

**ПРОЄКТНА ПРОПОЗИЦІЯ НА УЧАСТЬ У КОНКУРСІ СПІЛЬНИХ УКРАЇНСЬКО – ЛАТВІЙСЬКИХ НАУКОВО-ДОСЛІДНИХ ПРОЄКТІВ  
ДЛЯ РЕАЛІЗАЦІЇ  
у 2025 – 2026 рр.**

**Program Proposition Form of Ukrainian-Latvian Joint Programme of Scientific and Technological Cooperation Project**

**Загальна інформація / General Information**

<b>Назва проєкту українською мовою / Title of the project in Ukrainian:</b>	<i>Вплив надпродукції рибофлавіну у конвенційних і неконвенційних дріжджів на виживання клітин при процесах дегідратації-регідратації</i>
<b>Назва проєкту англійською мовою / Title of the project in English:</b>	<i>Effects of riboflavin overproduction in the conventional and non-conventional yeasts on cell survival under dehydration-rehydration processes</i>
<b>Анотація (макс. 1000 символів) / Summary (max 1000 characters)</b>	<p>Проєкт спрямований на подальший розвиток наших знань про механізми стійкості дріжджів до стресу, викликаного дегідратацією-регідратацією. Для цієї мети будуть використані сконструйовані нами штами флавіногенних дріжджів <i>Candida famata</i>, здатні до надсинтезу рибофлавіну внаслідок надекспресії низки структурних та регуляторних генів біосинтезу рибофлавіну, а також покращення постачання попередниками – ГТФ та рибулозо-5-фосфатом. Буде опрацьовано новий метод селекції спонтанних мутантів пекарських дріжджів <i>S. cerevisiae</i>, здатних до підвищеної продукції рибофлавіну, який базується на довготривалому культивуванні дріжджів у середовищі зі зростаючими концентраціями селективного агента – природного аналога рибофлавіну – розеофлавіну (7-метил-8-диметиламін-(11-D)-ізоалоксазину. Штами <i>S. cerevisiae</i> з підвищеною продукцією рибофлавіну можуть бути використані для отримання хліба, збагаченого вітаміном B2 та як харчову добавку для сільськогосподарських і домашніх тварин.</p> <p>The project is directed at further development of our knowledge about the mechanisms of yeast resistance to stress caused by dehydration-rehydration treatment. For this purpose, we will use strains of flavinogenic yeast <i>Candida famata</i>, capable of oversynthesis of riboflavin due to overexpression of some structural and regulatory genes of riboflavin biosynthesis, as well as improvement of the supply of precursors - GTP and ribulose-5-phosphate. A new method of selection of spontaneous mutants of baker's yeast <i>S. cerevisiae</i> capable of increased production of riboflavin will be developed, which is based on long-term cultivation of yeast in an environment with increasing concentrations of a selective agent - a natural analogue of riboflavin - roseoflavin (7-methyl-8-dimethylamine-(11-D)-isoalloxazine. Strains <i>S. cerevisiae</i> with increased production of riboflavin can be used to obtain bread enriched with vitamin B2. The selected strains can be also used as a food additive for farm and domestic animals.</p>
<b>Відповідність пріоритетному напрямку досліджень / Conformity with the priority research area</b>	Нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань, дослідження в галузі біотехнології, біоінженерії та генетики

**Партнери / Partners**

<b>Український партнер (UA) / Ukrainian Partner (UA):</b>	
<b>Установа / Name</b>	<i>Інститут біології клітини Національної академії наук України Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine</i>
<b>Юридична адреса / Legal address</b>	<i>Юридична адреса / Legal address: вул. Драгоманова 14/16, Львів, Україна ; Dragomanov Street, 14/16, Lviv, Ukraine</i>
	<i>Поштовий індекс / Postcode: 79005</i>
	<i>E-mail: institute@cellbiol.lviv.ua</i>
	<i>Номер тел. / Phone: +380 32 261 2163</i>
<b>Контактна інформація / Contact information</b>	<b>Науковий керівник / Principal investigator</b>
	<i>ПІБ повністю, науковий ступінь / Scientific degree, name, surname: Сибірний Андрій Андрійович, професор, д.б.н., академік НАН України, іноземний член Академії наук Латвії, член Європейської академії мікробіології; Andriy Sibirny, PhD, Professor, Full Member of NAS of Ukraine, Foreign member of Academy of Sciences of Latvia, Member of European Academy of Microbiology ; 1948-10-31; молодий вчений/young scientist - Hi/No</i>
	<i>Посада / Position: Директор Інституту біології клітини НАН України; Director of Institute of Cell Biology NAS of Ukraine</i>
	<i>Номер тел. / Phone: +380673704885 E-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua</i>

<b>Латвійський партнер (LV) / Latvian partner (LV):</b>	
<b>Установа / Name</b>	<i>Університет Латвії University of Latvia</i>
<b>Реєстраційний номер у Реєстрі наукових установ / Registration number in the Register of Scientific Institutions</b>	33910000218

<b>Юридична адреса / Legal address</b>	Юридична адреса / Legal address: Райна бульв. 19, Пуґа; Raina Blvd. 19, Riga
	Поштовий індекс / Postcode: Lv-1586
	E-mail: lietvediba@lu.lv
	Номер тел. / Phone: +37167034444
	Сайт / Web site: www.lu.lv
<b>Юридичний представник установи / Legal representative of the Institution</b>	Ім'я та прізвище / Name and surname: Професор Гунтарс Кітенбергс; Prof. Guntars Kitenbergs
	Посада / Position: Проректор з наукової роботи; Vice-Rector for Research
<b>Контактна інформація / Contact information</b>	<b>Науковий керівник / Principal investigator</b>
	Науковий ступінь, ім'я, прізвище / Scientific degree, name, surname: Олександр Рапопорт, Доктор біологічних наук, професор, дійсний член Латвійської академії наук, член Європейської академії мікробіології; Alexander Rapoport (Alexanders Raporports), Dr habil.biol., Professor, Full Member of Latvian Academy of Sciences, Member of European Academy of Microbiology
	Посада / Position: Керівник лабораторії клітинної біології Інституту мікробіології та біотехнології Латвійського університету, співдиректор Спільної міжнародної латвійсько-української лабораторії мікробної клітинної біології; Head of Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia, Co-director of Joint International Latvian-Ukrainian Laboratory of Microbial Cell Biology
	Номер тел. / Phone: +371 29504215
	E-mail: alexandrs.raporports@lu.lv

**1. Завдання проекту (до 0,5 сторінки A4, 12pt) (тут і далі – об'єм вказується для тексту українською мовою; об'єм тексту англійською мовою в залежності від перекладу) / Project objectives (up to half A4 size sheet, 12pt)**

**Мета:** З'ясування впливу надпродукції рибофлавіну (вітаміну B2) у флавіногенних дріжджів *Candida famata* та пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на життєздатність за умов дегідратації та регідратації

Для цієї мети ми плануємо використати сконструйовані нами за допомогою методів класичної генетики та з застосуванням генетичної інженерії штами дріжджів *S. famata*, здатні до продукції різної кількості рибофлавіну, а також опрацювати новий метод селекції спонтанних мутантів *S. cerevisiae*, здатних до підвищеної продукції рибофлавіну. Цей метод базується на довготривалому культивуванні дріжджів у середовищі зі зростаючими концентраціями селективного агента – природного аналога рибофлавіну – розеофлавіну (7-метил-8-диметиламін-(11-D)-ізоаллоказину.

Особлива увага буде звернена на життєздатність рекомбінантних штамів та спонтанних мутантів за умов дегідратації- регідратації за різних умов культивування, зокрема при дефіциті джерел карбону та нітрогену. Вплив надсинтезу рибофлавіну на виживання клітин дріжджів-синтетиків рибофлавіну за умов дегідратації-регідратації не досліджувався. Особливо цікавим це є для *S. cerevisiae*, які мають широке промислове застосування, зокрема для отримання хліба з підвищеним вмістом вітаміну B2. Успішна реалізація цього проекту повинна дати можливість розробити ефективну методологію, яка може бути перенесена на інші біотехнологічно важливі штами дріжджів для підвищення їх стабільності при тривалому зберіганні в сухому стані, а також для промислового використання активних сухих дріжджових штамів-продуцентів різних сполук.

**Aim::** Elucidation of the effect of overproduction of riboflavin (vitamin B2) in flavinogenic yeast *Candida famata* and baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* on vitality under dehydration and rehydration

For this purpose, we plan to use *C. famata* yeast strains capable to produce different amounts of riboflavin constructed by us using methods of classical genetics or with the application of genetic engineering, as well as to develop a new method for selection of spontaneous *S. cerevisiae* mutants capable of increased riboflavin production. This method is based on the long-term cultivation of yeast in a medium supplemented with increasing concentrations of a selective agent - a natural riboflavin analogue - roseoflavin (7-methyl-8-dimethylamine-(11-D-ribityl)-isoalloxazine).

Special attention will be paid to the viability of recombinant strains and spontaneous mutants to dehydration-rehydration under different cultivation conditions, in particular, in the case of a deficiency of carbon and nitrogen sources. The effect of overproduction of riboflavin on the survival of yeast cells riboflavin producers riboflavin under dehydration-rehydration conditions was not tested. This is especially interesting for *S. cerevisiae*, which has wide industrial applications, in particular for the production of bread with an increased content of vitamin B2. Successful implementation of this project, should give the possibility to develop the efficient methodology that may be transferred to other biotechnologically important yeast strains for the improvement of their stability during long-term storage in dry state as well as for the industrial production of such active dry yeast stains-producers of various compounds.

**2. Опис поточної ситуації (до 2 сторінок A4, 12pt) / Description of the current situation (up to 2 A4 size sheets, 12pt)**

Дріжджові клітини є оптимальною моделлю еукаріотичної клітини, яка все частіше використовується в молекулярній біології, генетиці, фармакології та біомедицині дослідженнях. Ці дослідження також важливі для біомедицини. Розуміння механізмів і сполук, що забезпечують

стійкість клітин в умовах стресу, може допомогти штучно підвищити стійкість живих організмів до складних медичних процедур і лікування. Крім того, загальновідомо, що дріжджі широко використовуються у біотехнології для виробництва різноманітних надзвичайно важливих для медицини та інших галузей речовин. Вони включають інсулін, вакцини виготовлені з рекомбінантного антигену вірусу гепатиту В (HBsAg), рекомбінантний гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), який є важливим гемопоетичним фактором росту та імунomodulatory, гірудин, який є одним із найбільш потужних природних інгібіторів тромбіну, деякі вітаміни групи В, зокрема рибофлавін (Abbas, Sibirny, 2011), вітамін D, бета-каротин, бета-глюкани та ін.

Деякі види дріжджів, зокрема промислово важливі *Saccharomyces cerevisiae*, *Ogataea polymorpha*, здатні пережити висушування, переходячи в стан ангідробіозу – тимчасового оборотного призупинення клітинного метаболізму (Raporort, 2017; Raporort et al., 2019, Sek et al., 2023). Ця властивість зараз широко використовується для успішного тривалого підтримання життєздатності мікроорганізмів і потужного виробництва сухих хлібопекарських дріжджів. Активні препарати сухих дріжджів можна використовувати також у виноробстві, виробництві етанолу та на пивоварних заводах. Вони також можуть бути використані для біотехнологічного виробництва різних цінних сполук. Протягом останніх десятиліть дегідратація дріжджів привертає все більший інтерес до деяких досить несподіваних біотехнологічних завдань, наприклад, сушені дріжджі можуть бути використані як ефективні біосорбенти різних забруднюючих речовин, включаючи важкі метали (Raporort et al., 2016). У той же час багато штамів дріжджів, необхідних для цих технологій, нестійкі до процесів дегідратації-регідратації.

Намагаючись пояснити суть стану ангідробіозу і з'ясувати механізми його перебігу, вчені описали різні клітинні сполуки і структури, які за нього відповідають. Ці структури включають клітинну стінку та плазматичну мембрану, вакуолі, мітохондрії та лізосоми, перелік інших найважливіших сполук включає трегалозу, глікоген, глутатіон та краплі ліпідів. За процес ангідробіозу також відповідають різні білки і гени. Кожен фактор має певну функцію (Sek et al., 2023). Дріжджові клітини швидко й ефективно реагують на процес дегідратації, реалізуючи механізми, які вже на його ранніх стадіях призводять до накопичення внутрішньоклітинного гліцерину, який діє як осмопротектор. Процес регідратації також пов'язаний з активацією деяких генів шляху бродіння та неокислювальної фази пентозофосфатного шляху, а також генів, пов'язаних з біогенезом рибосом і синтезом білка. Визнано, що пошкодження дріжджових клітин під час процесу дегідратації та подальшої регідратації також можна віднести до окисного стресу (Diront et al. 2014). Цей стрес тісно пов'язаний з активними формами кисню (АФК), які утворюються як побічні продукти виробництва АТФ під час окисного фосфорилування в дихальному ланцюзі. Перехід у стан ангідробіозу не призводить до серйозних пошкоджень геному дріжджових клітин. Швидше за все, ця стабільність пов'язана зі специфічними внутрішньоклітинними реакціями, які забезпечують необхідний захист важливих структур і макромолекул (Sek et al., 2023). Важливо продовжувати дослідження для більш глибокого розуміння механізмів ангідробіозу, виявлення нових факторів, залучених у процеси дегідратації-регідратації, а також надавати цьому процесу різні мікроорганізми оскільки, незважаючи на значний прогрес на сьогоднішній день детальні механізми цього оборотного процесу залишаються нез'ясованими.

Одним із цікавих і перспективних напрямків досліджень є використання дріжджів для збагачення харчових продуктів і кормів для тварин вітаміном В2. Можливість отримання клітинами рибофлавіну з позаклітинного середовища була досліджена на *S. cerevisiae* (Paalme et al., 2014; Abbas, Sibirny, 2011), і транспортер плазматичної мембрани Mch5p був ідентифікований як основний білок, відповідальний за поглинання рибофлавіну із середовища росту (Reihl, Stolz, 2005). Однак механізми, задіяні в утилізації екзогенного рибофлавіну або регуляції транспортера, досі невідомі. Водночас виробництво рибофлавіну шляхом мікробної ферментації є парадигмою біотехнологічного процесу, який прийшов на зміну хімічному синтезу в промисловості. Рибофлавін (вітамін В2) є водорозчинним вітаміном, попередником флавінаденідинуклеотиду (FAD) і флавімононуклеотиду (FMN), які є кофакторами в багатьох процесах окиснення-відновлення та відіграють важливу роль в енергетичному метаболізмі клітин. , і тому є важливим для здоров'я та розвитку людини. Рибофлавін не синтезується організмом людини, і його необхідно отримувати з їжею. Дефіцит рибофлавіну або пошкоджений транспорт рибофлавіну може викликати катаракту, неврологічні розлади, серцево-судинні аномалії та навіть рак. У даний час дефіцит рибофлавіну викликає занепокоєння як у країнах, що розвиваються, так і в розвинених країнах. Приблизно 70% промислово виробленого рибофлавіну використовується як кормова добавка, тоді як 30% використовується як жовтий барвник у харчовій промисловості та як лікарський засіб (Abbas and Sibirny, 2011; Kato and Park, 2012). Річний ринок цього вітаміну в 2024 році оцінюється в 451,57 мільйонів доларів США. На сьогодні хімічне виробництво рибофлавіну замінено мікробним синтезом, оскільки останній є одноетапною ферментацією, що знижує витрати виробництва, зменшує відходи, потреби в енергії, а також є більш сприятливим з екологічної точки зору, порівняно з хімічним синтезом.

Дріжджі є прототрофами за рибофлавіном і здебільшого виробляють невеликі кількості цього вітаміну, які відповідають їхнім потребам. Однак існує група дріжджів, відомих як флавіногенні організми, які здатні виробляти величезну кількість рибофлавіну (Dmytruk and Sibirny 2012). Дріжджі *Candida fatata* належать до найефективніших відомих продуцентів рибофлавіну. Штам-надпродуцент рибофлавіну був сконструйований шляхом одночасної надекспресії генів SEF1, RIB1 та RIB7 у надпродуценті *S. fatata* AF-4, що отриманий класичною селекцією (Dmytruk et al., 2014). *fatata* AF-4 (Dmytruk et al., 2014). Під час періодичної ферментації в 7-літровому лабораторному біореакторі сконструйований штам накопив до 16,4 г/л рибофлавіну в оптимізованому середовищі, що свідчить, що він є одним з найкращих продуцентів. Крім того, коли два модифіковані гени PRS3 (кодує PRPP-синтазу) і ADE4 (кодує PRPP-амідоферменту) з *Debaryomyces hansenii* були одночасно експресовані в цьому сконструйованому штамі, спостерігалось двократне збільшення продукції рибофлавіну (Dmytruk et al., 2020). Нещодавно було виявлено, що надекспресія генів RIB1 і RIB6, що кодує ферменти GTP циклогідролазу II і 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазу, які катализують початкові етапи синтезу рибофлавіну, підвищує продукцію рибофлавіну на 13–28% відносно батьківських штамів (Петровська та ін., 2022). Надлишок рибофлавіну накопичується в культуральному середовищі, а не в клітинах, що свідчить про існування спеціальних механізмів, залучених до виведення рибофлавіну. Відповідний білок і ген не були ідентифіковані в дріжджах. Було вивчено вплив надекспресії дріжджового гомолога білка екскреції рибофлавіну людини BCRP на продукцію рибофлавіну у флавіногенних дріжджах. Встановлено, що надекспресія гена *D. hansenii* RFE1 у раніше сконструйованому надпродуценті рибофлавіну *S. fatata* (Dmytruk et al., 2014) приводила до збільшення продукції рибофлавіну вдвічі (Tsygulnyuk et al., 2020). Активація синтезу рибофлавіну в *S. fatata* також була отримана внаслідок посилення експресії гена GND1, що кодує 6-фосфоглюконатдегідрогеназу, яка перетворює 6-фосфоглюконат на рибозозо-5-фосфат, аліфатичний попередник рибофлавіну (Ruchala et al. 2022).

Оскільки дріжджі *S. cerevisiae* продукують незначні кількості вітаміну В2, для початкового дослідження впливу рибофлавіну на процеси дегідратації-регідратації ми плануємо використати сконструйовані нами за допомогою методів класичної генетики та із застосуванням генетичної інженерії штами дріжджів *S. fatata*, здатні до продукції різної кількості рибофлавіну, а також опрацювати новий метод селекції спонтанних мутантів *S. cerevisiae*, здатних до підвищеної продукції вітаміну В2. Цей метод базується на довготривалому культивуванні дріжджів у середовищі зі зростаючими концентраціями селективного агента – природного аналога рибофлавіну – розеофлавіну (7-метил-8-диметиламін-(11-D)-ізоалкоказину). Як батьківський буде використано промисловий штам пекарських дріжджів. Методи генної інженерії дозволяють сконструювати штами пекарських дріжджів, здатні до надсинтезу рибофлавіну, проте в ряді країн існують обмеження на використання генетично модифікованих дріжджів для виробництва хліба.

Виконання запланованих досліджень дасть можливість не тільки з'ясувати вплив рибофлавіну на дегідратацію-регідратацію клітин у дріжджів, а й дослідити як змінюється вміст рибофлавіну та його похідних у кінцевому продукті-хлібі.

The yeast cell is the optimal model of eukaryotic cell that is more and more used in molecular biology, genetics, pharmacological and biomedicine studies this research is important also for the goals of biomedicine. Understanding of mechanisms and substances that provide cells stability in stress conditions can help to increase artificially the resistance of live organisms at complicated medical procedures and treatments. In addition, it is common knowledge that yeast is widely used in biotechnology for the production of various extremely important medicinal and other substances. They include insulin, vaccines are made from recombinant antigen of the hepatitis B virus (HBsAg), recombinant Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) which is an important

hematopoietic growth factor and immune modulator, hirudin that is one of the most potent natural thrombin inhibitors, some vitamins of B group including riboflavin (Abbas, Sibirny, 2011), vitamin D, beta-carotene, beta-glucans and others

A lot of last decades studies were devoted to the understanding of the reasons of such different resistance of yeasts to dehydration processes and to the attempts to find the ways for the essential improvement of this their resistance. The main results of these studies were described in a number of recent reviews (Rapoport et al., 2016, 2017, 2019, Sek et al., 2023). It was shown that practically all intracellular structures are influenced by dehydration-rehydration treatments and may be at least partially responsible for yeasts stability in these conditions. Yeasts, including industrially important species *Saccharomyces cerevisiae*, *Ogataea polymorpha* and others, are able to survive desiccation by entering a state of anhydrobiosis – a temporary reversible suspension of cell metabolism (Rapoport et al., 2019). This property is widely used now for the successful long-term maintenance of viability of microorganisms and large-capacity production of active dry baker's yeast. Active dry yeast preparations may be used also in winemaking, ethanol production and in breweries. They can be used also for the biotechnological production of various valuable compounds. During last decades the dehydration of yeast has attracted an increasing interest in some rather unexpected biotechnological tasks, for example dried yeasts can be used as efficient biosorbents of different pollutants, including heavy metals (Rapoport et al., 2016). At the same time a lot of the yeast strains necessary for these technologies are not resistant at dehydration-rehydration processes.

In an attempt to explain the essence of the state of anhydrobiosis and clarify the mechanisms responsible for its course, scientists have described various cellular compounds and structures that are responsible for it. These structures include the cell wall and plasma membrane, vacuoles, mitochondria, and lysosomes, among others, while the most important compounds include trehalose, glycogen, glutathione, and lipid droplets. Various proteins and genes are also responsible for the process of anhydrobiosis. Each factor has a specific function (Sek et al., 2023). Yeast cells respond rapidly and efficiently to the dehydration process, implementing mechanisms that already at its early stages lead to the accumulation of intracellular glycerol, which acts as an osmoprotectant. The rehydration process is also related to the activation of some genes of the fermentation pathway and the non-oxidative phase of the pentose-phosphate pathway, as well as genes related to ribosome biogenesis and protein synthesis. It is recognized that damage incurred by yeast cells during the process of dehydration and subsequent rehydration can also be attributed to oxidative stress (Dupont et al., 2014). This stress is closely associated with reactive oxygen species (ROS), which are generated as by-products of ATP production during oxidative phosphorylation within the respiratory chain. Consequently, mitochondria emerge as a primary source of ROS. The transition into the state of anhydrobiosis does not lead to serious damage to the genome of yeast cells. Most likely, this stability is related to specific intracellular reactions that provide the necessary protection of important structures and macromolecules (Sek et al., 2023). It is important to continue research for a deeper understanding of the mechanisms of anhydrobiosis, to identify new factors involved in dehydration-rehydration processes, as well as to expose various microorganisms to this process, since, despite significant progress, the detailed mechanisms of this reversible process remain unclear.

One of the interesting and promising areas of research is the use of yeast to enrich food and animal feed with vitamin B2. The possibility of cells obtaining riboflavin from the extracellular environment has been examined in *S. cerevisiae* (Paalme et al., 2014; Abbas, Sibirny, 2011) and the plasma membrane transporter *Mch5p* has been identified as the main protein in charge of the riboflavin uptake from the growth medium (Reihl, Stolz, 2005). However, the mechanisms involved in the utilization of exogenous riboflavin in the pathway or the transporter regulation are still unknown. At the same time, riboflavin production by microbial fermentation is a paradigm of a biotechnological process that has replaced chemical synthesis in the industry. Riboflavin (vitamin B2) is a water-soluble vitamin, the precursor of both flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN), which are essential coenzymes in many oxidation-reduction processes and play an important role in cell energy metabolism, and therefore is an essential micronutrient for human health and development. Riboflavin is not synthesized by the human body, and it must be obtained from ingested food. Riboflavin deficiency or defective transport of riboflavin has the ability to cause cataracts, neurological disorders, cardiovascular abnormalities, and even cancers. Currently, riboflavin deficiency raises concerns in both developing and developed countries. Approximately 70% of industrially produced riboflavin is used as a feed additive, while 30% is used as a yellow colorant in the food industry and as a drug for treatment (Abbas and Sibirny, 2011; Kato and Park, 2012). The annual market for this vitamin is estimated at USD 451.57 million in 2024. Currently chemical riboflavin production has been replaced by microbial synthesis because the last one is single step fermentation, diminishes production costs, reduces waste, energy requirements also is favorable relative to the chemical synthesis from the ecologic point of view.

Yeasts is prototrophs for riboflavin and mostly produce small amounts of this vitamin, which correspond to their needs. However, there is a group of yeasts known as flavinogenic organisms, which are able to produce huge amounts of riboflavin and accumulate it in the culture medium and in the cells (Dmytruk and Sibirny 2012). The yeast *Candida famata* belong to the most effective riboflavin overproducers known.

A riboflavin overproducing strain has been constructed by co-overexpression of the genes *SEF1*, *RIB1*, and *RIB7* in a non-reverting riboflavin producing *C. famata* AF-4 strain (Dmytruk et al., 2014). Under a fed-batch fermentation in a 7 L laboratory bioreactor, the constructed strain accumulated up to 16.4 g/L of riboflavin in optimized medium, representing one of the most known active riboflavin producers. Furthermore, when the two modified genes *PRS3* (encoding PRPP synthetase) and *ADE4* (encoding PRPP amidotransferase) from *Debaryomyces hansenii* were introduced and co-expressed in this constructed strain, a two-fold increase in riboflavin production is observed (Dmytruk et al., 2020). Recently it was found that overexpression of *RIB1* and *RIB6* genes coding for enzymes GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase, which catalase the initial steps of riboflavin synthesis, elevated riboflavin production by 13–28% relative to the parental riboflavin-overproducing strains (Petrovska et al., 2022). Overproduced riboflavin accumulates in the cultural medium rather than in the cells suggesting existence of the special mechanisms involved in riboflavin excretion. The corresponding protein and gene have not been identified in yeasts. The effects of overexpression of the yeast homolog of the human riboflavin efflux protein BCRP on riboflavin production in the flavinogenic yeast have been studied. It was found that overexpression of *D. hansenii* *RFE1* gene in previously constructed riboflavin overproducer *C. famata* (Dmytruk et al., 2011, 2014) led to near twice increase of riboflavin production (Tsyruhnyk et al., 2020). Activation of riboflavin synthesis in *C. famata* was also obtained after overexpression of the *GND1* gene coding for 6-phosphogluconate dehydrogenase which converts 6-phosphogluconate to ribulose-5-phosphate, the aliphatic precursor of riboflavin (Ruchala et al. 2022).

Since *S. cerevisiae* yeast produces small amounts of vitamin B2, for the initial study of the effect of riboflavin on dehydration-rehydration processes, we plan to use *C. famata* yeast strains constructed by us using the methods of classical genetics and with the use of genetic engineering, capable of producing different amounts of riboflavin, and also develop a new method of selection of spontaneous *S. cerevisiae* mutants capable of increased production of vitamin B2. This method is based on the long-term cultivation of yeast in an environment with increasing concentrations of a selective agent - a natural analog of riboflavin - roseoflavin (7-methyl-8-dimethylamine-(11-D)-isoalloxazine). Genetic engineering methods make it possible to construct baker's yeast strains capable of oversynthesis of riboflavin. However, in a number of countries there are restrictions on the use of genetically modified yeast for the production of bread.

Carrying out the planned research will make it possible not only to find out the effect of riboflavin on the dehydration-rehydration of yeast cells, but also to investigate how the content of riboflavin and its derivatives changes in the final product - bread.

### 3. Новизна проекту (до 1 сторінки A4, 12pt) / Novelty of the project (up to 1 A4 size sheet, 12 pt)

Особливістю пропонованого наукового проекту є поєднання фундаментальних наукових досліджень із прикладною біотехнологією. Цей проект є продовженням попередньої співпраці і ми плануємо дослідити вплив нових чинників на процеси дегідратації-регідратації у дріжджів. Зокрема, це стосується впливу високих концентрацій рибофлавіну, який продукується рекомбінантними штамами дріжджів *C. famata* внаслідок посилення експресії окремих структурних та регуляторних генів шляху біосинтезу цього вітаміну. Буде опрацьовано новий метод отримання штамів дріжджів

*S. cerevisiae* з підвищеною здатністю до синтезу рибофлавіну та досліджено їх толерантність до дегідратації та регідратації. Якщо життєздатність дегідратованих клітин *S. cerevisiae* з підвищеною продукцією рибофлавіну буде змінена порівняно з клітинами вихідного штаму, ці висновки будуть мати велике значення для тих дріжджів, які використовуються в промислових масштабах. Селекціоновані штами також можна використовувати як харчову добавку для сільськогосподарських і домашніх тварин.

A feature of the proposed scientific project is the combination of fundamental scientific research with applied biotechnology. This project is a continuation of the previous collaboration and we plan to investigate new aspects of the influence on dehydration-rehydration in yeast. In particular, this concerns the effect on dehydration-rehydration processes of high concentrations of riboflavin, which is produced by recombinant strains of *C. famata* yeast as a result of increased expression of some structural and regulatory genes of the biosynthesis pathway of this vitamin. A new method of obtaining *S. cerevisiae* yeast strains with an increased ability to synthesize riboflavin will be developed and their tolerance to dehydration and rehydration will be investigated. If the viability of dehydrated *S. cerevisiae* cells with an elevated content of riboflavin will be altered compared to the cells of parental strain, these findings would be of high importance for those yeast strains that are produced on an industrial scale. The selected strains can be also used as a food additive for farm and domestic animals.

**4. Очікувані наслідки від результатів проєкту, включаючи продовження співпраці в інших проєктах міжнародного співробітництва (до 1 сторінки A4, 12pt) / Expected impacts of project results, including continuation of cooperation in other international cooperation projects (up to 1 A4 size sheet, 12pt)**

Успішна реалізація основних цілей цього проєкту є важливою для фундаментальної біології та мікробіології. Очікувані наукові результати, отримані в цьому дослідженні, значною мірою сприятимуть розумінню того, чи може рибофлавін впливати на стійкість дріжджів до стресу, зокрема викликаного дегідратацією-регідратацією. Буде розроблено метод та отримано шляхом лабораторної еволюції штами пекарських дріжджів, здатні до підвищеної продукції рибофлавіну, які можуть бути використані для збагачення хліба цим вітаміном, а також як додаток до корму тварин.

Спільна реалізація цього проєкту сприятиме розвитку наукового співробітництва між Україною та Латвією в галузі наук про життя та біотехнологій. Обидві команди, які беруть участь у цьому проєкті, заснували у 2019 році першу Спільну міжнародну латвійсько-українську лабораторію біології мікробної клітини для розвитку академічної та освітньої співпраці та сприяння взаєморозумінню між двома установами. Реалізація запропонованого спільного дослідницького проєкту суттєво покращить можливості для подальшого розвитку співробітництва між Україною та Латвією.

Результати цього проєкту будуть опубліковані принаймні у 2 спільних наукових статтях у журналах, індексованих у Scopus, і спільно представлені принаймні на 3 міжнародних наукових конференціях. Під час реалізації цього проєкту планується спробувати знайти тему та консорціум у програмі ЕС HORIZON EUROPE, які б відповідали дослідницьким інтересам і пріоритетам обох країн і наших установ, та спільно підготувати заявку на проєкт у рамках цієї програми. Також шукатиметься можливість спільної участі в інших відповідних програмах міжнародного співробітництва.

The successful implementation of this project main goals is important for the basic biology and microbiology. The expected scientific results obtained in this study will greatly contribute to the understanding of whether riboflavin can affect the resistance of yeast to stress, in particular, caused by dehydration-rehydration. A method will be developed and obtained by laboratory evolution of baker's yeast strains capable of increased production of riboflavin, which can be used to enrich bread with this vitamin, as well as as an addition to animal feed.

Joint implementation of this project will promote the development of the research cooperation between Ukraine and Latvia in life sciences and biotechnology. Both teams participating in this project founded in 2019 first Joint International Latvian - Ukrainian Laboratory of Microbial Cell Biology for the development of academic and educational cooperation and promotion of mutual understanding between the two institutions. Implementation of proposed joint research project will essentially improve the possibilities for further development of the cooperation between Ukraine and Latvia.

Results of this project will be published in at least 2 joint scientific papers in Scopus indexed journals and jointly presented at least at 3 international scientific conferences. It is planned during realization of this project to try to find the topic and consortium in EU Programme HORIZON EUROPE suitable for the research interests and priorities of both countries and our institutions and jointly prepare the application for the project in the frame of this Programme.

The possibility to participate jointly also in other suitable international cooperation programs also will be searched.

**5. План роботи (робочі етапи) (далі – ПР) (до 1 сторінки A4, для кожного ПР, 12pt) / Work plan (work packages) (hereafter - WP) (up to 1 A4 size sheet, 12 pt, for each WP)**

№	П Р №	Назва ПР	Цілі ПР	Заплановані завдання ПР та їх розподіл серед партнерів проєкту
1	1.1	Флавіногенна активність штамів-продуцентів рибофлавіну <i>S. famata</i>	Провести скринінг сконструйованих нами раніше штамів <i>S. famata</i> щодо їх здатності до надсинтезу рибофлавіну за оптимальних умов вирощування та в середовищах з дефіцитом джерела карбону та нітрогену	Провести скринінг сконструйованих нами раніше штамів <i>S. famata</i> щодо їх здатності до надсинтезу рибофлавіну за оптимальних умов вирощування та в середовищах з дефіцитом джерела карбону та нітрогену. Відповідальність несе група українських дослідників
2	1.2	Підбір умов для дослідження впливу надсинтезу рибофлавіну штамами <i>S. famata</i> на виживання клітин за умов дегідратації-регідратації	Підібрати штами та оптимальні умови їх культивування для дослідження впливу різних концентрацій рибофлавіну на виживання клітин за умов дегідратації-регідратації	Підібрати штами та оптимальні умови їх культивування для дослідження впливу різних концентрацій рибофлавіну на виживання клітин за умов дегідратації-регідратації. Відповідальність несе група латвійських дослідників
3	1.3	Дослідження впливу надсинтезу рибофлавіну на виживання клітин штамів-надсинтетиків <i>S. famata</i> за умов дегідратації-регідратації	З'ясувати чи може рибофлавін впливати на стійкість клітин дріжджів <i>S. famata</i> до дії стресу, викликаного дегідратацією-регідратацією.	З'ясувати чи може рибофлавін впливати на стійкість клітин дріжджів <i>S. famata</i> до дії стресу, викликаного дегідратацією-регідратацією. Відповідальність несе група латвійських дослідників
4	1.4	Розробка методу адаптивної лабораторної еволюції для селекції штамів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , здатних до надсинтезу рибофлавіну	Розробити метод отримання штамів-продуцентів рибофлавіну у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> без застосування методів генетичної інженерії	Розробити метод отримання штамів-продуцентів рибофлавіну у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> без застосування методів генетичної інженерії. Відповідальність несе група українських дослідників

5	2.1	Селекція штамів з підвищеною продукцією рибофлавіну у дріжджів <i>S. cerevisiae</i>	Шляхом довготривалого культивування дріжджів <i>S. cerevisiae</i> у середовищі зі зростаючими концентраціями природного аналога рибофлавіну-розофлавіну (7-метил-8-вгметиламін-(11-D)-ізоаллоксазином отримати штами з підвищеним рівнем продукції рибофлавіну.	Шляхом довготривалого культивування дріжджів <i>S. cerevisiae</i> у середовищі зі зростаючими концентраціями природного аналога рибофлавіну-розофлавіну (7-метил-8-вгметиламін-(11-D)-ізоаллоксазином отримати штами з підвищеним рівнем продукції рибофлавіну. Відповідальність несе група українських дослідників
6	2.2	Біохімічна та генетична характеристика селекціонованих штамів	Оцінити здатність до акумуляції рибофлавіну в клітинах та в культуральному середовищі селекціонованими штамми, визначити активність деяких ферментів шляху біосинтезу рибофлавіну та рівень експресії генів, що кодують ключові ферменти.	Оцінити здатність до акумуляції рибофлавіну в клітинах та в культуральному середовищі селекціонованими штамми, визначити активність деяких ферментів шляху біосинтезу рибофлавіну та рівень експресії генів, що кодують ключові ферменти. Відповідальність несе група українських дослідників
7	2.3	Дослідження впливу надсинтезу рибофлавіну на виживання клітин штамів--надсинтетиків <i>S. cerevisiae</i> за умов дегідратації-регідратації	З'ясувати чи може рибофлавін впливати на стійкість клітин дріжджів <i>S. cerevisiae</i> до дії стресу, викликаного дегідратацією-регідратацією.	З'ясувати чи може рибофлавін впливати на стійкість клітин дріжджів <i>S. cerevisiae</i> до дії стресу, викликаного дегідратацією-регідратацією. Відповідальність несе група латвійських дослідників
8	2.4	Синтез рибофлавіну та виживання клітин за культивування штамів - надсинтетиків у промисловому середовищі для пекарських дріжджів та дослідження можливості використання селекціонованих штамів <i>S.cerevisiae</i> після дегідратації-регідратації для отримання хліба, збагаченого РФ.	Визначити вміст рибофлавіну у культурі штамів-надсинтетиків, вирощених у промисловому середовищі та в зразках хліба, виготовленого з використанням цих штамів.	Визначити вміст рибофлавіну у культурі штамів-надсинтетиків, вирощених у промисловому середовищі та в зразках хліба, виготовленого з використанням цих штамів. Відповідальність несуть українські та латвійські дослідники

№	WP No	WP title	WP objectives	WP planned tasks and their distribution among the Project Partners
1	1.1	Flavinogenic activity of riboflavin overproducers strains of <i>C. famata</i>	To screen our previously constructed <i>C. famata</i> strains for their ability to oversynthesize riboflavin under optimal growing conditions and in media with a deficit of carbon and nitrogen sources.	To screen our previously constructed <i>C. famata</i> strains for their ability to oversynthesize riboflavin under optimal growing conditions and in media with a deficit of carbon and nitrogen sources. Responsible group of Ukrainian researchers
2	1.2	Selection of conditions for the study of the effect of oversynthesis of riboflavin by <i>C. famata</i> strains on cell survival under dehydration-rehydration	Select strains and optimal conditions for their cultivation to study the effect of different concentrations of riboflavin on cell survival under conditions of dehydration-rehydration.	Select strains and optimal conditions for their cultivation to study the effect of different concentrations of riboflavin on cell survival under conditions of dehydration-rehydration. Responsible group of Latvian researchers
3	1.3	Study of the effect of oversynthesis of riboflavin on the survival of cells of overproducers of <i>C. famata</i> under conditions of dehydration-rehydration	To find out whether riboflavin can affect the resistance of <i>C. famata</i> yeast cells to stress caused by dehydration-rehydration.	To find out whether riboflavin can affect the resistance of <i>C. famata</i> yeast cells to stress caused by dehydration-rehydration. Responsible group of Latvian researchers
4	1.4	Development of a method of adaptive laboratory evolution for the selection of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains capable of oversynthesis of riboflavin	To develop a method for obtaining riboflavin-producing strains in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> without using genetic engineering methods	To develop a method for obtaining riboflavin-producing strains in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> without using genetic engineering methods. Responsible group of Ukrainian researchers
5	2.1	Selection of strains with increased production of riboflavin in the yeast <i>S. cerevisiae</i>	Obtain strains with an increased level of riboflavin production by long-term cultivation of yeast in the medium with increasing concentrations of the natural analogue of riboflavin-roseoflavin (7-methyl-8-β-methylamine-(11-D)-isoalloxazine).	Obtain strains with an increased level of riboflavin production by long-term cultivation of yeast in the medium with increasing concentrations of the natural analogue of riboflavin-roseoflavin (7-methyl-8-β-methylamine-(11-D)-isoalloxazine). Responsible group of Ukrainian researchers.
6	2.2	Biochemical and genetic characteristics of selected strains	To evaluate the ability to accumulate riboflavin in cells and in the culture medium of selected strains. to determine the activity of some enzymes of the riboflavin biosynthesis pathway and the expression level of genes encoding key enzymes.	To evaluate the ability to accumulate riboflavin in cells and in the culture medium of selected strains. to determine the activity of some enzymes of the riboflavin biosynthesis pathway and the expression level of genes encoding key enzymes. Responsible group of Ukrainian researchers
7	2.3	Study of the effect of oversynthesis of riboflavin on the survival of cells of overproducers of <i>S. cerevisiae</i> under conditions of dehydration-rehydration	To find out whether riboflavin can affect the resistance of <i>S.cerevisiae</i> yeast cells to stress caused by dehydration-rehydration.	To find out whether riboflavin can affect the resistance of <i>S.cerevisiae</i> yeast cells to stress caused by dehydration-rehydration. Responsible group of Latvian researchers
8	2.4	Synthesis of riboflavin and cell survival during the cultivation of overproducers in an industrial medium for baker's yeast and investigation of the possibility of using selected strains of <i>S.cerevisiae</i> after dehydration-rehydration to obtain bread enriched with riboflavin	To determine the content of riboflavin in the culture of overproducers grown in an industrial medium and in samples of bread made using these strains.	To determine the content of riboflavin in the culture of overproducers grown in an industrial medium and in samples of bread made using these strains. Both groups of researchers are responsible: Ukrainian and Latvian.

## 6. Графік виконання проєкту / Project implementation time schedule

№	Відповідне завдання ПР / Corresponding WP task (UA and EN)	Відповідальний / Responsible	1	1	1	1	2	2	2	2
			рік 1 кв.	рік 2 кв.	рік 3 кв.	рік 4 кв.	рік 1 кв.	рік 2 кв.	рік 3 кв.	рік 4 кв.
1	ПР 1.1 Флавіногенна активність штамів-продуцентів рибофлавіну <i>C. famata</i> / WP 1.1. Flavinogenic activity of riboflavin overproducers strains of <i>C. famata</i>	UA	+	+	-	-	-	-	-	-
2	ПР 1.2 Підбір умов для дослідження впливу надсинтезу рибофлавіну штамами <i>C. famata</i> на виживання клітин за умов дегідратації-регідратації / WP1.2. Selection of conditions for the study of the effect of oversynthesis of riboflavin by <i>C. famata</i> strains on cell survival under dehydration-rehydration	LV	+	+	-	-	-	-	-	-
3	ПР 1.3 Дослідження впливу надсинтезу рибофлавіну на виживання клітин штамів-надсинтетиків <i>C. famata</i> за умов дегідратації-регідратації / WP 1.3. Study of the effect of oversynthesis of riboflavin on the survival of cells of overproducers of <i>C. famata</i> under conditions of dehydration-rehydration	LV	-	-	+	+	-	-	-	-
4	ПР 1.4 Розробка методу адаптивної лабораторної еволюції для селекції штамів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , здатних до надсинтезу рибофлавіну / WP 1.4 Development of a method of adaptive laboratory evolution for the selection of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains capable of oversynthesis of riboflavin	UA	-	-	+	+	-	-	-	-
5	ПР 2.1 Селекція штамів з підвищеною продукцією рибофлавіну у дріжджів <i>S. cerevisiae</i> / WP 2.1 Selection of strains with increased production of riboflavin in the yeast <i>S. cerevisiae</i>	UA	-	-	-	-	+	+	-	-
6	ПР 2.2 Біохімічна та генетична характеристика селекціонованих штамів / WP 2.2 Biochemical and genetic characteristics of selected strains	UA	-	-	-	-	-	-	+	+
7	ПР 2.3 Дослідження впливу надсинтезу рибофлавіну на виживання клітин штамів-надсинтетиків <i>S. cerevisiae</i> за умов дегідратації-регідратації / WP 2.3 Study of the effect of oversynthesis of riboflavin on the survival of cells of overproducers of <i>S. cerevisiae</i> under conditions of dehydration-rehydration	LV	-	-	-	-	+	+	-	-
8	ПР 2.4 Синтез рибофлавіну та виживання клітин за культивування штамів - надсинтетиків у промисловому середовищі для пекарських дріжджів та дослідження можливості використання селекціонованих штамів <i>S. cerevisiae</i> після дегідратації-регідратації для отримання хліба, збагаченого РФ / WP 2.4 Synthesis of riboflavin and cell survival during the cultivation of overproducers in an industrial medium for baker's yeast and investigation of the possibility of using selected strains of <i>S. cerevisiae</i> after dehydration-rehydration to obtain bread enriched with riboflavin	UA and LV	-	-	-	-	-	-	+	+

## 7. Роль/Експертиза партнерів / Role/Expertise of the partners

Український партнер (до 1,5 сторінки A4, 12pt) / Ukrainian partner (up to 1,5 A4 size sheet, 12 pt):

Українська дослідницька група:

- Андрій Сибірний – український керівник проекту, д.б.н., професор, академік НАН України, директор Інституту біології клітини НАН України (Львів);
- Костянтин Дмитрук д.б.н., чл.-кор. НАН України, с.н.с
- Дарія Федорович – д.б.н., професор, провідний науковий співробітник
- Любов Фаюра – к.б.н., науковий співробітник
- Романов Сергій – аспірант

Керівник українського колективу – проф., д.б.н. Андрій Сибірний є одним із провідних світових дослідників дріжджової клітинної біології та біотехнології, який працює переважно з нетрадиційними дріжджами. У галузі біології клітин дріжджів він бере участь у вивченні аутофагії та відкрив три нові гени, що беруть участь у цьому процесі, досліджував механізми сенсінгу глюкози. У галузі біотехнології дріжджів він відомий роботами по створенню активних надпродуцентів рибофлавіну, FMN і FAD у дріжджів *Candida famata*. Він також створив сучасні продуценти етанолу з глюкози (*S. cerevisiae*) і ксилози (термотолерантні дріжджі *Ogataea polytorpha*), перший анаеробний продуцент гліцерину та продуцент глутатіону (також на *O. polytorpha*). А. Сибірний є автором понад 250 рецензованих наукових публікацій, понад 190 з них опубліковано в міжнародних журналах. Імпакт-фактор його публікацій за останні 5 років перевищує 163, h-індекс – 37, кількість цитувань – 14750. Автор 4 монографій та 27 розділів у монографіях, 2 методичних посібників та понад 30 авторських свідоцтв та патентів України, СРСР, США, Японії та Південної Кореї. Має великий досвід в управлінні та координації різноманітних вітчизняних та міжнародних дослідницьких проектів. Андрій Сибірний разом з Олександром Рапопортсом організують загальне керівництво проектом.

Українські дослідники мають значний досвід вивчення традиційних і різних нетрадиційних дріжджів. Дмитрук К.В. - фахівець у галузі метаболічної інженерії дріжджів. Його дослідження зосереджено на конструюванні рекомбінантних штамів дріжджів, які мають здатність продукувати різноманітні сполуки: вітамін B2, FMN та його похідні з антибіотичною активністю, гліцерин, глутатіон, а також етанол та інші спирти з різних субстратів, включаючи основні цукри лігноцелюлозної біомаси. Федорович Д.В. - фахівець у галузі біохімії, генетики та біотехнології нетрадиційних дріжджів. Основна тематика наукової діяльності: синтез рибофлавіну та флавінових нуклеотидів. Транспорт і регуляція заліза і хрому, біоремедіація важких металів. Фаюра Л.Р. – фахівець у галузі біохімії, біотехнології та мікробіології. Дослідження зосереджені на очищенні високомолекулярних та низькомолекулярних сполук, створенні активних продуцентів біологічно активних сполук Романов Сергій – аспірант, дисертаційна робота якого присвячена дослідженню регуляції біосинтезу рибофлавіну у дріжджів.

Досвід учасників української команди обов'язково буде додатково покращений у співпраці з латвійською командою. Увесь досвід учасників української команди обов'язково буде додатково покращений у співпраці з латвійською командою.

Лабораторія українського партнера добре оснащена для реалізації запропонованого проекту, включаючи таке обладнання, як центрифуги Sorvall та Eppendorf, спектрофотометр Helios; флюориметр Turner Quantech, системи електрофорезу ДНК та білка, флуоресцентний мікроскоп Carl Zeiss Axio Imager A1, система HPLC PerkinElmer, серія 2000, електронний та конфокальний мікроскопи, підсилювач Applied Biosystem 9700 PCR, лабораторний ферментер Applison, електричні ваги Brutor, рН-метри, ламінарні витяжні шафи, стерильні бокси, автоклави та термостати, а також усі необхідні хімікати та матеріали.

Команда співпрацює з колегами з США, Швеції, Франції, Бельгії, Австрії, Словаччини, Польщі, Ізраїлю, Латвії, Литви, Білорусі, Таїланду, Китаю

Ukrainian research team consists of 5 scientists. One of them is young researcher (Sergij Romanov)

He is PhD-student

Ukrainian research team:

- Andriy Sibirny – Ukrainian team project leader, Dr. habil. Biol., Member of National Academy of Sciences of Ukraine, Director of the Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine (Lviv);
- Kostiantyn Dmytruk PhD, DrSci,

, Corresponding Member of National Academy of Sciences of Ukraine, Senior Scientist

- Dariya Fedorovych – Dr.Sci. Professor – leader scientist
- Lubov Fayura – PhD, scientist
- Sergiy Romanov –PhD student

Ukrainian team leader - Prof., Dr.habil.biol. Andriy Sibirny is one of world leading researchers in yeast cell biology and biotechnology, working mostly with non-conventional yeasts. In the yeast cell biology field, he is involved in studying autophagy and discovered three new genes involved in this process, studied glucose sensing in the field of yeast biotechnology, he is known for the works on construction of the robust riboflavin, FMN and FAD overproducers in the yeast *Candida famata*. He also constructed advanced ethanol producers from glucose (*S. cerevisiae*) and xylose (thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*), the first anaerobic glycerol producer and overproducer of glutathione (also on *O. polymorpha*). A. Sibirny is author of over 250 peer-reviewed scientific publications, more than 190 of them have been published in international journals. His impact factor of publications over the past 5 years exceeds 163, his h-index is 37 and number of citations without self-citations is 14750. Author of 4 monographs and 27 chapters in monographs, 2 methodical manuals and more than 30 copyright certificates and patents of Ukraine, USSR, USA, Japan and South Korea.. He has big experience in the management and coordination of various local and international research projects. Andriy Sibirny together with Aleksandrs Rapoport will arrange general project management.

Ukrainian researchers have profound experience in studying conventional and different non-conventional yeasts. Dmytruk K.V. – specialist in the field of metabolic engineering of yeast. His research is focused on the construction of recombinant yeast strains that have the ability to produce various voluble compounds, such as vitamin B2, FMN and its derivatives with antibiotic activity, glycerol, glutathione as well as ethanol and other alcohols from different substrates including main sugars of lignocellulosic biomass. Fedorovych D.V. - specialist in the field of biochemistry, genetics and biotechnology of non-conventional yeasts. The main topics of research activities: riboflavin and flavin nucleotide synthesis. Transport and regulation of iron and chromium, bioremediation of heavy metals. Fayura L.R. - specialist in the field of biochemistry, biotechnology and microbiology. Research is focused on the purification of high-molecular and low-molecular compounds, the creation of active producers of biologically active compounds. Serhiy Romanov is a PhD student whose dissertation is devoted to research on the regulation of riboflavin biosynthesis in yeast.

Based on the provided information, it could be concluded that the team of the project is highly qualified and prepared for successful work on the current proposal. All the experience of Ukrainian team members will definitely be additionally improved in their cooperation with Latvian team.

The laboratory of the Ukrainian partner is well equipped to implement the proposed project, including such equipment as Sorvall and Eppendorf centrifuges, Helios spectrophotometer; Turner Quantech fluorimeter, DNA and protein electrophoresis systems, Carl Zeiss Axio Imager A1 fluorescence microscope, HPLC PerkinElmer system, Series 2000, electron and confocal microscopes, Applied Biosystem 9700 PCR amplifier, Applicon laboratory fermenter, Bruter electric rollers scales, pH meters, laminar flow cabinets, sterile boxes, autoclaves and thermostats, as well as all necessary chemicals and materials.

The team has world-wide cooperation with colleagues from USA, Sweden, France, Belgium, Austria, Slovakia, Poland, Israel, Latvia, Lithuania, Belarus, Thailand, China

Основні публікації науковців, які беруть участь у проєкті щодо теми проєкту (5 публікацій) / Major publications of the researchers involved in the project on the subject of the project (specify 5 publications):

1. Dmytruk, K. V., V. Y. Yatsyshyn, N. O. Sybirna, D. V. Fedorovych and A. A. Sibirny (2011). Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production. *Metab Eng* 13(1): 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.005>
2. Dmytruk KV, Ruchala J, Fedorovych DV, Ostapiv RD, Sibirny AA. Modulation of the purine pathway for riboflavin production in flavinogenic recombinant strain of the Yeast *Candida famata*. *Biotechnol J*. 2020. <https://doi.org/10.1002/biot.201900468>
3. Tsyryulnyk AO, Andreieva YA, Ruchala J, Fayura LR, Dmytruk KV, Fedorovych DV, Sibirny AA. Expression of yeast homolog of the mammal BCRP gene coding for riboflavin efflux protein activates vitamin B2 production in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Yeast*. 2020; 37:467–73. <https://doi.org/10.1002/yea.3470>
4. Ruchala J, Andreieva Y. A., Tsyryulnyk A.O., Sobchuk S. M., Najdecka A., Wen, Liu, Kang Yingqian, Dmytruk O. V., Dmytruk K. V., Fedorovych D. V, Sibirny A. A. (2022). Cheese whey supports high riboflavin synthesis by the engineered strains of the flavinogenic yeast *Candida famata*. *J. Microbial Cell Factories*, 21,161. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01888-0>
5. Dmytruk, K. V., Ruchala, J., Fayura, L. R., Chrzanowski, G., Dmytruk, O. V., Tsyryulnyk, A. O., Andreieva, Y. A., Fedorovych, D. V., Motyka, O. I., Mattanovich, D., Marx, H., & Sibirny, A. A. Efficient production of bacterial antibiotics aminoriboflavin and roseoflavin in eukaryotic microorganisms, yeasts// *Microb Cell Fact.* – 2023. – 22(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02129-8>
6. Fedorovych, D. V., Tsyryulnyk, A. O., Ruchala, J., Sobchuk, S. M., Dmytruk, K. V., Fayura, L. R., & Sibirny, A. A. Construction of the advanced flavin mononucleotide producers in the flavinogenic yeast *Candida famata*// *Yeast* (Chichester, England), 2023. 40(8):360-366. doi: 10.1002/yea.3843
7. Dzanaeva L.S., Wojdyła D., Fedorovych D. V, Ruchala J., Dmytruk K. V, Sibirny A. A. Riboflavin overproduction on lignocellulose hydrolysate by the engineered yeast *Candida famata* *FEMS Yeast Research*, , 2024, 24, foae020, <https://doi.org/10.1093/femsyr/foae020>

Латвійський партнер (до 1,5 сторінки A4, 12pt) / Latvian partner (up to 1,5 A4 size sheet, 12 pt):

Латвійська дослідницька група складається з 4 науковців. Один із них молодий дослідник (Лінда Розенфельде захистила докторську дисертацію у 2018 році), а інший (Едгарс Даусс) зараз готує кандидатську дисертацію, яку планує захистити у 2025 році.

Латвійська дослідницька група:

- Александрс Рапопортс – латвійський керівник проєкту, доктор хабіл. біол., дійсний член Латвійської академії наук, член Європейської академії мікробіології, керівник лабораторії клітинної біології Інституту мікробіології та біотехнології Латвійського університету.
- Галіна Хрустальова – доктор біол., провідний науковий співробітник;
- Лінда Розенфельде – доктор біол., науковий співробітник (молодий дослідник);
- Edgars Dauss – MSc, дослідник (PhD буде захищено)

Керівник латвійської групи – проф., д-р хабіл.біол. Олександр Рапопорт є одним із провідних світових дослідників у вивченні дегідратації-регидрації (ангідробіозу) у дріжджів. Олександр Рапопортс працює в цій галузі вже багато десятиліть і є автором ряду оглядів, присвячених узагальненню наших сучасних уявлень про основні механізми, пов'язані з переходом еукаріотичної клітини в стан ангідробіозу. Він має великий досвід управління та координації різноманітних місцевих та міжнародних (двосторонніх, тристоронніх, а також ЄС FP) дослідницьких проєктів. Олександр Рапопортс організує загальний менеджмент проєкту. Науковий колектив складається з досвідчених дослідників – мікробіологів і біохіміків, які працюють з різними аспектами фізіології мікроорганізмів і здатні виконати всі завдання запланованих досліджень. Доктор Галіна Хрустальова має понад 30 років досвіду роботи в галузі фізіології, біохімії та біотехнології мікроорганізмів. Її кандидатська дисертація була пов'язана з вивченням ангідробіозу дріжджів. Пройшла стажування в інститутах Франції, Швеції та США. Доктор Лінда Розенфельде здобула освіту з медичної фізики та біології та в 2018 році успішно захистила кандидатську дисертацію на тему, пов'язану із захисними реакціями клітин і біотехнологічним застосуванням дріжджів. Вона також пройшла міжнародне навчання. MSc Edgars Dauss почав працювати в команді вже з початку підготовки своєї дисертації бакалавра. Його докторська робота присвячена подальшому розвитку наших знань про внутрішньоклітинні захисні механізми при дегідратації-регидрації дріжджів і важливості деяких раніше недооцінених клітинних органел в цих умовах. Увесь досвід латвійських граців одночасно буде додатково покращений у співпраці з українською командою. Члени латвійської команди працюють у сучасних лабораторіях Будинку природи Академічного центру Латвійського університету, який відкрив свої двері в 2015 році. Лабораторія має все необхідне обладнання для проведення запланованих досліджень, включаючи шейкери-інкубатори для



культивування мікробів, спектрофотометри, центрифуги, обладнання для електрофорезу та вестерн-блоттингу, газова хроматографія, HPLC, RT-qPCR, різні мікроскопи, включаючи флуоресцентні та скануючі електронні мікроскопи, мають можливість використовувати атомно-силовий мікроскоп, FTIR та інше обладнання. Команда співпрацює по всьому світу з колегами зі США, Швеції, Франції, Італії, Великобританії, Португалії, Чехії, Словаччини, Польщі, Хорватії, України, Литви, Естонії, Тайваню, Японії.

Latvian research team consists from 4 scientists. One of them is young researcher (Linda Rozenfelde defended her PhD thesis in 2018) and another one (Edgars Daus) is preparing now his PhD thesis which he plans to defend in 2025.

Latvian research team:

- Aleksandrs Rapoport – Latvian team project leader, Dr. habil. Biol., Full Member of Latvian Academy of Sciences, Member of European Academy of Microbiology, Head of Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia.
- Galina Hrustalova – Dr. biol., leading researcher;
- Linda Rozenfelde – Dr. biol., researcher (young researcher);
- Edgars Daus – MSc, researcher (PhD will be defended)

Latvian team leader - Prof., Dr.habil.biol. Aleksandrs Rapoport is one of world leading researchers in the studies of dehydration-rehydration (anhydrobiosis) in yeasts. Aleksandrs Rapoport works in this area already for many decades and is an author of a number of reviews devoted to the summary of our current understanding of main mechanisms that are linked with eukaryotic cell transfer into the state of anhydrobiosis. He has big experience in the management and coordination of various local and international (bilateral, trilateral as well as EU FP) research projects. Aleksandrs Rapoport will arrange general project management. Scientific team consists from the experienced researchers – microbiologists and biochemists which are working with different aspects of microorganisms physiology and are able to fulfill all the tasks of the planned studies. Dr. Galina Khroustalyova has more than 30 years of the experience in physiology, biochemistry and biotechnology of microorganisms. Her PhD thesis was linked with the studies of yeast anhydrobiosis. She has got training in the institutes of France, Sweden and USA. Dr. Linda Rozenfelde has got education in medical physics and biology and in 2018 successfully defended her PhD thesis on the topic that was connected with cells protective reactions and biotechnological applications of yeasts. She also has got an international training. MSc Edgars Daus started to work in the team already from the beginning of the preparation of his BSc thesis. His PhD study is devoted to further development of our knowledge on intracellular protective mechanisms at dehydration-rehydration of yeasts and importance of some earlier underestimated cellular organelles in these conditions. All the experience of Latvian team members definitely will be additionally improved in their cooperation with Ukrainian team. Latvian team members are working in the modern laboratories of the House of Nature of Academic Centre of University of Latvia that opened its doors in 2015. The laboratory has all necessary equipment for the implementation of planned research including microbial cultivation shakers-incubators, spectrophotometers, centrifuges, electrophoresis and western blotting equipment, gas chromatography, HPLC, RT-qPCR, various microscopes, including fluorescence and scanning electron microscopes, have possibility to use atom force microscope, FTIR and other equipment. The team has world-wide cooperation with colleagues from USA, Sweden, France, Italy, UK, Portugal, Czech Republic, Slovakia, Poland, Croatia, Ukraine, Lithuania, Estonia, Taiwan, Japan.

Основні публікації науковців, які беруть участь у проєкті щодо теми проєкту (5 публікацій) / Major publications of the researchers involved in the project on the subject of the project (specify 5 publications):

- Guzhova I, Krallish I, Khroustalyova G, Margulis B, Rapoport A. Dehydration of yeast: changes in the intracellular content of Hsp 70 family proteins. Proc Biochem 2008; 43(10): 1138-1141
- Dupont S, Rapoport A, Gervais P, Beney L. The survival kit of Saccharomyces cerevisiae for anhydrobiosis (Review). Appl Microbiol Biotechnol 2014; 98 (21): 8821-8834
- Rapoport A, Turchetti B, Buzzini P. Application of anhydrobiosis and dehydration of yeasts for non-conventional biotechnological goals (Review). World J Microbiol Biotechnol. 2016; 32(6):104
- Rapoport A. Anhydrobiosis and dehydration of yeasts (Review). In: Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi (Ed. A.Sibirny). Springer International Publishing, 2017, 87-116
- Kulikova-Borovikova D, Khroustalyova G, Chang C-R, Daugelavicius R, Yurkiv M, Ruchala J, Sibirny A, Rapoport A. Anhydrobiosis in yeast: glutathione overproduction improves resistance to dehydration of a recombinant Ogataea (Hansenula) polymorpha strain. Process Biochem. 2018; 71:41–44.

## 8. Відрадженьня / Business trips

Відрадженьня до Латвії / Business trips to Latvia

№	ПІБ, посада / Name, surname, position	Мета візиту / Purpose of the visit	Рік / Year	Тривалість візиту (до 30 днів за рік) / Duration of the visit
1	Сибірний А.А., директор / Sibirny A.A. director	Обмін результатами проєкту, обговорення планів подальших досліджень / Exchange with project results, discussions of further research plans	2025	4
2	Сибірний А.А., директор / Sibirny A.A. director	Обмін результатами проєкту / Exchange with project results, training in Riga laboratory	2026	4

Відрадженьня в Україну / Business trips to Ukraine

№	Ім'я, прізвище, посада / Name, surname, position	Мета візиту / Purpose of the visit	Рік / Year	Тривалість візиту / Duration of the visit
1	Олександр Рапопорт, Керівник проєкту / Aleksandrs Rapoport, Project leader	Обмін результатами та обговорення подальших наукових планів / Exchange with project results, discussions of further research plans	2025	5
2	Лінда Розенфельд, дослідник / Linda Rozenfelde, Researcher	Обмін результатами, стажування у львівській лабораторії / Exchange with project results, training in Lviv laboratory	2025	5
3	Галина Хрустальова, дослідник / Galina Khroustalyova, Leading researcher	стажування у львівській лабораторії / Exchange with project results, training in Lviv laboratory	2026	5
4	Едгарс Даусс, дослідник / Edgars Daus, Researcher	Обмін результатами, стажування у львівській лабораторії / Exchange with project results, training in Lviv laboratory	2026	5

**9. Витрати на реалізацію проєкту для українського партнера, грн / Project implementation costs for Ukrainian partner, UAH**

Витрати	Рік 1, UAH	Рік 2, UAH
<b>1. Прямі витрати / Direct costs:</b>	<b>169150</b>	<b>169150</b>
1.1. Витрати на оплату праці, включаючи податки / Remuneration of the research staff employed in the project, including Compulsory State Social Insurance Contributions	99500	99500
1.2. Матеріали, необхідні для виконання робіт, крім спекустаткування / Materials, consumables supplies and similar products	53650	50650
1.3. Витрати на службові відрядження (згідно з запланованими відрядженнями) (відповідно до Постанови КМУ від 02.02.2011 №98) / Travel expenses (Specify planned business trips):	16000	19000
<b>2. Непрямі витрати (не більше 15 % від загального обсягу витрат) / Indirect costs (up to 15% of the total direct costs of the project)</b>	<b>29850</b>	<b>29850</b>
Разом*, грн / Total, UAH	199000	199000

\* - розрахункова сума на фінансування проєкту залежить від затвердженого бюджету на відповідний рік і орієнтовно становить приблизно 199 тис. грн на рік

<b>10. Чи надавалось раніше по темі проєкту державне фінансування? / Has the topic of the project previously received state funding?</b>	Hi / No Роки / years: -
<b>Якщо «Так», то вказати на необхідність та відмінність досліджень, які пропонуються / If "Yes", then indicate necessity and differences of proposed project</b>	-

**Інтелектуальна власність:** Кожна сторона несе відповідальність за моніторинг захисту інтелектуальної власності, створеної в межах Проєкту відповідно до міжнародних угод, підписаних Сторонами.

**Intellectual property:** Each party is responsible for monitoring the protection of the intellectual property created under the Project in accordance with international agreements signed by the Parties.

Українська сторона підтверджує, що дослідження за цією тематикою проєкту не фінансуватимуться з державного бюджету протягом 2025-2026 років в межах іншого/-их конкурсів. У разі отримання фінансування цього проєкту з державного бюджету – заявки на проведення досліджень з цієї тематики не будуть подаватися на інші конкурси протягом періоду реалізації проєкту.

The Ukrainian side confirms that research on this topic of the project will not be funded from the state budget during 2025-2026 within the framework of other call/(-s). In case of receiving funding for this project from the state budget – applications for research on this topic will not be submitted to other calls during the project implementation period.

Ми погоджуємось, що Міністерство освіти і науки України (Міністерство) та Латвійська Рада науки (Рада) буде обробляти персональні дані, що містяться в проєкті, шляхом адміністративної оцінки проєкту та публікуватиме проєкти, затверджені для реалізації на вебсайтах Міністерства та Ради.

We agree that the Ministry of Education and Science of Ukraine (Ministry) and the Latvian Council of Science (LZP) will process personal data contained in the project through the administrative evaluation of the project and the publication of the supported projects on the Ministry's and the LZP's website.

Додатки / Attachments:

a) супровідний лист / a cover letter;

<https://ntd.nauka.gov.ua/uk/form/file/38/b008ecd071645437b28b541484b6e70767115503a574b95e23d41adc03b013dd.pdf>

b) лист-підтвердження від латвійського партнера-керівника проекту / a confirmation letter from the Latvian Team Leader of mutual cooperation in English language (scanned copy of the letter is allowed);

<https://ntd.nauka.gov.ua/uk/form/file/38/51c0a4df6600f8007177a5a498995fd04ae55f366b77445f047286498ffd0c4e.pdf>

c) документ про відсутність в заявці та додатках до неї інформації з обмеженим доступом / Document on the absence of restricted information in the application and its annexes;

<https://ntd.nauka.gov.ua/uk/form/file/38/821b21510e2c0e138d8cf81ed6a5fc85d94e520e35dd04784e009597d09515f7.pdf>

d) CV українського та латвійського наукових керівників проекту / CV of Ukrainian and Latvian Team Leader.

<https://ntd.nauka.gov.ua/uk/form/file/38/c8ddccfc4d574de7e33ecfed4aefb4f47ac3c6b91d09597d09515f7.pdf>

**Латвійський партнер (LV) / Latvian partner (LV):**

<b>Науковий керівник / Principal investigator</b>	Керівник лабораторії клітинної біології Інституту мікробіології та біотехнології Латвійського університету, співдиректор Спільної міжнародної латвійсько-української лабораторії мікробної клітинної біології / Head of Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia, Co-director of Joint International Latvian-Ukrainian Laboratory of Microbial Cell Biology
	(посада / position)
<b>ПІБ / Name and surname</b>	Олександр Рапопорт / Alexander Rapoport
<b>Дата / Date</b>	_____
<b>Підпис / Signature</b>	_____
<b>Керівник установи / Legal representative of the institution</b>	Проректор з наукової роботи / Vice-Rector for Research
	(посада / position)
<b>ПІБ / Name and surname</b>	Гунтарс Кітенберґс / Guntars Kitenbergs
<b>Дата / Date</b>	_____
<b>Підпис / Signature</b>	_____
<b>Печатка / Stamp</b>	

**Український партнер (UA) / Ukrainian Partner (UA):**

<b>Науковий керівник / Principal investigator</b>	Директор Інституту біології клітини НАН України / Director of Institute of Cell Biology NAS of Ukraine
	(посада / position)
<b>ПІБ / Name and surname</b>	Сибірний Андрій Андрійович / Andriy Sibirny
<b>Дата / Date</b>	_____
<b>Підпис / Signature</b>	_____
<b>Керівник установи / Legal representative of the institution</b>	Директор Інституту біології клітини НАН України / Director of Institute of Cell Biology NAS of Ukraine
	(посада / position)
<b>ПІБ / Name and surname</b>	Сибірний Андрій Андрійович / Andriy Sibirny
<b>Дата / Date</b>	_____
<b>Підпис / Signature</b>	_____

