
8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перетворення сахарози в 1-кестозу проводять в біореакторі з механічним перемішуванням, з нерухомим шаром або мембранного типу.
9. Спосіб за п. 8, у якому мембранний біореактор працює в безперервному або
- 20 напівбезперервному режимі.
10. Неочищений ферментний препарат для перетворення сахарози в 1-кестозу в промисловому масштабі, який містить 1-SST *F. arundinacea*, експресованої під контролем конститутивного промотору в несахаролітичних дріжджах *Pichia pastoris*, які містять численні копії гена, що кодує 1-SST, інтегровані в геном, де для отримання в промисловому масштабі необхідна початкова
- 25 концентрація сахарози в біореакторі щонайменше 400 г/л.
11. Неочищений ферментний препарат за п. 10, де 1-SST знаходиться в твердому або рідкому стані і у вільній або в іммобілізованій формі.
12. Неочищений ферментний препарат за п. 10, де 1-SST виділяють із супернатанту і/або клітинного осаду культури *Pichia pastoris*.
- 30 13. Спосіб отримання 1-SST, який **відрізняється** тим, що здійснюють ферментацію з використанням несахаролітичних дріжджів, які експресують численні копії гена, що кодує 1-SST, виділеного із *Festuca arundinacea*, інтегровані в геном, де експресію гена, що кодує 1-SST, здійснюють під контролем конститутивного промотору.
14. Спосіб за п. 13, де несахаролітичні дріжджі являють собою штам *Pichia pastoris*.
- 35 15. Спосіб за п. 14, де 1-SST виділяють із супернатанту і/або клітинного осаду культури *Pichia pastoris*.



Фіг. 1



Динаміка отримання ФОС із сахарози



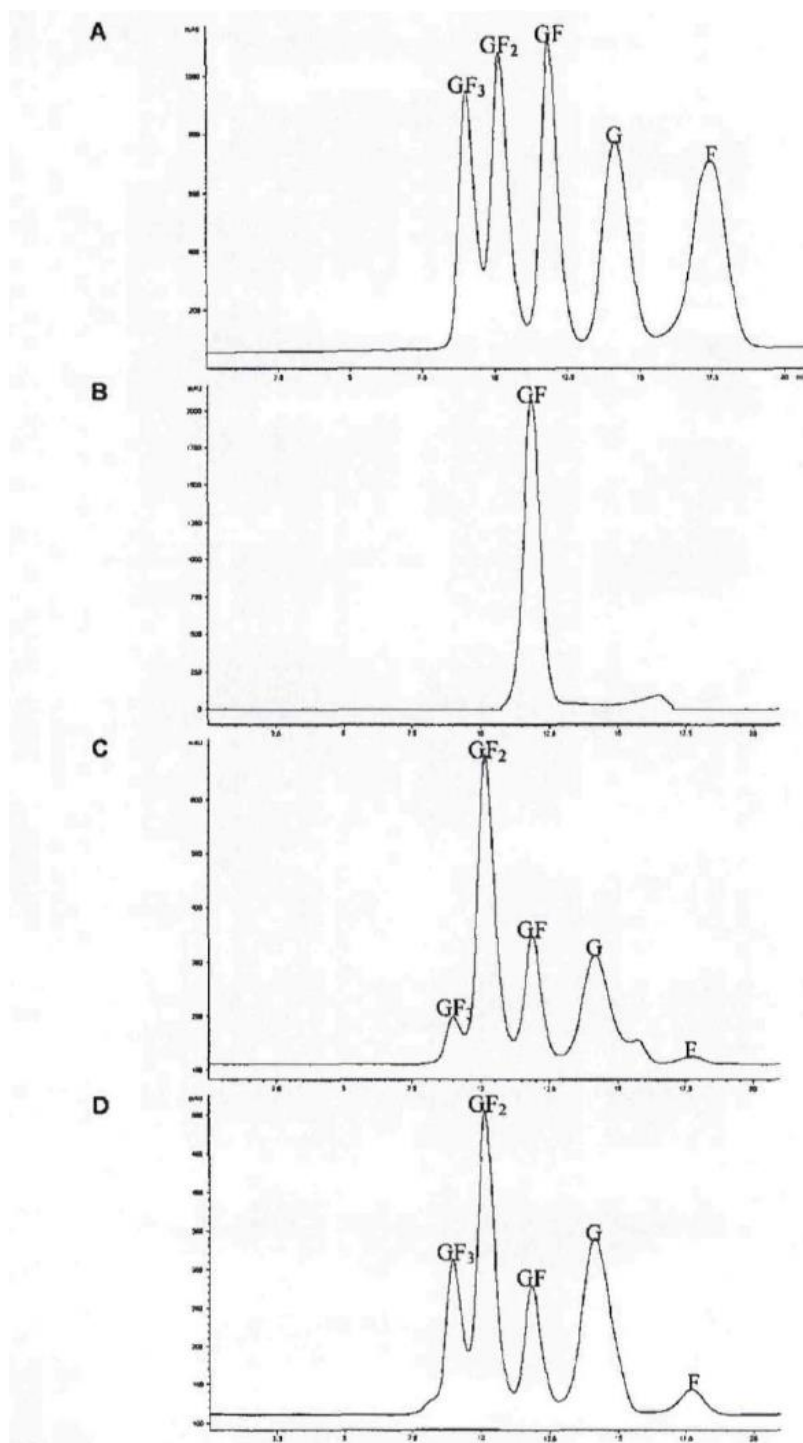
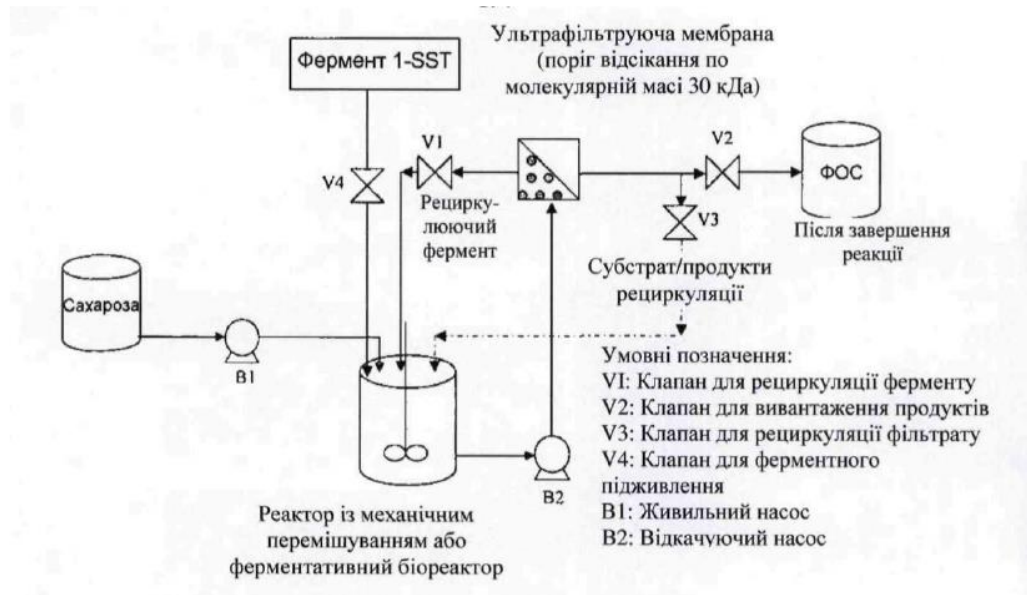
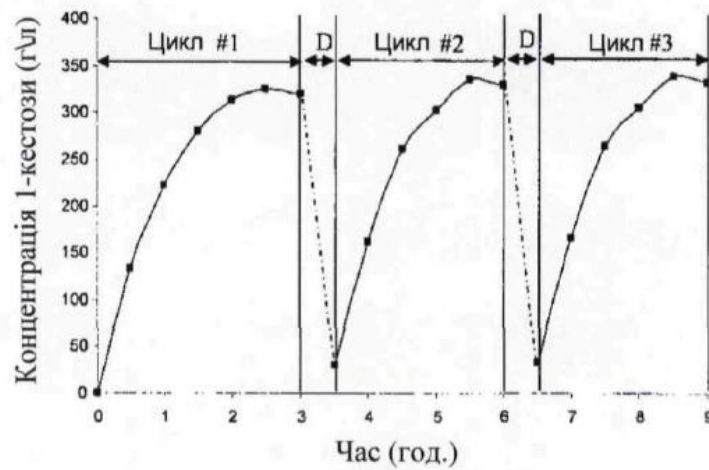


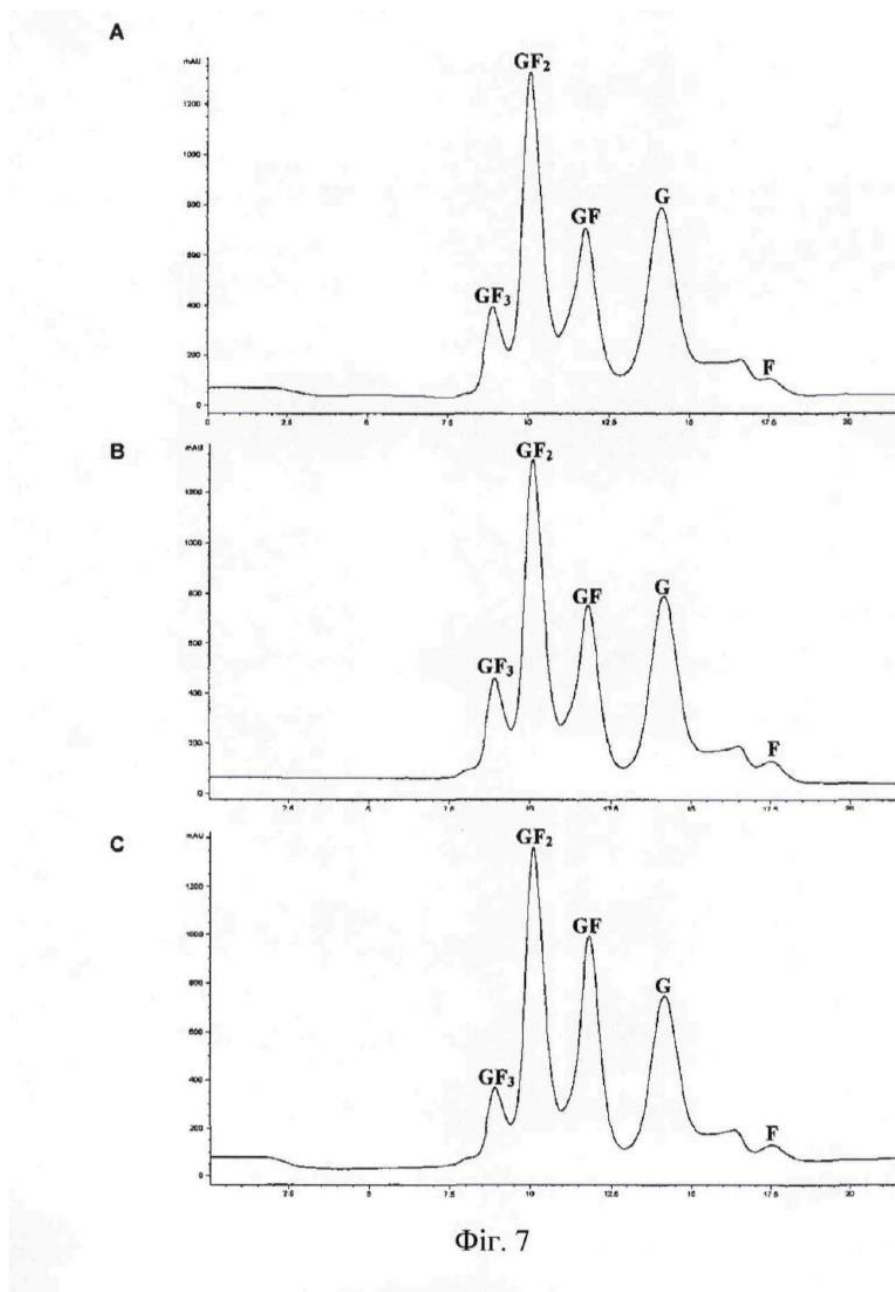
Fig. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фиг. 7

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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