

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КІЛТИНИ

ЦИРУЛЬНИК АНДРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ



УДК 579.017.7: 579.258

**НОВІ ЧИННИКИ, ЗАЛУЧЕНІ В РЕГУЛЯЦІЮ
СИНТЕЗУ ФЛАВІНІВ У ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FALMATA***

03.00.07 – мікробіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів - 2023

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі молекулярної генетики і біотехнології

Інституту біології клітини НАН України

**Науковий
керівник:**

доктор біологічних наук, професор, академік НАН України
Сибірний Андрій Андрійович
Інститут біології клітини НАН України,
директор, завідувач відділу молекулярної генетики і
біотехнології

**Офіційні
опоненти:**

доктор біологічних наук, професор, академік НАН України
Підгорський Валентин Степанович
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного
НАН України,
радник дирекції

доктор медичних наук, професор
Корнійчук Олена Петрівна
Львівський національний медичний університет імені
Данила Галицького,
завідувач кафедри мікробіології

Захист відбудеться 20 липня 2023 року о 14⁰⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.246.01, Інститут біології клітин НАН України, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології клітин НАН України, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16

Автореферат розісланий 16 червня 2023 року

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.б.н.



Н.С. Фінюк

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Рибофлавін (РФ) – це вітамін В₂, що є метильованим похідним трициклічної сполуки ізоалоксазину і спирту рибітолу. Організми ссавців нездатні до власного синтезу цього вітаміну і його надходження забезпечується із продуктів харчування. Потрапляючи в організм, РФ перетворюється в біологічно активні форми – флавінмононуклеотид і флавінаденіндинуклеотид, які беруть участь у багатьох біологічних процесах, серед яких енергетичний обмін, формування імунної відповіді, розвиток і функціонування нервової системи, метаболізм амінокислот, вітамінів, репарація ДНК та інше. Дефіцит РФ спричиняє сповільнення росту плода, порушення функціонування слизових оболонок та нервової систем. У медицині, його активно використовують для лікування катаракти, мігрені, малярії, хвороби Паркінсона, дерматозів різної етіології тощо. Внесення РФ як кормової добавки при годівлі тварин суттєво підвищує надій молока у корів та яйценосність у курей, що робить ведення фермерських господарств більш ефективним та прибутковим.

На сьогодні виробництво РФ здійснюється головню з використанням генетично модифікованих мікроорганізмів – бактерій *Bacillus subtilis* та міцеліальних грибів *Ashbya gossypii*. У минулому, дріжджовий надсинтетик *der8 Candida famata* активно використовувався для отримання РФ фірмою ADM (США). Проте через низьку генетичну стабільність, його використання було зупинено (Abbas and Sibirny, 2011). Світовий ринок РФ станом на 2021 рік складає близько 400 мільйонів американських доларів при виробництві цього вітаміну до 12 тис. тон на рік. Основна частина (до 80%) РФ використовується у тваринництві для виробництва кормів. Інша – застосовується у харчовій, медичній та косметологічній галузях промисловості. Конструювання рекомбінантних штамів мікроорганізмів, які здатні до надпродукції РФ, є важливим напрямком сучасної мікробіології, основною метою якого є здешевлення мікробного виробництва РФ.

Особливої уваги заслуговують флавінові сполуки які проявляють не про-, а антибіотичну дію. До них належать похідні РФ – розеофлавін (РоФ) та його метаболічний попередник амінорибофлавін (АФ). Ці сполуки синтезують у природі ґрунтові бактерії *Streptomyces davaonensis* та *S. cinnabarinus*. Вони виявляють виражену антибіотичну активність на низку патогенних бактерій, зокрема, золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) та його метицилін-резистентні штами (MRSA). На відміну від РоФ, АФ діє лише на бактерійні клітини, не проявляючи цитотоксичної дії щодо клітин ссавців. Це відкриває широкі перспективи для його використання в медицині. Слід зауважити, що отримання згаданої вище антибіотичної сполуки АФ здійснюється лише хімічним шляхом і в невеликих кількостях, що не дозволяє активно використовувати цей флавін у медичній практиці. Тому, конструювання рекомбінантних штамів дріжджів, здатних до надсинтезу АФ, є абсолютно новим та пілотним напрямком досліджень, розпочатим саме в Інституті біології клітини НАН України у Львові.

Проведена нами робота дозволила одержати низку нових рекомбінантних штамів дріжджів із підвищеним рівнем синтезу рибофлавіну, а також вперше створити дріжджовий продуцент бактерійної антибіотичної сполуки – амінорибофлавіну.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у межах наукових тем Інституту біології клітини НАН України: «Генетичний контроль біосинтезу та транспорту рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (№ держ. реєстрації 0115U001362, 2015-2019); «Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмів: алкогольної ферментації, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глютатіону» (№ держ. реєстрації 0116U002209, 2016-2019); «Вивчення механізму дії нових генів в регуляції синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Candida famata*» (№ держ. реєстрації 0119U001677, 2019-2020); «Ідентифікація та з'ясування ролі нових структурних та регуляторних генів у надсинтезі рибофлавіну у флавіногенних дріжджів» (№ держ. реєстрації 0121U10926, 2021-2025) та українсько-австрійського проєкту «Рекомбінантні штами дріжджів *Komagataella phaffii*, що продукують флавінові антибіотики амінорибофлавін та розеофлавін» (№ держ. реєстрації 0120U103405, 2020-2021); НФДУ «Створення дріжджових продуцентів нових флавінових антибіотиків» (№ держ. реєстрації 0120U104114, 2020-2021).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи була розробка та використання нових підходів генної інженерії для створення покращених та нових штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata*, здатних до надпродукції рибофлавіну і флавінового похідного – амінорибофлавіну.

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

1. З'ясувати можливості посилення продукції РФ дріжджами *C. famata* завдяки надекспресії дріжджового гомолога гена РФ-екскретази *BCRPI* ссавців – *RFE1_Dh*.
2. Сконструювати покращені штами-надсинтетики РФ дріжджів *C. famata* шляхом надекспресії гена транскрипційного фактора *SEF1* під контролем лактозо-індуцибельного промотора *LAC4*.
3. Проаналізувати можливість використання відходів виробництва молочної продукції – молочної сироватки та виробництва біопалива – неочищеного технічного гліцеролу як культуральних середовищ для мікробного синтезу РФ.
4. Сконструювати дріжджові продуценти бактерійної антибіотичної сполуки АФ за використання гетерологічної експресії модифікованого гена *rosB* бактерій *S. dawaonensis* у дріжджовому надсинтетичу ФМН *C. famata*.

Об'єкт дослідження: мікробіологічний синтез РФ і АФ та регуляція цього процесу в дріжджів *C. famata*.

Предмет дослідження: нові чинники, залучені в регуляцію синтезу флавінів у дріжджів *C. famata*, та конструювання рекомбінантних штамів дріжджів із підвищеною здатністю до надпродукції флавінів.

Методи досліджень. Для конструювання та аналізу одержаних рекомбінантних штамів дріжджів *C. famata* використовували генетичні, мікробіологічні та біохімічні методи: полімеразну ланцюгову реакцію, ендонуклеазну рестрикцію ДНК, лігування фрагментів ДНК, генетичну трансформацію бактерій і дріжджів. Також широко

використовували комп'ютерні бази даних відповідних генів та методи комп'ютерного аналізу. Кількісну оцінку флавіногенної активності проводили з використанням методів флуориметрії, спектрофотометрії, мас-спектрометрії та хроматографічного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено, що надекспресія введеного у дріжджі *S. famata* дріжджового гена РФ-екскретази *RFE1_Dh*, який знайдений як аналог гена *BCRPI* ссавців, викликає значне збільшення продукції РФ. Одержані результати мають важливе значення для подальшого вивчення ролі механізмів транспорту флавінів у процесах регуляції продукції РФ у дріжджів. Це відкриває нові шляхи для створення та покращення існуючих дріжджових надсинтетиків РФ. Виявлено суттєве збільшення рівня продукції РФ у штамів *S. famata* які містять додатково введений ген транскрипційного фактора *SEF1*. Використання лактозо-індуцибельного промотора дозволило досягнути збільшення продукції РФ у середовищах з лактозою, що підтверджує важливу роль цього транскрипційного фактора в активації флавіногенезу. Встановлено, що дріжджі *S. famata* здатні рости і синтезувати РФ у середовищах, які містять лактозу як єдине джерело Карбону, зокрема, дешевий побічний продукт виробництва сирів – молочну сироватку. Підтверджено здатність до незначного росту дріжджів *S. famata* у середовищі з очищеним гліцеролом, проте росту не спостерігали при використанні неочищеного гліцеролу, незважаючи на застосування детоксуючого агента – глауконіту. Вперше, методом генної інженерії створено дріжджовий продуцент амінорибофлавіну – бактерійної антибіотичної сполуки. Введення адаптованого до дріжджової кодонової системи бактерійного гена *rosB S. davaonensis* у дріжджовий надсинтетик ФМН *S. famata* дозволило отримати рекомбінантний штам, здатний синтезувати АФ. Ця флавінова сполука виявляє бактеріостатичну дію проти золотистого стафілокока, в т. ч. його метицилін-резистентних штамів MRSA, і є потенційним протиінфекційним лікарським препаратом.

Практичне значення одержаних результатів. Введення генів РФ-екскретази *RFE1* і транскрипційного фактора *SEF1* у попередньо створені штами – надсинтетики РФ *S. famata* дозволило підвищити продукцію цього вітаміну приблизно в 1,5 раза. На спосіб отримання покращеного продуцента РФ шляхом посилення екскреції цього вітаміну отримано патент України на винахід та патент України на корисну модель. Використання лактозо-індуцибельного промотора гена *LAC4* дозволяє проводити вирощування рекомбінантних штамів на лактозовмісних субстратах. Цей підхід є важливим, оскільки використання дешевого побічного продукту молочної промисловості – молочної сироватки як культурального середовища для мікробного синтезу РФ дозволить знизити вартість промислового виробництва цього вітаміну. Запропонований підхід – експресія центрального регулятора біосинтезу РФ під контролем лактозо-індуцибельного промотора *LAC4* може бути використаний також для конструювання штамів, здатних до надсинтезу інших флавінових сполук, зокрема, ФМН, ФАД та АФ.

Сконструйовано дріжджовий продуцент АФ, який володіє вибірковою антибіотичною дією на низку патогенних бактерій, зокрема, метицилін-резистентні штами MRSA. Він може слугувати основою для проведення подальших генетичних

маніпуляцій з метою отримання промислового дріжджового продуцента цього перспективного лікарського засобу. На спосіб одержання флавінового антибіотика – АФ отримано патент України на корисну модель.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто або спільно із науковим керівником розроблено план проведення експериментальної частини роботи, апробовано та використано низку сучасних молекулярно-генетичних методів. Роботу виконано у відділі молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України. Експериментальні дослідження проведено автором самостійно або спільно із співавторами публікацій. Автором опрацьовано відповідну наукову літературу за темою дисертації. Аналіз одержаних результатів досліджень, підготовку публікацій за темою дисертації проведено разом із науковим керівником та співавторами публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено як тези усних та стендових доповідей. Результати роботи доповідались на VII Міжнародній Вейгелівській конференції (Львів, Україна, 2017); Міжнародній конференції «Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application» (Жешів, Польща, 2018); Міжнародній конференції "Advances in Microbiology and Biotechnology» (Львів, Україна, 2018); VI Українському конгресі з клітинної біології із міжнародним представництвом «6-th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation» (Яремче, Україна, 2019); VIII Конгресі європейських мікробіологів «8-th Congress of European Microbiologists» (Глазго, Шотландія, 2019); 35-му міжнародному спеціалізованому дріжджовому симпозиумі» (Анталія, Туреччина, 2019); Міжнародному симпозиумі «International BioThreat Reduction Symposium» (участь в інтернет-online режимі, 2021); Форумі «World Microbe Forum» (участь в інтернет-online режимі, 2021).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових праць: 5 статей у фахових журналах (3 з яких у міжнародних виданнях) (Scopus), 1 патент України на винахід, 2 патенти України на корисну модель та 10 тез доповідей, представлених на наукових конференціях, з'їздах та конгресах. Сумарний імпаکت фактор (IF) публікацій – 9,4.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить розділи: Анотація, Вступ, Огляд літератури, Матеріали та методи, Результати та їх обговорення, Аналіз та узагальнення результатів, Висновки та Список використаних джерел, Додаток. Дисертацію викладено на 176 сторінках. Робота містить 36 рисунків та 12 таблиць. Список використаної літератури складає 203 джерела.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Огляд літератури. У цьому розділі розглянуто дані про роль та основні функції флавінів у метаболізмі клітини. Детально висвітлено процес біосинтезу РФ різними видами мікроорганізмів, з акцентом на флавіногенних дріжджах. Описано механізми регуляції цього процесу в бактерій, дріжджів та міцеліальних грибів. Розглянуто системи транспорту РФ дріжджовими клітинами. Наведено основні новітні підходи до конструювання мікробних надсинтетиків РФ із використанням генної інженерії для їх подальшого застосування у промисловому виробництві цього вітаміну. Окремо, висвітлено процес біосинтезу флавінів, що мають антибактерійну дію – РоФ та АФ у бактерій, а також описано механізми їх дії на низку патогенних бактерій. Виходячи із представленого огляду джерел літератури, обґрунтовано важливість проведення досліджень за темою дисертаційної роботи.

Матеріали і методи досліджень. Експериментальні дослідження проводили із використанням реактивів, ензимів та аналітичних наборів таких фірм: «Sigma», «NEB», «Promega», «Difco» (США); «Fermentas» (Литва); «Roth» (Німеччина) та інших. У роботі було використано штами дріжджів *Candida famata*, *Debaryomyces hansenii* та бактерії *Streptomyces davaonensis*, *Escherichia coli*. Штами дріжджів вирощували у поживних середовищах: YPD (Ausuber et al., 2003), YPL (замість глюкози використано лактозу 2%), YNB (Difco) та Беркгольдера. Бактерії *E. coli* ДНа вирощували у середовищі LB (Ausuber et al., 2003). Для бактерій *S. davaonensis* використали середовища, склад яких опубліковано (Matsui et al., 1979). Для селекції трансформантів застосовували антибіотики відповідно до використаних плазмід: флеоміцин (20-30 мг/л), норзеотрицин (5-10 мг/л), мікофенольну кислоту (20-25 мг/л). Дослідження росту і флавіногенезу дріжджів проводили також у молочній сироватці польської фірми «Mlekovita» з вмістом лактози 2,5-15% з або без додавання амоній сульфату $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 г/л).

Для пошуку та аналізу нуклеотидних послідовностей генів та промоторів дріжджів *C. famata* та *D. hansenii*, а також розробки ПЛР-праймерів використовували електронні бази даних: <http://genome.jgi-psf.org>, <http://yeastgenome.org>, <http://ncbi.nlm.gov/BLAST>, <http://tools.neb.com/NEBcutter2> і <https://www.thermofisher.com>, <http://basic.northwest.edu/biotools/oligocalc.html> та <http://bioinformatics.org>.

Сумарну ДНК дріжджів *C. famata* та *D. hansenii* виділяли, використовуючи модифіковану методику для *S. cerevisiae* (Johnston, 1994). Плазмиди pUC57 (Thermo Fisher Scientific, США), pTb (Dmytruk et al., 2006; Dmytruk et al., 2011), pNTC/pLAC4_{ca} - SEF1_{cf} (Andreieva et al., 2020) були використані для конструювання експресійних касет із цільовими генами та генами стійкості до антибіотика. У роботі використовували ПЛР-праймери фірм «IDT Technologies» та «Sigma» (США). Ампліфікацію ДНК фрагментів проводили як описано (Sambrook, 1989) із використанням приладу GeneAmps PCR System 9700 (Applied Biosystems Foster City, США). ДНК аналізували методом електрофоретичного розділення у гелі агарози та очищали на колонках «Quiagen» (Quiagen PCR purification kit, США). Конструювання рекомбінантних штамів та виділення плазмідної ДНК бактерій проводили методами, описаними раніше (Sambrook, 1989). За необхідності,

плазмідну ДНК високого ступеня чистоти отримували, використовуючи Wizards Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, США). Для проведення полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (Real Time PCR), РНК із клітин дріжджів виділяли, використовуючи набір реагентів «GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit with DNase I» (EURx Ltd, Польща). Ампліфікацію проводили за використання приладу Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System та набору реактивів «SG OneStep qRT-PCR kit» (EURx Ltd., Польща). Як матрицю для ПЛР, використовували виділену РНК клітин та барвник ROX для нормалізації свічення інтеркалюючих барвників «Syber Green» відповідно до протоколу від виробника. Результати, одержані із трьох повторів, представляли як відносну кількісну оцінку RQ (Relative quantification). Нормалізацію зразків проводили за рівнем експресії гена *ACT1*. Конструювання плазмід проводили згідно з опублікованими методиками (Sambrook, 1989). Селекцію трансформованих колоній здійснювали шляхом посіву на агаризоване середовище з антибіотиком. Одержані препаративні кількості бактерійної плазмідної ДНК лінеаризували та вводили у реципієнтні штами дріжджів *S. famata* за методикою, описаною раніше (Voronovsky et al., 2002) із певними модифікаціями. Аналіз флавіногенної активності та росту одержаних рекомбінантних штамів дріжджів проводили спектрофотометрично з використанням спектрофотометра Thermo Scientific Spectrometer Helios Epsilon (Fisher Scientific UK Ltd., Велика Британія) та флуориметра Turner Quantech Digital Filter Fluorometer FM109510-23 (США) із фільтром збудження NB440 та емісії SC535. Попередній аналіз продукції амінорибофлавіну (АФ) проводили методами хроматографії на папері у розчині 5% Na₂HPO₄ та спектрофотометрії (за піком поглинання для АФ – 478 нм). Більш ґрунтовний мас-спектрометричний аналіз одержаного АФ проведено у Жешівському університеті (Польща) в рамках договору про співпрацю. Визначення вмісту флавінів у клітинах дріжджів та отримання безклітинних екстрактів проводили описаними методами (Струговщикова, 1963, Dmytruk et al., 2011). Вміст білка визначали методом Лоурі (Lowry et al., 1951). Активність ферменту ГТФ-циклогідролази II здійснювали після діалізу безклітинного екстракту, як описано раніше (Shavlovskiy, Logvinenko, Kashchenko, 1976). Статистичну обробку одержаних результатів проводили стандартними методами. Наведені графіки та діаграми представляють середні значення, отримані за результатами трьох вимірювань однотипових дослідів. Середня похибка визначалась із середньої квадратичної похибки. На графіках вона відображена у вигляді вертикальної лінії біля кожного значення. Різницю у величинах вважали достовірною на основі показника вірогідності різниці «t» (критерій Ст'юдента). Відмінність даних приймали за достовірну при значенні ймовірності різниці «p» меншою 0,05 (Мельниченко та ін., 2006). Результати дослідів представляли у вигляді графіків та таблиць із середніми значеннями ± стандартне відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Конструювання рекомбінантних штамів *Candida famata* із надекспресією гена РФ-екскретази дріжджів *Debaryomyces hansenii* – *RFE1_Dh*. Одним із способів підвищення продукції цільових метаболітів є посилення їх екскреції. Проведено клонування та введено в геном надсинтетика BRP (Best Riboflavin Producer) (Dmytruk et al., 2011) гена РФ-екскретази. Слід зазначити, що подібно до ситуації із дріжджами *Pichia guilliermondii*, система екскреції у *C. famata* описана, проте транспортні білки та відповідні гени все ще не ідентифіковані. На теперішній час, геном дріжджів *C. famata* лише частково секвеновано, тому для пошуку гомологічного гена та його подальшого клонування використали добре вивчений та повністю секвенований генوم близького до дріжджів *C. famata* виду *D. hansenii* CBS767. Білок *bcrp1* ссавців (кодується генем *BCRP1*) забезпечує транспорт РФ із клітин молочної залози у молоко. Тому нами проведено пошук ДНК-последовностей, гомологічних гену *BCRP1 Homo sapiens* (NP_001335914.1) в електронній базі даних геному дріжджів *D. hansenii*. Це дозволило виявити ген DEHA2C03784g (29% ідентичності, 49% подібності, 5% прогалин), який показав найбільшу схожість із генем *BCRP1 H. sapiens*. Ідентифікований ген *D. hansenii* одержав назву *RFE1_Dh* (RiboFlavin Excretase) та був введений у геном дріжджів штаму BRP *C. famata* під контролем сильного промотора *TEF1*. Методом ПЛР у реальному часі було підтверджено надекспресію цього гена в реципієнтному штамі порівняно із контролем (Рис.1).

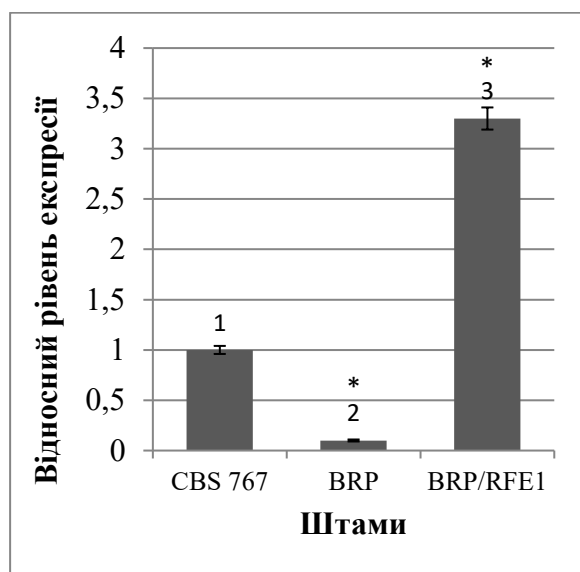


Рис. 1. Аналіз відносних рівнів експресії гена *RFE1_Dh* штаму *Debaryomyces hansenii* методом ПЛР в реальному часі. 1) експресія гена *RFE1_Dh* у дикого штаму *D. hansenii* (CBS 767); 2) у реципієнтного штаму BRP *Candida famata*; 3) у рекомбінантного штаму BRP/*RFE1 C. famata*, трансформованого плазмідом з генем *RFE1_Dh*, під контролем конститутивного промотора *TEF1 C. famata*. * – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

У результаті проведеної роботи сконструйовано рекомбінантні штами-надсинтетики РФ BRP/*RFE1 C. famata*, які містять ген РФ-екскретази *RFE1_Dh*.

Аналіз флавіногенної активності рекомбінантних штамів *Candida famata*, які експресують ген *RFE1_Dh Debaryomyces hansenii* при рості у різних середовищах. Продукцію флавінів визначали за умов вирощування дріжджів у різних культуральних середовищах. Усі використані в експерименті трансформанти виявили підвищену продуктивність синтезу РФ порівняно із реципієнтним штамом BRP *C. famata* (Рис. 2).

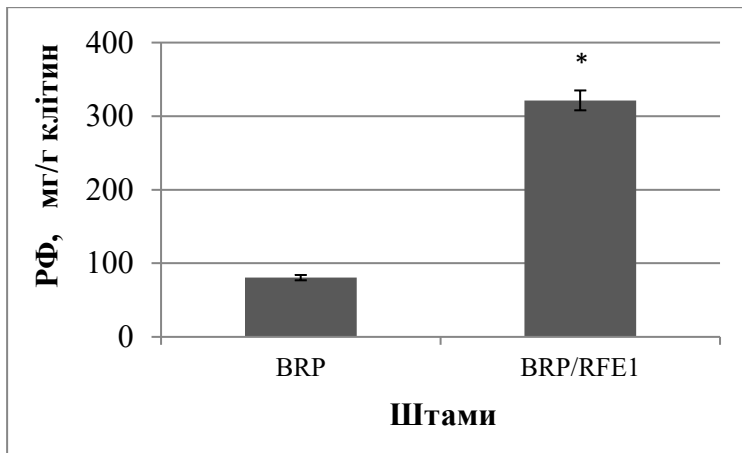


Рис. 2. Продуктивність синтезу РФ реципієнтним штамом BRP та рекомбінантним штамом BRP/RFE1 *Candida famata* з надекспресованим геном *RFE1_Dh Debaryomyces hansenii*. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Штам BRP/RFE1 *C. famata* характеризується максимальним (до 300 мг РФ/г сухих клітин) збільшенням виходу РФ. Реципієнтний штам BRP та похідний від нього рекомбінантний штам BRP/RFE1 вирощували у середовищі YPD упродовж 120 годин, аналізуючи рівень продукції флавінів після 24, 48, 72, 78 та 120 год. вирощування (Рис. 3).

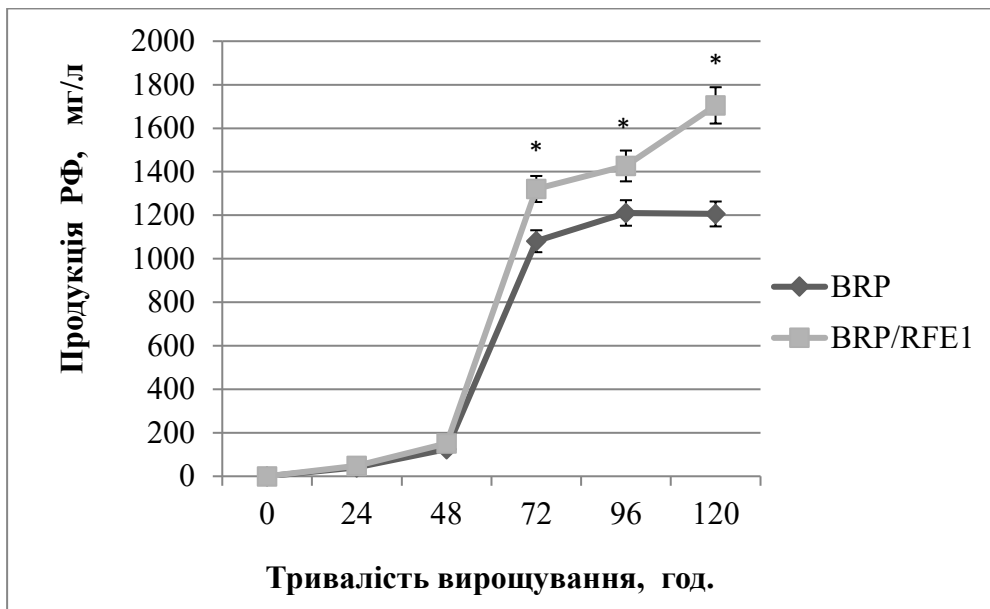


Рис. 3. Кінетика продукції РФ штамми BRP та BRP/RFE1 *Candida famata*, вирощеними у середовищі YPD упродовж 120 год. Чорна лінія із кружками – продукція РФ реципієнтним штамом BRP; сіра лінія із квадратами – продукція РФ рекомбінантним штамом BRP/RFE1, який надекспресує введений ген *RFE1_Dh* під контролем конститутивного промотора *TEF1 C. famata*. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Штам BRP/RFE1 *C. famata* характеризується збільшенням продукції РФ порівняно з батьківським штамом уже на 72 год. вирощування в середовищі YPD та на 120 год. досягав 1698 мг/л. Як і очікувалось, вміст флавінів у клітинах трансформантів BRP/RFE1 виявився нижчим порівняно з реципієнтним штамом BRP, оскільки введений ген екскретази повинен забезпечувати саме викид РФ із клітини у культуральне середовище (Рис. 4).

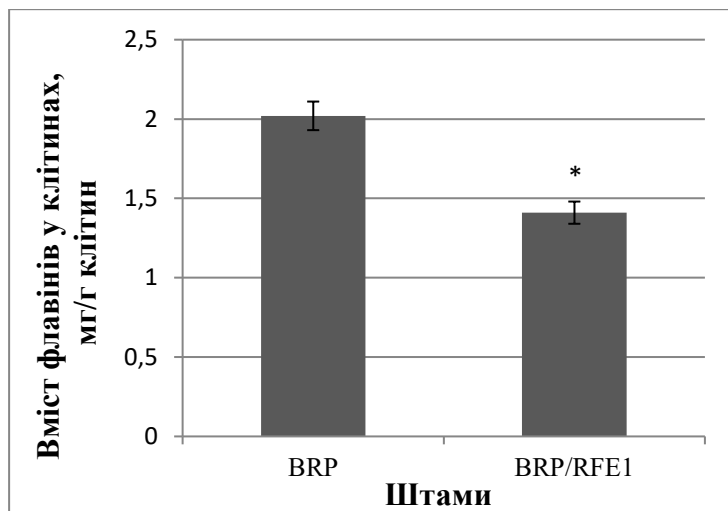


Рис. 4. Вміст флавінів у клітинах реципієнтного штаму BRP і рекомбінантного штаму BRP/RFE1 *Candida famata*, що містить введений ген *RFE1_Dh* після 68 год. вирощування у середовищі Беркгольдера.
* – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Для прикладу, вміст внутрішньоклітинних флавінів у клітинах рекомбінантного штаму BRP/RFE1 *C. famata* був у 1,5 раза нижчий порівняно з реципієнтним штамом. Цікаво, що подальший аналіз трансформанта BRP/RFE1 показав підвищення питомої активності першого ферменту синтезу РФ – ГТФ-циклогідролази II, (кодується геном *RIB1*) у 2 рази порівняно з реципієнтним штамом BRP (Табл. 1).

Таблиця 1

Активність ГТФ-циклогідролази II у клітинах дикого штаму VKMY-9 та рекомбінантах BRP і BRP/RFE1 *Candida famata*

Штами	Активність ГТФ-циклогідролази II, (Од/мг білка) x 10 ⁻⁵
VKMY-9	3,70 ± 0,11
BRP	37,45 ± 1,31*
BRP/RFE1	82,62 ± 4,13*

* – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Крім цього, рівні експресії генів *RFE1_Dh* та *RIB1* (ген, що кодує фермент першої реакції біосинтезу РФ) в трансформанта BRP/RFE1 також виявились вищими відносно реципієнтного штаму BRP *C. famata* (Табл. 2).

Таблиця 2

Аналіз експресії генів *RFE1_Dh* і *RIB1* у відносних одиницях в диких штамів VKMY-9, CBS767 та рекомбінантах BRP і BRP/RFE1 *Candida famata*

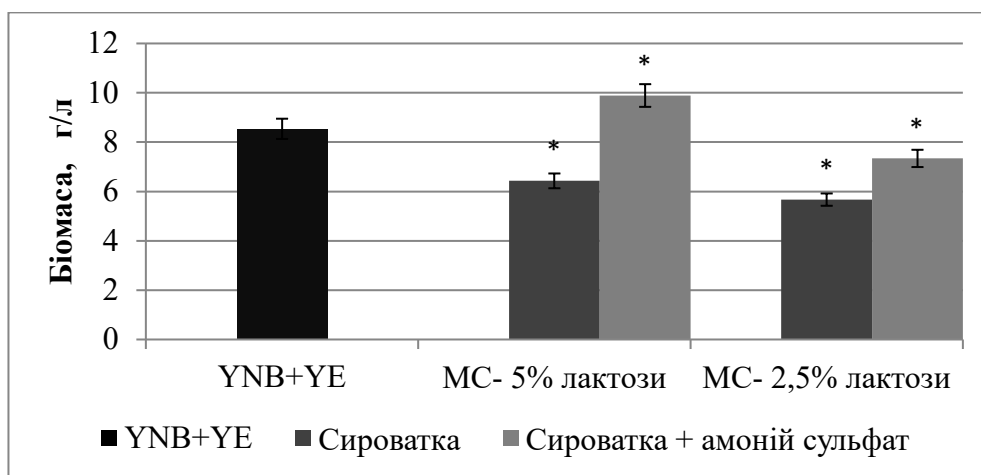
Штами / Гени	<i>RFE1_Dh</i>	<i>RIB1</i>
VKMY-9	-	1 ± 0,123
CBS767	1 ± 0,098	-
BRP	-	50,08 ± 8,172*
BRP/RFE1	3,5 ± 0,682*	91,03 ± 12,610*

* – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

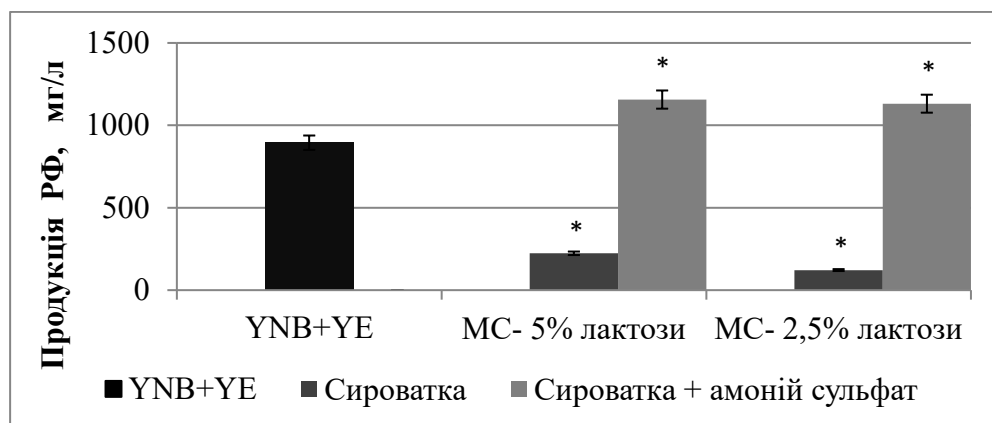
Стандартизацію мРНК проводили відносно мРНК гена *ACT1*.

Збільшення експресії структурного гена флавіногенезу *RIB1* та питомої активності ферменту ГТФ-циклогідролази II в результаті надекспресії дріжджового гена РФ-екскретази *RFE1_Dh* виявлено нами вперше. Механізм його виникнення потребує подальшого детального вивчення.

Аналіз флавіногенної активності штамів BRP та BRP/RFE1 *Candida famata* при використанні молочної сироватки як поживного середовища. Використання молочної сироватки (МС) з вмістом лактози 2,5 і 5%, а також при внесенні як додаткового джерела Нітрогену – амоній сульфату $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ забезпечило активний ріст та високий флавіногенез дріжджових надсинтетиків РФ (Рис. 5).



А



Б

Рис. 5. Біомаса (А) та продукція РФ (Б) штамом BRP/RFE1 *Candida famata* за умов вирощування у середовищі YNB+YE та молочної сироватці з вмістом лактози 2,5 та 5 %. Для вирощування використовували сироватку з або без додавання $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Тривалість вирощування – 120 год. * – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

Як додаткове джерело Нітрогену, можуть бути використані також сечовина та діамоній гідрофосфат. Отримані дані підтверджують можливість використання МС як ефективного та дешевого культурального середовища, а також необхідності внесення додаткового джерела Нітрогену в МС. У концентрованій МС із вмістом

лактози 7% ріст клітин значно нижчий та повністю припиняється при 12% лактози. Пригнічення росту, ймовірно, спричиняють високі концентрації солей або інших компонентів концентрованої молочної сироватки.

Аналіз флавіногенної активності рекомбінантних штамів *Candida famata*, які експресують ген *RFE1_Dh Debaryomyces hansenii*, при рості у середовищі з гліцеролом як джерелом Карбону. Використання основного відходу виробництва біодизелю – гліцеролу як альтернативного джерела Карбону у промисловому мікробіологічному виробництві РФ є одним із важливих напрямків здешевлення цього виробництва та захисту довкілля (Da Silva et al., 2009, Semkiv et al., 2020).

Нами виявлено, що рекомбінантний штам дріжджів BRP/RFE1 *C. famata*, який експресує ген *RFE1_Dh*, здатний рости і синтезувати невисокий рівень (до 100 мг/л) РФ у середовищі YNB з додаванням очищеного гліцеролу (2 %) як джерела Карбону (Рис. 6).

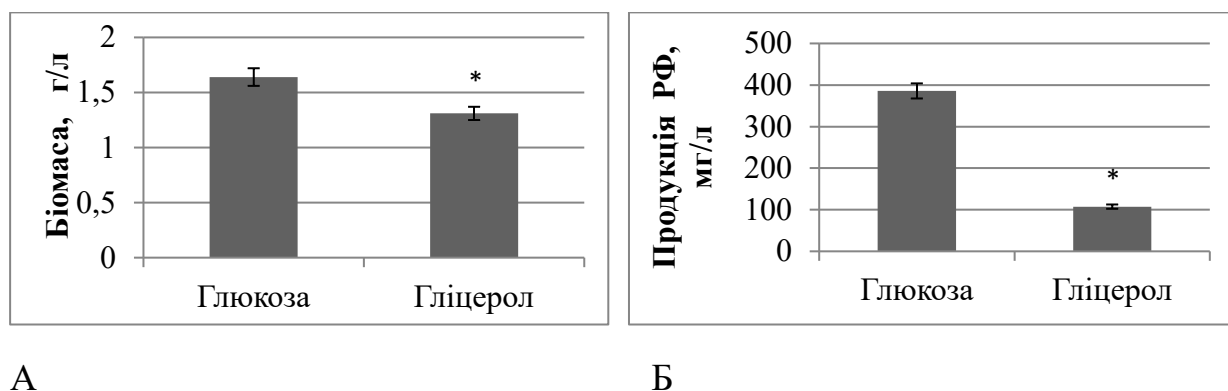


Рис. 6. Біомаса (А) і продукція РФ (Б) рекомбінантним штамом BRP/RFE1 *Candida famata*, який експресує ген *RFE1_Dh*, у середовищі з гліцеролом як джерелом Карбону. * – статистично достовірні зміни «р» $\leq 0,05$.

У наступному експерименті, нами використано як додаткове джерело Карбону – технічний неочищений гліцерол, який є відходом виробництва біопалива, очищення якого є фінансово не рентабельним процесом (Santibanez et al., 2011). Однак, за цих умов дріжджі *C. famata* нездатні до росту та продукції РФ, ймовірно, через значний вміст токсичних домішок. Внесення глауконіту як сорбційного матеріалу для токсичних сполук (Smith et al., 1996) не привело до росту та продукції РФ в середовищі з технічним гліцеролом.

Конструювання штамів дріжджів *Candida famata* із надекспресією гена транскрипційного фактора *Sef1* під контролем лактозо-індуцибельного промотора *LAC4*. Для можливості підвищення активності флавіногенезу рекомбінантних штамів дріжджів у середовищах із лактозою як джерела Карбону, в т.ч. молочної сироватки, нами сконструйовано та введено у геном найкращих штамів-надсинтетиків РФ *C. famata* AF-4, BRP, BRPI (Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2020) та BRP/RFE1 (ця робота) додаткову копію гена *SEF1 C. famata* під контролем лактозо-індуцибельного промотора гена *LAC4* (кодує β -галактозидазу) (Corredor et al., 2003). Дані, одержані методом ПЛР в режимі реального часу,

засвідчили збільшення рівня експресії гена *SEF1* за вирощування у лактозовмісних середовищах порівняно з глюкозовмісним середовищем (Табл. 3).

Таблиця 3

ПЛР аналіз у реальному часі рівня експресії гена *SEF1* у відносних одиницях в клітинах штаму AF-4/prLAC4-SEF *Candida famata*, вирощених в середовищі YNB з різними джерелами Карбону

Штам та тип Карбону в середовищі	<i>SEF1</i>
AF-4/prLAC4-SEF (глюкоза) / (глюкоза)	1,00
AF-4/prLAC4-SEF (лактоза) / (глюкоза)	1,74 ± 0,056*
AF-4/prLAC4-SEF (сироватка) / (глюкоза)	1,84 ± 0,159*

Отримані результати підтверджують функціональну активність плазмиди pNTC/prLAC4-SEF у геномі рекомбінантних штамів *C. famata*. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Аналіз флавіногенної активності рекомбінантних штамів *Candida famata* які експресують додаткову копію гена *SEF1* під контролем промотора *LAC4*, за різних умов вирощування. Усі проаналізовані штами характеризуються підвищеним синтезом РФ в лактозовмісних середовищах (YNB із лактозою та в сироватці) порівняно з батьківськими штамами. Найвища продукція РФ рекомбінантними штамами AF-4/prLAC4-SEF1 у середовищі YPL із 2% лактозою сягала максимуму на 3-добу (Рис. 7).

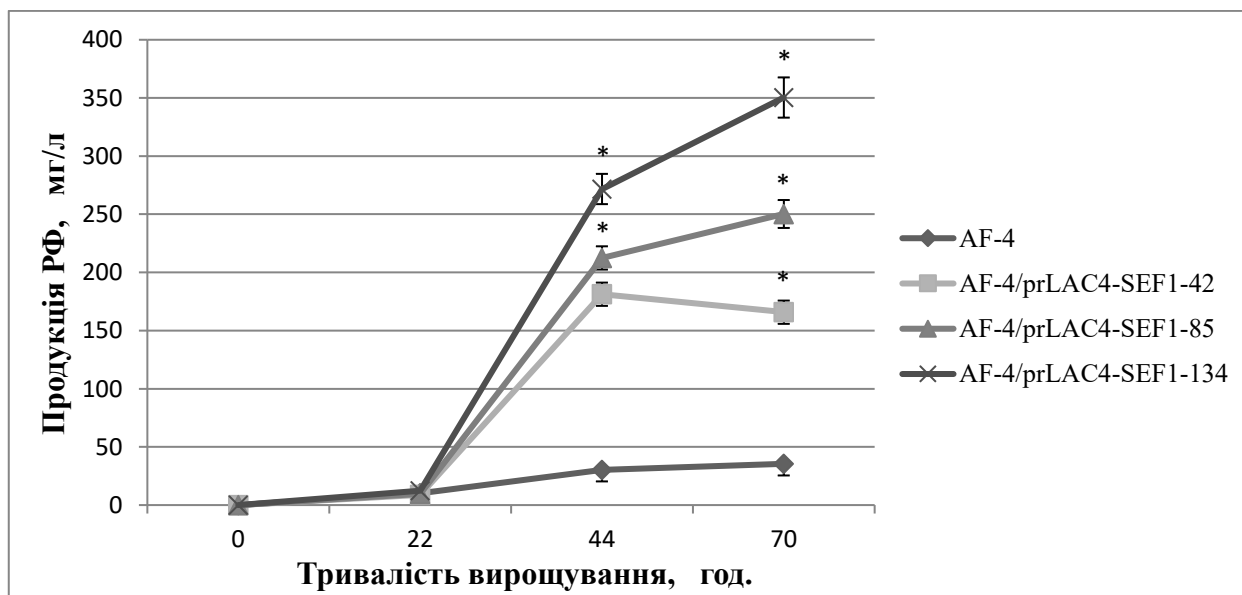
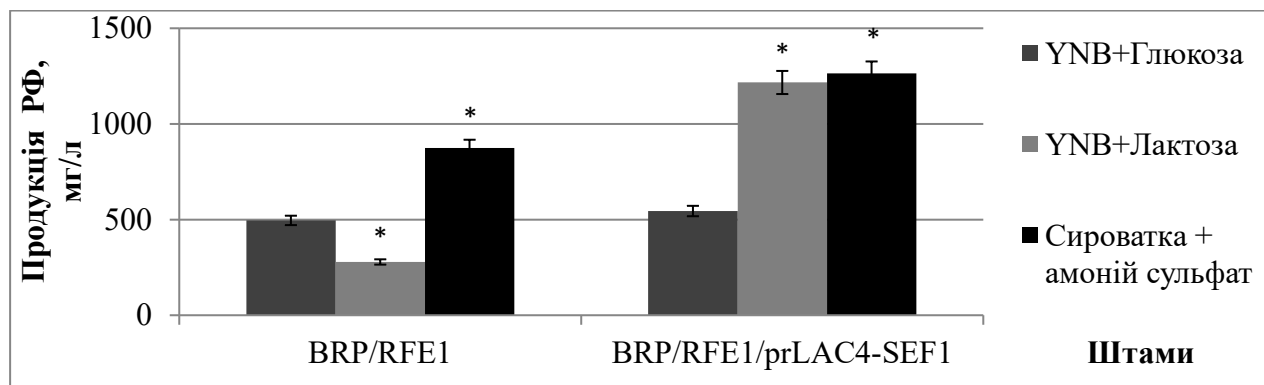
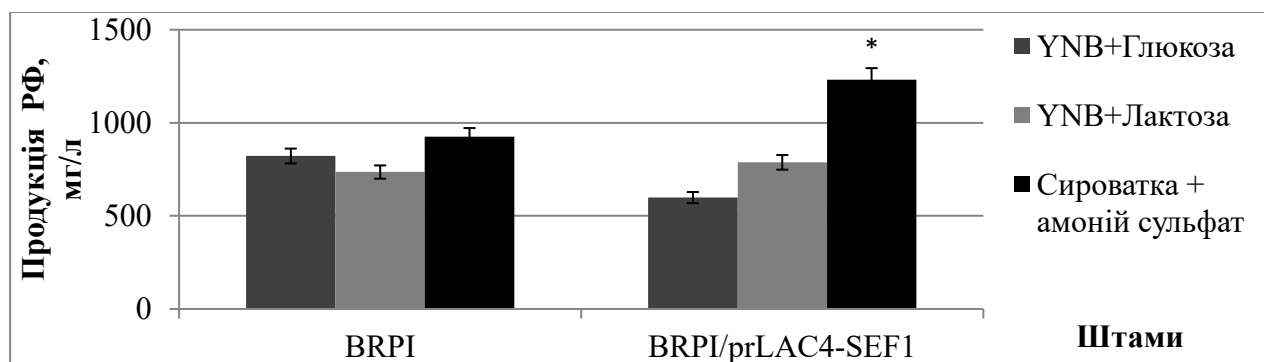


Рис. 7. Продукція РФ реципієнтним штамом AF-4 і рекомбінантними штамами AF-4/prLAC4-SEF1 (42, 85, 134) *Candida famata*, які експресують додаткову копію гена *SEF1* *C. famata* під контролем промотора гена *LAC4* *C. famata*. Клітини вирощували в середовищі YPD упродовж 24 год. та переносили у лактозовмісне багате середовище YPL із 2% лактозою (100 мг клітин/л). Тривалість вирощування становила 70 год.

Ключовим етапом цього дослідження було визначення здатності до найвищої продукції РФ за умов вирощування в сироватці серед найкращих сконструйованих рекомбінантних штамів-надсинтетиків РФ *C. famata*. Для цього, плазмиду рNTC/prLAC4-SEF1 було введено у геном штамів BRP/RFE1 та BRPI. Як і очікувалось, введення плазмиди забезпечило значне підвищення продукції РФ отриманими штамми у середовищах із лактозою (Рис. 8).



А



Б

Рис. 8. Продукція рибофлавіну реципієнтними штамми BRP/RFE1 (А) та BRPI (Б) *Candida famata*, а також одержаними на їх основі рекомбінантами BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 і BRPI/prLAC4-SEF1 (відповідно). Вирощування проводили у середовищі YNB із додаванням 0,2% екстракту дріжджів з різними Карбон-вмісними субстратами (2%); 1 – глюкоза, 2 – лактоза та 3 – молочна сироватка упродовж 90 годин. * – статистично достовірні зміни «р» ≤ 0,05.

Експериментальні дані засвідчили зростання рівня продукції РФ на 30% в рекомбінантів BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 та BRPI/prLAC4-SEF1 порівняно з реципієнтними штамми BRP/RFE1 і BRPI (відповідно). Важливим є також те, що вихід РФ у отриманих рекомбінантних штаммах *C. famata* в сироватці вищий, ніж у стандартному поживному середовищі YNB з глюкозою. Очікувано, сироватка більш суттєво стимулює синтез РФ сконструйованими штамми порівняно з середовищем YNB з лактозою. Це робить використання сироватки для вирощування дріжджів – надсинтетиків РФ одним із перспективних шляхів зниження собівартості виробництва РФ та більш раціонального використання побічних продуктів молочної промисловості.

Конструювання рекомбінантного штаму дріжджів *Candida famata* із здатністю до синтезу бактерійної антибіотичної сполуки – амінорибофлавіну. Створення дріжджового продуцента амінорибофлавіну (АФ) проводилось шляхом конструювання плазмиди, із адаптованим до дріжджової кодонової системи геном *rosB S. davaonensis*, та її подальшим введенням у геном надсинтетика ФМН *C. famata* FP. Цей штам характеризується підвищеним рівнем продукції ФМН завдяки введеному гену *FMN1 D. hansenii* (кодує ензим РФ-кіназу) під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1 C. famata*, що кодує фактор елонгації трансляції (Yatsyshyn et al., 2009; Yatsyshyn et al., 2014). Модифікований ген *rosB S. davaonensis* вводили у плазмиду під контролем конститутивного промотора гена *TEF1*.

Аналіз різних форм флавінів культуральної рідини *Streptomyces davaonensis* та рекомбінантних штамів FP/rosB *Candida famata*. Для аналізу продукції флавінів трансформантами FP/rosB *C. famata* було проведено вирощування у модифікованому середовищі Беркгольдера упродовж 44 год. при 30°C. Одержану культуральну рідину використовували для подальших аналізів. Культуральну рідину, одержану за вирощування бактерій *S. davaonensis*, а також реципієнтного штаму FP *C. famata* і його похідного, що містить плазмиду без гена *rosB*, використовували як позитивний та 2 негативні контролю, відповідно. Сумарну кількість флавінів у середовищі визначали методом спектрофотометрії. Для більш детального аналізу, досліджувані зразки культуральної рідини об'ємом 150 мкл наносили на хроматографічний папір і розділяли в розчині 5% Na₂HPO₄. Відокремлені фракції флавінів аналізували візуально за значеннями коефіцієнтів утримання (retardation factor, *R_f*) (György and Pearson, 1967; Juri et al., 1987; Tyagi et al., 2009) та проводили кількісну оцінку методом спектрофотометрії елюйованих із хроматограм фракцій флавінів (Табл. 4).

Таблиця 4

Вміст різних форм флавінів у культуральній рідині рекомбінантних штамів FP/rosB *Candida famata*

	<i>C. famata</i> FP (контроль)	<i>C. famata</i> FP/pTb- ІМН3 (контроль)	<i>C. famata</i> FP/pTb-rosB- ІМН3 (1/3)	<i>C. famata</i> FP/pTb-rosB- ІМН3 (1/4)	<i>C. famata</i> FP/pTb-rosB- ІМН3 (1/5)
Сумарні флавіни (мг/л)	104,20±3,05	89,23±2,78	93,74±1,98	44,83±0,77	38,75±0,87
ФМН	42,50±1,12	20,54±0,45	16,55±0,75	10,44±0,34	9,37±0,11
РФ	21,03±0,54	18,24±0,32	20,78±0,89	8,42±0,21	6,25±0,12
АФ	-	-	5,21±0,09	4,56±0,12	4,36±0,09
Біомаса (г/л)	8,00±0,19	7,64±0,08	7,03±0,07	6,91±0,23	6,92±0,19
Продукція АФ (мг/г клітин)	-	-	0,74±0,02	0,58±0,01	0,62±0,02

Проведені хроматографічний та спектрофотометричний аналізи дозволили виявити нову флавінову фракцію в більшості протестованих трансформантів, що містять плазмиду pTb_rosB. Методом мас-спектрометрії підтверджено, що нова

фракція флавінів у культуральному середовищі сконструйованих дріжджових трансформантів FP/rosB *C. famata* є АФ. Встановлено, що вирощування трансформантів *C. famata* упродовж 44 год. дозволяє накопичити у культуральній рідині до 5,2 мг/л АФ. Завдяки проведеній роботі, вперше вдалось отримати рекомбінантні штами дріжджів, що набули здатності до синтезу бактерійної антибіотичної сполуки – АФ. Покращення трансформантів з метою підвищення продуктивності АФ є перспективним напрямком подальших досліджень у медичному, біотехнологічному та мікробіологічному напрямках.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено роль нових чинників, залучених у регуляцію біосинтезу флавінів у дріжджів *Candida famata*. Сконструйовано покращені надсинтетики рибофлавіну, а також уперше створено дріжджовий продуцент бактерійної антибіотичної сполуки – амінорибофлавіну. Основні результати проведених досліджень представлено у наступних висновках:

1. Ідентифіковано гомолог людського гена рибофлавін-екскретази *BCRP1* (Breast Cancer Resistant Protein) – *RFE1_Dh* у дріжджів близького до *C. famata* виду *Debaryomyces hansenii*.
2. Надекспресія гена *RFE1_Dh* у надсинтетику рибофлавіну BRP *C. famata* приводить до підвищення флавіногенної активності та нагромадження цього вітаміну в середовищі. Зростання продукції рибофлавіну штамами BRP/*RFE1 C. famata* в 1,5 раза корелює з 1,5 кратним зменшенням внутрішньоклітинного вмісту цього вітаміну. Надекспресія гена *RFE1_Dh* приводить також до підвищення активності ГТФ-циклогідролази II у 2 рази та зростання рівня експресії гена *RIB1*, який кодує цей фермент.
3. Сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *C. famata*, які містять додатковий ген регуляторного транскрипційного фактора *SEF1 C. famata* під контролем лактозо-індуцибельного промотора гена *LAC4*, що кодує β -галактозидазу. Отримані штами синтезують у 1,5 раза більше рибофлавіну порівняно із реципієнтними штамами-надсинтетиками цього вітаміну за використання молочної сироватки як культурального середовища.
4. Досліджено здатність до надсинтезу рибофлавіну сконструйованими штамами *C. famata* у разі використання різних джерел Карбону та оптимізовано склад середовищ і умов вирощування для максимального виходу цільового продукту. Встановлено, що дешевий побічний продукт молочної промисловості - молочна сироватка є перспективним субстратом для виробництва рибофлавіну з використанням дріжджів *C. famata*.
5. Уперше, за використання гетерологічної експресії модифікованого гена *rosB* бактерій *S. davaonensis* у дріжджовому надсинтетику флавінмононуклеотиду *C. famata* сконструйовано дріжджовий продуцент бактерійної антибіотичної сполуки – амінорибофлавіну. Отримані рекомбінантні штами нагромаджували в культуральній рідині до 5 мг/л амінорибофлавіну.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ

ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ruchala J, Andreieva Y, **Tsyurulnyk A**, Sobchuk S, Najdecka A, Wen L, Kang Y, Dmytruk O, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. Cheese whey supports high riboflavin synthesis by the engineered strains of the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Microb Cell Fact.* 2022; 21(1):161-169. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
2. **Tsyurulnyk A**, Fedorovych D, Dmytruk K, Sibirny A. Overexpression of Riboflavin Excretase Enhances Riboflavin Production in the Yeast *Candida famata*. *Methods Mol Biol.* 2021; 2280:31-42. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
3. **Tsyurulnyk A**, Andreieva Y, Ruchala J, Fayura L, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. 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 (9-10):467-473. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
4. **Tsyurulnyk A**, Kordiaka R, Dmytruk K, Fedorovych D, Sybirny A. Optimization of the cultivation conditions and the basic molecular tools for roseoflavin producer *Streptomyces davawensis*. *Mikrobiol Z.* 2016; 78(4):2-10. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
5. **Цирульник А**, Дмитрук К, Федорович Д, Сибірний А. Розробка платформи для конструювання надпродуцентів амінорибофлавіну на основі флавіногенних дріжджів *Candida famata*. *Вісник Львівського університету.* 2016; (73):336-341. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).
6. **Цирульник А**, Федорович Д, Колодій О, Дмитрук К, Сибірний А. Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну). Пат. на винахід 122821 Україна, МПК С12N1/19 С12Р 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. - №а201811788; заявл. 29.11.2018; опубл. 06.01.2021, Бюл. № 1. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних).
7. **Цирульник А**, Федорович Д, Колодій О, Дмитрук К, Сибірний А. Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну). Пат. на корисну модель 133594 Україна, МПК С12N1/19 С12Р 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. - №u201811789; заявл. 29.11.2018; опубл. 10.04.2019, Бюл. № 7. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних).
8. Дмитрук К, Сибірний А, Фаюра Л, Федорович Д, **Цирульник А**. Спосіб отримання флавінового антибіотика амінорибофлавіну. Пат. на корисну

модель 152271 Україна, МПК C12N1/19 C12P 25/00. Заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. -№u202201605; заявл. 18.05.2022; опубл. 11.01.2023, Бюл. № 2. (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних).

9. **Tsyrlunyk A**, Dmytruk K, Fedorovych D, Sibirny A. Yeast *Candida famata* as a producer of riboflavin and its derivatives. 7 th international Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P.34.
10. Fedorovych D, **Tsyrlunyk A**, Kolodii O, Boretsky Y, Dmytruk K, Sibirny A. Expression of putative riboflavin excretase *BCRP* in the flavinogenic yeasts. International Conference: Advances in Microbiology and Biotechnology; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P.61.
11. Kolodii O, **Tsyrlunyk A**, Boretsky Y, Dmytruk K, Fayura L, Fedorovych D, Sibirny A. Cloning and expression of putative riboflavin excretase in flavinogenic yeasts. Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 96.
12. Ruchala J, **Tsyrlunyk A**, Dmytruk K, Fedorovych D, Marx H, Mattanovich D, Sibirny A. Introduction of *Streptomyces davawensis* rosb gene into riboflavin producing yeast *Candida famata* and *Komagataella phaffii*. Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 123.
13. Fedorovych D, Dmytruk K, Boretsky Y, **Tsyrlunyk A**, Ruchala J, Pavliukh K, Sibirny A. Gene *BCRP* coding for riboflavin excretase is important for improvement of riboflavin production in yeast. Medical and Clinical Chemistry. 2019; 21: 289-290.
14. Fedorovych D, Dmytruk K, **Tsyrlunyk A**, Ruchala J, Pavliukh K, Sibirny A. New approaches to improve riboflavin production in the yeast *Candida famata*. 6-th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18-20; Yaremche, Ukraine.
15. **Tsyrlunyk A**, Fedorovych D, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Riboflavin excretase is important for riboflavin overproduction in the flavinogenic yeast *Candida famata*. 8-th Congress of European Microbiologists; 2019 July 7-11; Glasgow, Scotland.
16. Sibirny A, Fedorovych D, Fayura L, **Tsyrlunyk A**, Andreyeva Y, Petrovska Y, Ruchala J, Dmytruk K. Construction of the advanced producer of riboflavin on whey and lignocellulose hydrolyzate in the flavinogenic yeast *Candida famata*. The 35th International Specialised Symposium on Yeasts (ISSY35); 2019 October 21-25; Antalya, Turkey.
17. Fedorovych D, **Tsyrlunyk A**, Motyka O, Fayura L, Dmytruk K, Chshanovski G, Broda D, Ruchala J, Sibirny A. Construction of aminoriboflavin producers of the yeast *Candida famata*, purification of antibiotic and its biological activity assay. International BioThreat Reduction Symposium; 2021 June 29 - July 2; online.
18. Fedorovych D, **Tsyrlunyk A**, Ruchala J, Vojtun A, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of the Advanced Producer of Riboflavin on Whey in the Flavinogenic Yeast *Candida famata*. World Microbe Forum; 2021 June 20-24; online.

АНОТАЦІЯ

Цирульник А.О. Нові чинники, залучені в регуляцію синтезу флавінів у дріжджів *Candida famata*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – Мікробіологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2023.

У роботі додатково введено дріжджовий гомолог (*RFE1_Dh*) гена РФ-екскретази людини (*BCRP1*) для покращення сконструйованих раніше надсинтетиків РФ дріжджів *Candida famata*. Введення гена *RFE1_Dh* привело до підвищення продукції РФ у 1,5 раза рекомбінантними штамами BRP/RFE1 порівняно з реципієнтним штамом BRP (**B**est **R**iboflavin **P**roduction), а також до зниження вмісту флавінів у клітинах. Отримані результати вказують, що шляхом посилення екскреції РФ можна підвищити рівень його продукції.

Також сконструйовано рекомбінантні штами AF-4/prLAC4-SEF1, BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 та BRPI/prLAC4-SEF1 шляхом введення гена позитивної регуляції флавіногенезу *SEF1* під контролем промотора гена β -галактозидази – *LAC4*, який індукується лактозою. Надекспресія гена *SEF1* під контролем промотора *LAC4* забезпечила 1,5 кратне збільшення продукції РФ із використанням як живильного середовища молочної сироватки. Аналіз флавіногенної активності дріжджових надсинтетиків РФ AF-4, BRP, BRPI, BRP/RFE1, BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 та BRPI/prLAC4-SEF1 також виявив здатність до високого рівня синтезу цього флавіну за використання молочної сироватки.

Встановлено, що активний ріст та флавіногенез дріжджів у сироватці можливий лише при внесенні додаткового джерела Нітрогену у вигляді сечовини, амоній сульфату чи діамоній гідрофосфату (3 г/л). Крім цього, ріст спостерігається лише при низькому вмісті лактози (2-5%) у сироватці. Використання молочної сироватки як живильного середовища для мікробного синтезу РФ значно знизить собівартість виробництва РФ та забезпечить зменшення забруднення довкілля відходами молочної промисловості.

Заключною частиною роботи було одержання дріжджового продуцента бактерійної антибіотичної сполуки – амінорибофлавіну (АФ). Беручи до уваги, що у *Streptomyces davaonensis* АФ формується із ФМН, який синтезується із РФ, нами створено продуценти АФ на основі сконструйованих раніше у нашому відділі дріжджових надсинтетиків ФМН – FP (**F**lavin**m**ononucleotide **P**roducer) *C. famata*. Плазмиду, що містила синтетичний ген *rosB*. *S. davaonensis* із необхідними модифікаціями кодонової системи (триплет кодон CUG дріжджів кодує серин, а не лейцин, як у бактерій), було введено у штам надсинтетик ФМН FP. Аналіз флавіногенної активності одержаних рекомбінантних штамів, що містили ген *rosB*, дозволив виявити нову фракцію флавінів. Результати хроматографічного та мас-спектрометричного аналізів підтвердили, що дана сполука є АФ. Продукція АФ у культуральному середовищі рекомбінантів FP/RosB *C. famata* сягала 5 мг/л. Синтез АФ у природі здійснюється лише прокаріотичними мікроорганізмами.

Нами вперше отримано продукцію АФ в клітинах еукаріотичного мікроорганізму – дріжджах *C. famata*.

Ключові слова: рибофлавін, амінорибофлавін, флавіногенні дріжджі *Candida famata*, лактоза.

SUMMARY

Tsyurulnyk A.O. New factors involved in the regulation of flavin synthesis in the yeast *Candida famata*. – the manuscript.

Thesis for PhD degree in Biology (specialty 03.00.07 – Microbiology). – Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2023.

The dissertation is devoted to investigation of flavin production and metabolic engineering application to increase the flavin synthesis by the yeast *Candida famata* strains through overexpression of modified regulatory and structural genes of flavinogenesis.

In the work, yeast homologue (*RFE1_Dh*) of the human RF-excretase gene (*BCRP1*) was introduced to the previously constructed RF overproducer of the yeast *Candida famata*. The introduction of the *RFE1_Dh* gene led to a 1.5-fold increase in RF production by BRP/RFE1 recombinants compared to the recipient strain BRP (**B**est **R**iboflavin **P**roduction), as well as to a decrease in the content of intracellular flavins. The obtained results indicate that by increasing the RF excretion, it is possible to increase the level of its production.

Recombinant strains AF-4/prLAC4-SEF1, BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 and BRPI/prLAC4-*SEF1* were also constructed by introducing of the gene for positive regulation of RF synthesis *SEF1* under the control of the β -galactosidase gene promoter – *LAC4*, which is inducible by lactose. Overexpression of the *SEF1* gene under the control of the *LAC4* promoter ensured a 1,5-fold increase in RF production using cheese whey as a nutrient medium. Analysis of the flavinogenic activity of RF-overproducing yeast strains AF-4, BRP, BRPI, BRP/RFE1, BRP/RFE1/prLAC4-SEF1 and BRPI/prLAC4-SEF1 also revealed the ability to synthesize this flavin at a high level in whey.

It was established that active growth and flavinogenesis of yeast in cheese whey is possible only when an additional source of nitrogen is added in the form of urea, ammonium sulfate or diammonium hydrophosphate. In addition, growth is observed only at a low content of lactose (2-5%) in whey. Using of cheese whey as a nutrient medium for microbial synthesis of RF will significantly reduce the cost of RF production and ensure a reduction in environmental pollution by dairy industry waste.

The final part of the work was the construction of the yeast producer of the bacterial antibiotic compound - aminoriboflavin (AF). Taking into account that in *Streptomyces davaonensis* AF is formed from FMN, which in turn is synthesized from RF, we created AF producer using as a recipient the FMN-overproducer strain – FP (**F**lavinmononucleotide **P**roducer) *C. famata*, constructed earlier in our department. The plasmid contained a synthetic *rosB* gene. *S. davaonensis* with modifications of the codon

system (the triplet codon CUG in yeast encodes serine, but not leucine, as in bacteria) was introduced into the FP strain capable for oversynthesis of FMN. Analysis of the flavinogenic activity of the obtained recombinant strains containing the *rosB* gene made it possible to identify a new fraction of flavin. The results of chromatographic and mass-spectrometric analyzes confirmed that this compound is the AF. AF production in the culture medium of FP/RosB *C. famata* recombinants reached 5 mg/L. AF synthesis in nature is carried out only by prokaryotic microorganisms.

For the first time, we obtained AF production in a eukaryotic microorganism – the yeast *C. famata*.

Key words: riboflavin, aminoriboflavin, flavinogenic yeast *Candida famata*, lactose.

Підписано до друку 13.06.2023 р.
Формат 60x84/16. Папір офсетний.
Друк: принтер. Зам. №13/06-1.
Ум. друк. арк. 0,9.
Тираж 100 прим.

Видавництво “ГАЛИЧ-ПРЕС”
Видавець ФОП Мацько Б.В.
м. Львів, вул. Гнатюка, 17
Ел. пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. 096-59-88-924
Свідоцтво ДК №7731 від 07.02.2023 р.