

Створення ефективних продуцентів рибофлавіну та флавінових коензимів на основі дріжджів *Candida famata*

Реєстраційний номер проекту: 2021.02/0059

Назва конкурсу

Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук

Тематичний напрям конкурсу

Тематичні напрями конкурсу – конкурс колективних проектів за напрямками досліджень, пов'язаних із виконанням фундаментальних та прикладних наукових досліджень і розробок в галузі математичних, природничих, технічних, біологічних, аграрних та медичних наук

Характер досліджень

Прикладні дослідження

Вид грантової підтримки

Колективний грант

Напрямок грантової підтримки

- Виконання наукових досліджень і розробок

Науковий напрям

- Біологія, медицина і аграрні науки

Спеціальність

- Мікробіологія

- Молекулярна біологія

- Біотехнологія

Опис проєкту

Анотація проєкту

Рибофлавін (вітамін B2) є невід'ємним компонентом живлення людини і тварин та метаболічним попередником флавінових коферментів, флавінмононуклеотиду (ФМН) і флавінаденіндинуклеотиду (ФАД). Рибофлавін виробляють як лікарський препарат, для збагачення вітаміном раціону людей і тварин, а також для використання як харчового барвника. Флавінові нуклеотиди, ФМН і ФАД, які мають вищу терапевтичну активність порівняно з рибофлавіном, не виробляються через відсутність ефективних мікробних продуцентів. У рамках цього проєкту на основі дріжджів *Candida famata* за допомогою методів метаболічної інженерії буде сконструйовано рекомбінантні штами надсинтетики рибофлавіну, ФМН та ФАД. Для продукції флавінів буде розширено коло субстратів з використанням молочної сироватки, що є основним відходом молочного виробництва. Результати, отримані в рамках даного проєкту, слугуватимуть цінною платформою для розробки технології промислового виробництва рибофлавіну, ФМН та ФАД.

Короткий опис проєкту згідно розділу I п.9.2 форми заявки

Вітамін B2 (рибофлавін, РФ) є незамінним компонентом харчування людини, цінним профілактичним препаратом та необхідною складовою кормів, які використовуються у тваринництві та птахівництві. При дефіциті РФ знижуються темпи росту та виникають захворювання шкіри, очей, нервової системи тощо. Власне для лікування таких хвороб як катаракта, мігрень, малярія, хвороба Паркінсона, дерматози цей вітамін застосовують у медицині. Флавінові коферменти ФМН і ФАД, які є похідними РФ, залучені у процеси клітинного дихання, детоксикації ароматичних сполук та важких металів, мікросомального окислення, біолюмінісценції, фототропізму, репарації, здатні індукувати оксидативний стрес та захищати клітину від нього (Joosten et al., 2007). ФМН і ФАД, які мають вищу терапевтичну активність порівняно з РФ, не виробляються через відсутність ефективних мікробних продуцентів. Світове виробництво рибофлавіну складає приблизно 10 000 тон/рік. На сьогодні РФ отримують шляхом мікробної ферментації, використовуючи рекомбінантні штами грибів *Ashbya gossypii* та бактерії *Bacillus subtilis*. До недавнього часу виробництво РФ також базувалось на дріжджах *Candida famata*, однак через низьку стабільність продуцентів виробництво було припинено. Проте, процес ферментації з використанням дріжджових продуцентів має ряд переваг. Дріжджі здатні рости на простих та дешевих середовищах. Дріжджові клітини можуть бути легко відокремлені від ферментаційного середовища. До того ж дріжджі, на відміну від бактерій, не чутливі до фаголізису. Одноклітинні дріжджі легше культивувати, ніж міцеліальні гриби. В нашій лабораторії розроблено базові методи молекулярної генетики для дріжджів *C. famata*. Зокрема, розроблено методи трансформації, інсерційного мутагенезу, мультикопійної інтеграції, виділено сильні промотори та клоновано структурні гени біосинтезу РФ та гени залучені в регуляцію синтезу цього вітаміну, зокрема ген SEF1, що кодує центральний позитивний регулятор синтезу РФ. За допомогою класичної селекції виділено стабільний надпродуцент РФ *C. famata*, штам AF-4. Суттєвий попередній доробок є хорошою основою для конструювання ефективних продуцентів РФ, ФМН та ФАД на основі дріжджів. Використання молекулярних методів для створення продуцентів флавінів є більш результативним за наявності розшифрованої послідовності геномної ДНК дріжджів *C. famata*. У цьому проєкті ми пропонуємо провести секвенування та анотацію геному штаму дикого типу *C. famata* та його похідного, штаму AF-4. Отримані дані дозволять виявити

однонуклеотидні заміни, що приводять до надсинтезу вітаміну B2. Шлях біосинтезу РФ у дріжджів відбувається у семи послідовних реакціях. Ці реакції каталізують ферменти, які кодують відповідні RIB гени. В нашій попередній роботі було встановлено, що посилення експресії першого RIB1 та останнього RIB7 генів приводило до зростання продукції РФ. Проте, вплив експресії інших структурних генів на підвищення продукції РФ не досліджено. У цьому проєкті буде визначено лімітуючі ланки шляху синтезу вітаміну B2 та визначено рівні експресії та комбінації відповідних RIB генів, що стимулюватиме надсинтез вітаміну B2 (Рис.). Синтез РФ починається з двох попередників, ГТФ та рибулозо-5-фосфату. У нашій попередній роботі було встановлено, що збільшення внутрішньоклітинного вмісту ГТФ приводило до зростання продукції РФ. У цьому проєкті заплановано збільшення продукції рибулозо-5-фосфату шляхом посилення експресії генів GDN1 та ZWF1 окислювальної ланки пентозофосфатного шляху (Рис.). В рамках даного проєкту ми плануємо розширити коло субстратів для продукції рибофлавіну з використанням молочної сироватки, що є основним відходом молочного виробництва. Лактоза є основним вуглецевим компонентом молочної сироватки. Для створення ефективних продуцентів РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки, експресія генів SEF1, FMN1 та FAD1 буде здійснена під контролем сильного або індукованого лактозою промоторів (Рис.). Посилення продукції РФ, ФМН та ФАД з сироватки буде відбуватися за допомогою активації шляху катаболізму лактози, шляхом посилення експресії лактозопермеази та β -галактозидази (Рис.). Буде оптимізовано умови культивування надсинтетиків флавінів в біореакторах для досягнення максимальної біомаси та продукції цільових сполук. Сконструйовані штами дріжджів, здатні до надсинтезу флавінів та відповідні протоколи культивування дозволять створити платформу для промислового виробництва цих сполук. Результати цього проєкту буде опубліковано в міжнародних журналах, а найпродуктивніші штами продуценти РФ, ФМН та ФАД будуть захищені патентами. Проєкт відповідає пріоритетному напрямку розвитку науки і техніки №4 «Раціональне природокористування». Даний проєкт належить до спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія та спрямований на вирішення актуальної прикладної проблеми – створення ефективних мікробних продуцентів флавінів. Проєкт відповідає меті, тематиці та умовам конкурсу та не містить відомостей, зміст яких становить державну таємницю.

Ключові слова

Дріжджі, рибофлавін, ФМН, ФАД, метаболічна інженерія

Мета наукового проєкту

Основною метою проєкту є конструювання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* здатних до надпродукції рибофлавіну та флавінових коензимів (ФМН та ФАД) у середовищі на основі молочної сироватки. Конструювання здійснюватиметься шляхом посилення експресії структурних та регуляторних генів синтезу рибофлавіну та генів залучених у синтезі попередника вітаміну B2 та генів катаболізму лактози. Буде адаптовано умови культивування в біореакторі для досягнення максимальної продукції флавінів.

Основні завдання проєкту

Проєкт включає шість завдань 1. Секвенування та анотація геномів штаму дикого типу *Candida famata* та його похідного – надпродуцента вітаміну B2. 2. Визначення та посилення експресії лімітуючих структурних генів синтезу рибофлавіну. 3. Посилення експресії генів

окислювальної ланки пентозофосфатного шляху для збільшення продукції рибулозо-5-фосфату - попередника шляху синтезу рибофлавіну. 4. Створення продуцентів рибофлавіну, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки шляхом надекспресії генів SEF1, FMN1 та FAD1 під контролем сильного або індукованого лактозою промоторів. 5. Посилення продукції рибофлавіну, ФМН та ФАД з сироватки за допомогою активації шляху катаболізму лактози. 6. Аналіз продуцентів рибофлавіну, ФМН та ФАД в біореакторі та оптимізація умов культивування.

Назва проєкту *Створення ефективних продуцентів рибофлавіну та флавінових коензимів на основі дріжджів *Candida famata**

Науковий керівник проєкту Дмитрук Костянтин Васильович

3.1 Сучасний стан проблеми (до 2 сторінок)

Рибофлавін (вітамін В2, РФ), - водорозчинний вітамін. Вітамін В2 синтезується всіма рослинами та більшістю мікроорганізмами. Проте людина та тварини не здатні синтезувати РФ та потребують його екзогенного додавання. В клітинах живих організмів РФ входить до складу багатьох ферментів у формі коензимів флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД). Встановлено, що 1-3% генів прокаріотичних та еукаріотичних геномів кодують флавопротеїни (De Solibus, 2006). Флавопротеїни, що містять ФМН та ФАД як простетичні групи, каталізують реакції, надзвичайно важливі для основних метаболічних процесів (фотосинтез, аеробне та анаеробне дихання, денітрифікація та ін.) (Joosten et al., 2007). Оскільки флавіни беруть участь у метаболізмі багатьох сполук, а також процесах генерації енергії, порушення в обміні флавінових коферментів призводять до серйозних змін на клітинному та тканинному рівнях. При недостатньому забезпеченні флавінами у ссавців погіршується апетит, припиняється ріст, знижується ефективність засвоєння кормів, розвиваються ураження слизових оболонок, порушується зір, а також функції печінки та травного тракту (Goldsmith, 1975). Важлива роль флавопротеїнів у обміні речовин обумовлює широке використання препаратів вітаміну В2 у медичній практиці. Як лікарський засіб метаболічної терапії ФМН використовують для лікування захворювань серцево-судинної системи, печінки, кишківнику, а також для нормалізації діяльності центральної нервової системи (Plantone et al., 2021). У медицині флавінові нуклеотиди застосовуються у вигляді ін'єкцій при арибофлавінозі, різноманітних дерматозах, захворюваннях очей, а також як підтримуючий засіб при порушеннях харчування (Mosegaard et al., 2020). Компонент мультивітамінних сумішей – ФМН має у 200 разів кращу розчинність, ніж РФ, що дозволяє застосовувати його парентерально. Крім того, терапевтичний потенціал ФМН при лікуванні деяких захворювань вищий, ніж у РФ (Balasubramaniam et al., 2019).

РФ виробляється в значних кількостях. На сьогодні річний обсяг продажів РФ у світі перевищує 10 000 тон (Zhao et al., 2021). Основними виробниками РФ є компанії

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

Hubei Guangji Pharmaceutical (Китай), BASF (Німеччина), DSM (Нідерланди), та Shanghai Acebright Pharmaceuticals (Китай). Близько 70% РФ використовується у тваринництві як додаток до кормів сільськогосподарських тварин (свині та домашня птиця). Решта 30% РФ використовується у харчовій промисловості як барвник, а також у медицині у складі полівітамінних сумішей та препаратів для лікування мігрені, малярії, захворювання очей та шкіри, а також нервових розладів (You et al., 2021). Світовий ринок РФ становить близько 300 млн доларів на рік в залежності від ціни різних препаратів цього вітаміну (Kato et al., 2012).

На сьогоднішній день досягнуто значних успіхів у конструюванні активних мікробних продуцентів РФ. Сучасне виробництво вітаміну B2 базується на використанні рекомбінантних надпродуцентів РФ бактерій *Bacillus subtilis* та міцелійних грибів *A. gossypii*. До недавнього часу виробництво РФ також базувалось на дріжджах *Candida famata*, однак через низьку стабільність продуцентів виробництво було припинено (Abbas, Sibirny, 2011). Відомо досить багато мікроорганізмів, здатних до надсинтезу РФ, проте не описано жодного прикладу прямого мікробного синтезу значних кількостей ФМН і лише мутанти цвільового гриба *Eremothecium ashbyii* синтезують ФАД, однак такі штами-надсинтететики є нестабільними. В той же час, препарати ФМН та ФАД, отримані мікробіологічним способом, можуть знайти застосування як лікарські препарати, харчові барвники, як реактиви високого ступеня чистоти.

Великий флавіногенний потенціал дріжджів *C. famata* залишається нереалізованим. Значною мірою це пов'язано з відсутністю геномної послідовності ДНК цього виду дріжджів і, як результат, неповним використанням підходів метаболічної інженерії. Мета даної роботи полягає у заповненні відповідних пробілів та конструюванні ефективних продуцентів РФ, ФМН та ФАД на основі дріжджів *C. famata*.

Важливим завданням сучасної біотехнології є продукція цінних сполук з побічних продуктів виробництв різних галузей, що забруднюють навколишнє середовище та не знаходять належного використання. Молочна промисловість щорічно виробляє мільйони тон побічних продуктів, основним компонентом яких є молочна сироватка. При виробництві 1 кг сиру залишається приблизно 9-10 л сироватки, і якщо її вилити без обробки, це створює значну проблему для навколишнього середовища (Pires et al., 2021).

Серед загального обсягу стічних вод вітчизняних молокопереробних підприємств 20% займає сироватка (Sychevskiy et al, 2019). Після депротейнізації молочна сироватка

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

окрім солей і низки амінокислот містить до 5% лактози. Сироватка може використовуватися як середовище для культивування мікроорганізмів, зокрема, дріжджів. В наших попередніх роботах було встановлено, що дріжджі *S. famata* здатні рости на середовищі на основі молочної сироватки та продукувати РФ (PL337656037). Завданням даного проєкту є конструювання ефективних продуцентів РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки із застосуванням підходів метаболічної інженерії.

3.2 Новизна проєкту (до 1 сторінки)

Підходи для конструювання надпродуцентів РФ на основі бактерій *B. subtilis* та міцелійних грибів *A. gossypii* описано в останніх оглядах (Averianova et al., 2020; You et al., 2021). Незважаючи на наші успіхи у конструюванні стабільних продуцентів РФ на основі дріжджів *S. famata* (Dmytruk et al., 2011, 2014, 2020) флавіногенний потенціал цих дріжджів, на нашу думку, залишається реалізованим лише частково. Насамперед це пов'язано з відсутністю геномної послідовності ДНК. Секвенування геному *S. famata*, яке заплановано у рамках даного проєкту, дасть нам можливість вперше оперувати власними гомологічними генами, а не модифікувати ті чи інші метаболічні шляхи *S. famata* за допомогою посилення експресії генів із споріднених видів дріжджів. Секвенування та порівняння геномів штаму дикого типу та стабільного надпродуцента РФ, отриманого методами класичної селекції, дозволить вперше виявити одонуклеотидні заміни, які приводять до надсинтезу вітаміну B2. Вперше будуть виявлені лімітуючі ланки синтезу вітаміну B2. За допомогою посилення експресії генів окислювальної ланки пентозофосфатного шляху буде вперше підвищено внутрішньоклітинну концентрацію рибулозо-5-фосфату, що є одним з основних попередників синтезу РФ. Отримання мікробних продуцентів флавінів на молочної сироватці, що є основним побічним продуктом молочної промисловості, не описано взагалі. У цьому проєкті вперше буде сконструйовано ефективні продуценти РФ, ФМН та ФАД здатні до продукції цільових сполук на середовищі на основі сироватки. Будуть оптимізовані умови культивування та компоненти культурального середовища для забезпечення максимальної продукції флавінів у біореакторі.

3.3 Методологія дослідження (до 2 сторінок)

Конструювання продуцентів РФ, ФМН та ФАД буде розпочато з секвенування геному дріжджів *S. famata*. Повногеномне секвенування буде здійснено на платформі Illumina. Для визначення геномної послідовності буде використано штаб дикого типу *S.*

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

famata VKM Y-9, та його похідний штаб AF-4 (Dmytruk et al., 2011). AF-4 – стабільний продуцент РФ, отриманий шляхом класичної селекції у декілька етапів. Як мутаген було використано УФ опромінення, нітрозогуанідин та етилметансульфонат. Після мутагенезу відбирали штами резистентні до структурного аналогу РФ (7-метил-8-трифторметил-10(1'-рибітил)-ізоалаксазину), 8-азагуаніну, 6-азаурацилу, 2-діазо-5-оксо-L-норлейцину, гуанозину. На останньому етапі проводили селекцію жовтих колоній при високому рН. Ми припускаємо, що більшість мутацій, отриманих зазначеною селекцією, є точковими мутаціями. Отже, паралельне секвенування геномів двох штамів VKM Y-9 та AF-4 дасть нам можливість отримати більші перекриття геному відносно його очікуваного розміру, і як результат, якісне збирання цілого геному. Окрім того порівняння послідовностей двох геномів дозволить ідентифікувати мутації, що спричиняють надсинтез РФ. Ідентифіковані одонуклеотидні поліморфізми будуть підтверджені шляхом повторного секвенування відповідних локусів методом Сенгера.

При створенні стабільних дріжджових продуцентів цільових сполук більш оптимальним є використання модулів експресії, інтегрованих в геном реципієнта. Вищий рівень експресії досягається шляхом множинної інтеграції модулів експресії у відповідні локуси ДНК. Для даної мети будуть використані послідовності генів рРНК, що будуть слугувати мішенями для множинної інтеграції касет шляхом гомологічної рекомбінації. В секвенованому геномі *S. famata* будуть ідентифіковані гени рРНК. Як домінантні селективні маркери буде використано гени *nat1*, *ble* та *BSD* що забезпечують резистентність до антибіотиків норзеотрицину, флеоміцину та бластицидину відповідно (Bratiichuk et al., 2020). В геномі *S. famata* будуть виявлені послідовності структурних та регуляторних генів синтезу РФ, ФМН та ФАД, гени окислювальної ланки пентозофосфатного шляху, гени катаболізму лактози, що будуть використані у даному проєкті.

Для визначення лімітуючих ланок синтезу РФ, буде сконструйовано серію плазмід, що міститимуть різні комбінації структурних генів синтезу вітаміну В2. Буде встановлено комбінацію *RIB* генів, які стимулюватимуть продукцію РФ у більшій мірі. Експресію лімітуючих генів буде посилено шляхом їх поміщення під контроль сильного конститутивного промотора гена *TEF1*, що кодує трансляційний фактор елонгації 1A або регульованого лактозою промотора гена *LAC4*, що кодує β-галактозидазу. Також буде сконструйовано серію плазмід, що міститимуть касети експресії гомологічних генів *FMN1*, *FAD1*, *GDN1*, *ZWF1*, *LAC12* та *LAC4* під контролем сильних промоторів (Рисунок). Усі компоненти експресійних касет буде з'єднано за допомогою методології

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

Gibson Assembly або NEBuilder HiFi DNA Assembly. Трансформацію реципієнтних штамів, продуцентів РФ, буде здійснено шляхом електропорації (Voronovsky et al., 2002). Селекцію відповідних дріжджових трансформантів буде проведено на підвищених концентраціях антибіотиків з подальшим їх перенесенням на вищі концентрації селективних агентів. Наявність цільових послідовностей ДНК в геномі трансформантів буде підтверджено за допомогою ПЛР. Отримані мультикопійні трансформанти буде стабілізовано шляхом почергового культивування у неселективних/селективних середовищах. Підтвердження мультикопійної інтеграції цільових генів буде здійснено за допомогою ПЛР у реальному часі (qRT-PCR). Також буде визначено питому активність продуктів генів *RIB*, *FMN1*, *FAD1*, *GDN1* та *ZWF1* та *LAC4*. Первинний аналіз продукції флавіновів буде проводитися при культивуванні трансформантів в колбах. Оцінка продукції цільових сполук буде проводитися за допомогою спектрофотометрії, флуориметрії та вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Дріжджові штами з найвищою продукцією РФ, ФМН та ФАД будуть вивчатися детальніше. Для досягнення надпродукції флавінів, проводитиметься серія культивувань штамів-продуцентів РФ, ФМН та ФАД в різних середовищах за різних умов. Оптимізація умов ферментації, що сприяє надсинтезу РФ, ФМН та ФАД, буде проводитися в ферментерах об'ємом 1 літр. Буде визначено вплив режиму ферментації (batch або feed-batch), умов ферментації (температура, рН та аерація), компонентів поживного середовища (джерел вуглецю, азоту, концентрації молочної сироватки) та вихідної біомаси на ріст і синтез РФ, ФМН та ФАД сконструйованими штамми.

У роботі буде використано стандартні мікробіологічні методи. Для конструювання цільових плазмід і відповідних дріжджових штамів будуть використані біоінформатичні підходи, а також методи ПЛР, електрофоретичне розділення ДНК, елюція, рестрикція, модифікація ДНК, лігування, електротрансформація бактерій та дріжджів, ПЛР у реальному часі, методи виділення ДНК/РНК, визначення питомих активностей ферментів, аналітичні методи (спектрофотометрія, флуориметрія, ВЕРХ), а також робота на біореакторах.

3.4 Обґрунтування спроможності виконання проєкту учасником Конкурсу (до 3 сторінок).

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

Вивченням механізмів регуляції біосинтезу РФ і його похідних у дріжджів в установі виконавців запропонованого проєкту займаються більше 40 років. Об’єктом досліджень, який буде використаний у даній роботі є дріжджів *S. famata*. Ці дріжджі природньо здатні до надсинтезу РФ за умов дефіциту заліза в середовищі. До недавнього часу, мутантні штами *S. famata* використовувалися для промислового виробництва РФ компанією ADM (Chicago, Illinois, USA). За останні 19 років виконавці проєкту розробили молекулярні методи роботи з даним організмом, зокрема, опрацьовано протоколи трансформації (Voronovsky et al., 2002), методи інсерційного мутагенезу (Dmytruk et al., 2006), розроблено домінантні селективні маркери (Dmytruk et al., 2011, 2014, Bratiichuk et al., 2020), репортерну систему, ідентифіковано сильні конститутивні та регульовані промотори (Ishchuk et al., 2008), клоновано структурні гени біосинтезу РФ (Voronovsky et al., 2004; Dmytruk et al., 2004) та деякі гени залучені в регуляцію синтезу цього вітаміну (Dmytruk et al., 2006; Dmytruk and Sibirny, 2012; Andreieva et al., 2020), а також експортер цього вітаміну (Tsygulnyk et al., 2020). За допомогою поєднання підходів класичної селекції та методів метаболічної інженерії, включаючи посилення експресії структурних та регуляторних генів, гена, що відповідає за екскрецію вітаміну В2, а також генів залучених у синтез ГТФ (попередник синтезу РФ), створено продуценти РФ (Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2020; Tsygulnyk et al., 2020) і його похідних (ФМН та ФАД) (Yatsyshyn et al., 2009, 2014). Значно поглиблено знання у фізіології та культивуванні відповідних продуцентів РФ, ФМН та ФАД (Dmytruk et al., 2014; Yatsyshyn et al., 2014). Наявний досвід роботи у цьому напрямку забезпечує гарантії виконання даного проєкту. Ми виявили цікавий феномен, стабільний продуцент РФ, штаму AF-4 *S. famata*, отриманий методами класичної селекції, здатний рости та продукувати значні кількості вітаміну В2 на середовищі з додаванням лактози, як джерелом вуглецю, а також на середовищі на основі молочної сироватки. Результати цієї роботи оформлені у вигляді заявки на європейський патент (PL435341 від 19.07.2021). Отримані результати дозволяють нам планувати роботу по створенню ефективних дріжджових продуцентів РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки, що є основним побічним продуктом молочної промисловості. Методична частина роботи, що стосується застосування системи трансформації дріжджів *S. famata* захищена патентом США (WO2002006448A2). Наші роботи по створенню продуцентів вітаміну В2 також підкріплені патентами України на винахід (№87684 від 10.08.2009; №90741 від 25.05.2010; №90754 від 25.05.2010; №122821 від 06.01.2021). Науковий керівник та деякі з учасників даного проєкту є співавторами зазначених патентів:

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

- Sibirny A, Ruchała J, Fedorovych D, Wojtuń A, Zanmirowska A, Dmytruk K, Tsyurulnyk A. A new strain of *Candida famata* BCRP yeast capable of overproducing riboflavin, the use of the yeast *Candida famata* BCRP for the production of riboflavin and method of producing riboflavin. Publication number PL435341 from 19.07.2021 https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=PL337656037&_cid=P12-KVM69B-36493-1
- Abbas CA, Voronovsky AY, Fayura LR, Kshanovska BV, Dmytruk KV, Sibirna KA, Sibirny AA. Transformation system for the flavinogenic yeast // USA Patent Number WO2002006448A2, from 24.01.2002.
- Вороновський А.Я., Дмитрук К.В., Іщук О.П., Яцишин В.Ю., Сибірний А.А., Федорович Д.В. Спосіб отримання флавінмононуклеотиду // Патент України на винахід. Номер патенту: 87684. Опубліковано: 10.08.2009.
- Дмитрук К.В., Вороновський А.Я., Сибірний А.А., Яцишин В.Ю., Федорович Д.В., Штам дріжджів *Candida famata* ІМВ у-5033 – стабільний продуцент рибофлавіну (вітаміну В₂) // Патент України на винахід. Номер патенту: 90741. Опубліковано: 25.05.2010
- Федорович Д.В., Сибірний А.А., Дмитрук К.В., Штам дріжджів *Candida famata* ІМВ у-5034 – продуцент рибофлавіну (вітаміну В₂) // Патент України на винахід. Номер патенту: 90754. Опубліковано: 25.05.2010
- Цирульник А. О., Федорович Д. В., Колодій О. М., Дмитрук К. В., Сибірний А. А. Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну) // Патент України на винахід. Номер патенту: 122821. Опубліковано: 06.01.2021.

Виконавці проєкту володіють відповідними сучасними методами, мають достатній досвід та знання, що необхідні для виконання проєкту. Керівник проєкту д.б.н. Дмитрук К.В. є першим автором більшості робіт по конструюванню поліпшених штамів дріжджів *C. famata* надпродуцентів РФ та розробці молекулярних методів роботи з цим видом дріжджів. Проф. Федорович Д.В. є спеціалістом по адаптації умов культивування дріжджів у ферментерах та вивченню регуляції синтезу РФ у дріжджів. К.б.н. Фаюра Л.Р. є спеціалістом з очистки білків та низькомолекулярних біологічно активних сполук. Вона має величезний досвід у визначенні питомих активностей цільових ферментів. Провідний інженер Цирульник А.О. займається вивченням механізмів транспорту РФ та створенням продуцентів цього вітаміну на альтернативних субстратах. Він закінчує

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

оформлення своєї дисертаційної роботи, що присвячена механізмам транспорту вітаміну В2. Аспірантка Андреева Ю.А. виконує дисертаційну роботу присвячену вивченню регуляції синтезу РФ. Андреева Ю. є співавтором міжнародної публікації, де описано ідентифікацію нових генів, що залучені в негативну регуляцію синтезу РФ. Аспірант Бандура Ю. буде залучений у біоінформатичну частину дослідження, а саме анотації геному дріжджів *S. famata* та пошуку цільових генів. Наша лабораторія технічно забезпечена для проведення запропонованих експериментів. У лабораторії наявне устаткування для мікробіологічної роботи (ламінарна шафа (ESCO), набір орбітальних шейкерів (Heidolph™ Incubator 1000), мікроскопи, зокрема флуоресцентний мікроскоп (Carl Zeiss Axio Imager a1), обладнання, що необхідне для роботи з ДНК, РНК та білками (автоматичні дозатори (Eppendorf Research Plus, Gilson), камери для електрофорезу (Thermo Fisher Scientific; BioRad), вортекси (IKA Vortex Genius 3), система для трансферу нуклеїнових кислот та білків (Semi-Dry Blotter CBS Scientific Co), високошвидкісні центрифуги (Sorvall), мікроцентрифуги (Eppendorf), електропоратори (BTX electroporation system 600; BioRad Gene Pulser II), ПЛР ампліфікатори (Eppendorf Mastercycler 5333; GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems), транслюмінатори (Thermo Fisher Scientific), аналітичне обладнання (лабораторні ваги (Denver Instruments), рН-метри (Mettler Toledo), спектрофотометри (Helios gamma; Nach Lange DR 6000), флюориметр (Turner), система для ВЕРХ (Perkin Elmer Series 200), система для очистки води Milli-Q, ультранизкотемпературні морозильні камери, а також біотехнологічне обладнання, зокрема сучасний лабораторний біореактор з двома спареними одиницями об'ємом 1 л (Eppendorf). В рамках цього проєкту планується придбання ампліфікатора CFX Opus 96 (Bio-Rad) для проведення ПЛР у реальному часі, а також ноутбук для проведення біоінформатичної роботи.

3.5. Обґрунтування необхідності придбання за рахунок гранту вичерпного переліку обладнання та устаткування, яке планується придбати за рахунок грантової підтримки (по роках та із зазначенням кількості одиниць). Зазначення напрямів використання такого обладнання та устаткування після завершення гранту (Інформація заповнюється у разі подання заявки, яка передбачає придбання обладнання та устаткування для реалізації проєкту) (до 2 сторінок).

Молекулярні роботи по метаболічній інженерії шляху синтезу РФ, ФМН та ФАД полягають у посиленні експресії цілого ряду генів. Для підтвердження посилення експресії цільових генів та визначення їх рівнів необхідним є точний підрахунок копій відповідних РНК. Оцінка кількості РНК транскриптів проводиться за допомогою ПЛР у

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

реальному часі. Підвищення експресії цільових генів можливі за рахунок збільшення кількості копій касет експресії відповідних генів в геномі рекомбінантних штамів. Встановлення кількості копій касет експресії цільових генів також проводиться за допомогою ПЛР у реальному часі. Для цієї мети в рамках даного проєкту планується придбання ампліфікатора CFX Opus 96 (Bio-Rad) для проведення ПЛР у реальному часі. Прилад планується придбати в 2022 році на першому етапі виконання проєкту. Проєкт буде виконуватися силами лабораторії метаболічної інженерії. Окрім створення продуцентів флавінів на основі дріжджів наша лабораторія також працює над конструюванням продуцентів інших біотехнологічно важливих продуктів (етанол, лактат, глутатіон). Такі роботи проводяться шляхом посилення чи зниження експресії цільових генів. Оцінка рівнів експресії відповідних генів буде проводитися за допомогою ампліфікатора CFX Opus 96 і після завершення запропонованого проєкту.

На першому етапі даного проєкту заплановано повногеномне секвенування штамів *S. famata*. Для обробки даних, передбачення генів, анотацію геномів та філогенетичного аналізу по окремих генах і цілих геномах необхідне нове комп’ютерне обладнання. Для реалізації поставлених завдань планується придбання нового ноутбуку. Будь які проєкти в галузі метаболічної інженерії вимагають біоінформатичної роботи. Після завершення проєкту комп’ютер буде використовуватися для аналогічної роботи.

3.6. Обсяг фінансування, необхідний для виконання наукового дослідження (розробки), з відповідним обґрунтуванням та наданням відповідного вичерпного переліку за кожною окремою статтю витрат по роках згідно зі статтями витрат, зазначеними у таблицях у Розділі VII (до 3 сторінок).

Обсяг фінансування, необхідний для реалізації запропонованого проєкту, становитиме 7 745 000 грн. Витрати за етапам становитимуть: 1 етап – 2 448 000 гривень, 2 етап – 1 019 000 гривень, 3 етап – 1 052 000 гривень, 4 етап – 1 017 000 гривень, 5 етап – 1 021 000 гривень, 6 етап – 1 188 000 гривень.

Загальні витрати на заробітну плату в рамках проєкту складуть 4 480 000 грн. Шість учасників проєкту (д.б.н. Дмитрук К., проф. Федорович Д., к.б.н. Фаюра Л., пров. інженер. Цирульник А., аспірантка Андреева Ю, аспірант Бандура Ю.) будуть отримувати місячну заробітну плату від 10 000 до 35 000 грн. Усі співробітники Інституту біології клітини, які беруть участь у проєкті, працюватимуть у проєкті протягом 36 місяців.

Для реалізації запропонованого проєкту необхідно закупити реактиви та матеріали. Відповідні кошти будуть виділені на синтез праймерів, секвенування

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

рекомбінантних плазмід тощо. Для забезпечення запланованої роботи будуть придбані хімічні сполуки, включаючи агарозу, акриламід/біс-акриламід, компоненти культуральних середовищ, дріжджовий екстракт, пептон, агар, джерела вуглецю та азоту та інші компоненти культурального середовища, хімічні речовини для буферів, реактиви, необхідні для молекулярної роботи (ферменти для молекулярної біології, набори для лігування, маркери молекулярної маси, набори для очищення ПЛР-фрагментів, набори для очищення ДНК з гелю, набори для виділення РНК та інші), антибіотики, сорбенти, фільтри для холодної стерилізації, лабораторне скляне та пластикове приладдя (колби, пробірки, чашки Петрі, кювети для електропорації, кювети для спектрофотометра, наконечники для дозаторів, пробірки для мікроцентрифуги та пробірки для ПЛР). Таким чином, витрати на придбання матеріалів протягом трьох років становитимуть 1 125 000 гривень (1 етап – 205 000 гривень, 2 етап – 180 000 гривень, 3 етап – 185 000 гривень, 4 етап – 180 000 гривень, 5 етап – 185 000 гривень, 6 етап – 190 000 гривень).

Для здійснення проєкту у 2022 році на першому етапі планується придбати ампліфікатор CFX Opus 96 (Bio-Rad) для проведення ПЛР у реальному часі. Вартість приладу становить 1 150 000 гривень. Прилад призначено для виконання завдань, що заплановані у даному проєкті. Зокрема будуть визначатися рівні експресії цільових генів. Визначення та порівняння експресії *RIB* генів у продуцентів РФ дозволить визначити гени, що лімітують надсинтез вітаміну B2. Ампліфікатор також буде використовуватися для визначення копій касет експресії в геномі реципієнтних штамів. Крім того, планується закупівля ноутбуку, вартістю 27 000 гривень. Комп'ютер необхідний для обробки даних секвенування геномів, передбачення генів, анотацію геномів та іншої біоінформатичної роботи.

Заплановано витрати на закордонне відрядження для керівника проєкту. Відрядження планується для участі в міжнародному дріжджовому конгресі в 2023 році. Вартість реєстраційного внеску, транспортні видатки та добові в сумі становитимуть 30 000 гривень.

Загальні непрямі витрати в рамках проєкту складуть 835 000 гривень (1 етап – 156 000 гривень, 2 етап – 131 000 гривень, 3 етап – 132 000 гривень, 4 етап – 131 000 гривень, 5 етап – 132 000 гривень, 6 етап – 153 000 гривень). Непрямі витрати включатимуть комунальні витрати (585 000 грн) та заробітну плату технічному персоналу (250 000 грн).

На першому етапі проєкту заплановано кошти на оплату послуг - секвенування геномів дріжджів, що становитиме 70 000 гривень. Секвенування сконструйованих

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

плазмід також буде оплачуватися за рахунок статті «Непрямі витрати», упродовж виконання наступних етапів проєкту.

3.7 Очікувані результати виконання проєкту (до 1 сторінки):

В результаті виконання проєкту буде сконструйовано продуценти РФ, ФМН та ФАД на основі флавіногенних дріжджів *S. famata*. Сконструйовані продуценти будуть здатні синтезувати вітамін В2 та флавінові коензими на середовищі на основі молочної сироватки, що є основним побічним продуктом молочної промисловості. Мікробні продуценти РФ, ФМН та ФАД з молочної сироватки будуть унікальною розробкою. Надпродукцію РФ, ФМН та ФАД з такої сировини у літературі не описано взагалі. Буде опрацьовано лабораторний регламент культивування продуцентів РФ, ФМН та ФАД на середовищі з різними вуглецевими субстратами, включаючи лактозу та молочну сироватку. Очікувана продукція РФ, ФМН та ФАД у колбах на середовищі на основі молочної сироватки буде становити щонайменше 2, 0,25 та 0,1 г/л, відповідно. Це дуже високі показники, втім, вони цілком реалістичні. Продукція цільових сполук у біореакторі буде значно вищою. Перевагою даної розробки є найвища продукція РФ, ФМН та ФАД з середовища на основі молочної сироватки. Більше того, продукція цільових сполук саме на дріжджах має переваги перед іншими системами, оскільки дріжджі характеризуються порівняно швидким ростом, здатні накопичувати високу біомасу, та для їх культивування використовують дешеві поживні середовища.

Результати, отримані в рамках даного проєкту, слугуватимуть цінною платформою для розробки технології промислового виробництва РФ, ФМН та ФАД з середовища на основі молочної сироватки. Отримані результати будуть представлені у вигляді наукових публікацій (щонайменше трьох) у міжнародних рецензованих журналах, заявки на патент та презентацій на національних та міжнародних наукових конференціях.

3.8 Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання проєкту в суспільній практиці (до 1 сторінки).

Сконструйовані в результаті роботи стабільні й високопродуктивні рекомбінантні дріжджові штами будуть використані для покращення технології промислового виробництва РФ на дешевому середовищі на основі молочної сироватки.

Розробка промислових штамів з високою продуктивністю біосинтезу РФ і флавінових нуклеотидів є важливим завданням для України (в Україні вітамін В2 не

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

виробляється) та інших країн. Світовий ринок рибофлавіну оцінюється приблизно в 300 мільйонів доларів США, а в Україні - біля 3 мільйонів доларів США.

На сьогодні, Україна купує рибофлавін в Китаї. Ми передбачаємо впровадження сконструйованих штамів у виробництво принаймні в Україні і забезпечення внутрішнього попиту власним продуктом на основі наших штамів. В Україні потреба у РФ як кормовій добавці є надзвичайно високою, оскільки наша країна є одним з найбільших світових виробників курячого м'яса і яєць.

Флавінові нуклеотиди переважають РФ за розчинністю у воді та ефективністю при лікуванні різноманітних захворювань. На сьогодні, ринок флавінових нуклеотидів надзвичайно обмежений у зв'язку з високою ціною препаратів. Ми передбачаємо, що конструювання надпродуцентів флавінових коферментів та розробка протоколів для культивування відповідних рекомбінантних штамів, будуть передумовою для розвитку ринку флавінових нуклеотидів, ФМН і ФАД.

Продуценти РФ, ФМН та ФАД отримані в результаті виконання даного проєкту, лабораторні регламенти культивування цих штамів будуть основою для розробки напівпромислових і промислових регламентів шляхом масштабування. Ми проводимо активну співпрацю з заводом препаратів мікробіологічного синтезу «Ензим» (м. Ладижин, Вінницька обл.). На базі даного підприємства можливе масштабування процесів культивування продуцентів флавінів та налагодження їх виробництва.

3.9 Можливі ризики, що можуть вплинути на реалізацію проєкту та шляхи їх запобігання чи вирішення (до 1 сторінки)

Найбільшим ризиком запропонованого проєкту було питання, чи здатні дріжджі продукувати флавіни на середовищі на основі молочної сироватки. Однак однозначну відповідь на це запитання дали наші результати, які описують здатність дріжджів *S. *farata** синтезувати РФ на молочної сироватці. Ці результати є основою заявки на європейський патент (PL435341 from 19.07.2021)

До можливих ризиків можна віднести:

Нестабільність отриманих продуцентів. Для уникнення нестабільності ми будемо використовувати альтернативні локуси для мультикопійної інтеграції як-от послідовності дріжджових транспозонів. Більше того, у разі нестабільності, для експресії цільових генів будуть використані різні сильні промотори та термінатори аби уникнути можливої гомологічної рекомбінації між касетами експресії.

Недостатнє зростання продукції РФ при посиленні експресії генів окислювальної

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

ланки пентозофосфатного шляху. У цьому випадку буде посилено експресію гена *SOL3*, що кодує 6-фосфоглюконолактоназу та каталізує гідроліз 6-фосфоглюконо- δ -лактону до 6-фосфоглюконату. Ця реакція також є частиною окислювальної ланки пентозофосфатного шляху.

Накопичення проміжних продуктів, зокрема РФ та ФМН при отриманні продуцентів ФАД. Накопичення проміжних продуктів буде усунено шляхом додаткового підвищення експресії відповідних генів.

Накопичення флавінів в клітині. Для уникнення цього ризику додатково буде посилено експресію нещодавно ідентифікованого експортера РФ (Tsygulnyk et al., 2020).

Серед ризиків економічного характеру основну небезпеку становить нестабільність національної валюти, адже цей чинник суттєво впливає на спроможність придбання необхідного обладнання і реактивів. Можливим шляхом подолання цього, з нашого досвіду, може бути пошук альтернативних джерел фінансування і оренда необхідного обладнання в інших лабораторіях.

3.10 Фінансування і тривалість виконання інших проєктів, в яких науковий керівник є керівником або виконавцем, і термін виконання яких повністю або частково збігається з терміном виконання проєкту, що фінансуватиметься Фондом.

Інші проєкти відсутні

Національний фонд досліджень України
 Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
 “Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

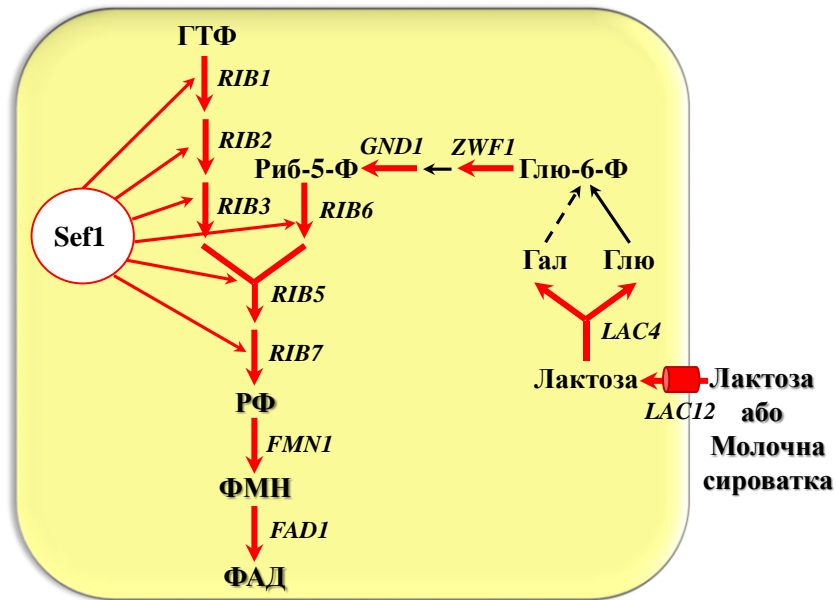


Рисунок. Схема шляху біосинтезу РФ, ФМН та ФАД з лактози. Червоними стрілками відзначено гени, експресію яких буде посилено. Скорочення: ГТФ – гуанозин-3-фосфат, Риб-5-Ф – рибулозо-5-фосфат, Глю-6-Ф – глюкозо-6-фосфат, Гал – галактоза, Глю – глюкоза, РФ – рибофлавін, ФМН – флавинмононуклеотид, ФАД – флавінаденіндинуклеотид. Гени: *RIB1* – ГТФ-циклогідролаза II, *RIB2* – 2,5-діаміно-4-окси-6-рибозиламінопіримідин-5’-фосфатредуктаза, *RIB3* – 2,5-діаміно-4-окси-6-рибітиламінопіримідин-5’-фосфатдезаміназа, *RIB5* – ДМРЛ-синтаза, *RIB6* – 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат-синтаза, *RIB7* – РФ-синтаза, *FMN1* – РФ-кіназа, *FAD1* – ФАД-синтетаза, *ZWF1* – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, *GND1* – 6-фосфоглюконатдегідрогеназа, *LAC4* – β-галактозидаза, *LAC12* – лактозопермеаза. Sef1 – транскрипційний фактор, позитивний регулятор синтезу РФ.

ЛІТЕРАТУРА

- Abbas CA, Sibirny AA. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2011; 75(2):321-360.
- Andreieva Y, Petrovska Y, Lyzak O, Liu W, Kang Y, Dmytruk K, Sibirny A. Role of the regulatory genes *SEF1*, *VMA1* and *SFU1* in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.3503>
- Averianova LA, Balabanova LA, Son OM, Podvolotskaya AB, Tekutyeva LA. Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8:570828.
- Balasubramaniam S, Christodoulou J, Rahman S. Disorders of riboflavin metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2019; 42(4):608-619.
- Bratiichuk D, Kurylenko O, Vasylyshyn R, et al. Development of new dominant selectable markers for the nonconventional yeasts *Ogataea polymorpha* and *Candida famata*. *Yeast*. 2020; 37: 505– 513.
- De Colibus L, Mattevi A. New frontiers in structural flavoenzymology. *Current Opinion in Structural Biology.* 2006; 16 (6): 722-728.
- Dmytruk K, Lyzak O, Yatsyshyn V, et al. Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production. *Journal of Biotechnology.* 2014; 172:11-17.
- Dmytruk KV, Abbas CA, Voronovsky AY, Kshanovska BV, Sybirna KA, Sibirny AA. Cloning of structural genes involved in riboflavin synthesis of the yeast *Candida famata*. *Ukr. Biokhim. Zh.* 2004 76(1):78–87.
- Dmytruk KV, Ruchala J, Fedorovych DV et al. Modulation of the purine pathway for riboflavin production in flavinogenic recombinant strain of the yeast *Candida famata*. *Biotechnology Journal.* 2020; <https://doi.org/10.1002/biot.201900468>
- Dmytruk KV, Sibirny AA. *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*. 2012; 29(11):453-8.
- Dmytruk KV, Voronovsky AY, Sibirny AA. Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. *Curr Genet.* 2006 50(3):183-191.
- Dmytruk KV, Yatsyshyn VY, Sibirna NO, et al. Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production. *Metabolic Engineering.* 2011; 13(1):82-8.

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

- Goldsmith SJ. Radioimmunoassay: review of basic principles. *Semin Nucl Med.* 1975; 5(2):125-52.
- Ishchuk OP, Dmytruk KV, Rohulya OV, Voronovsky AY, Abbas CA, Sibirny AA. Development of a promoter assay system for the flavinogenic yeast *Candida famata* based on the *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase *LAC4* reporter gene. *Enzyme and Microbial Technology.* 2008, 42:208–215.
- Joosten V, van Berkel WJ. Flavoenzymes. *Curr Opin Chem Biol.* 2007; 11(2):195-202.
- Kato T, Park EY. Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Biotechnol Lett.* 2012; 34(4):611-8.
- Mosegaard S, Dipace G, Bross P, Carlsen J, Gregersen N, Olsen RKJ. Riboflavin Deficiency- Implications for General Human Health and Inborn Errors of Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(11):3847.
- Pires AF, Marnotes NG, Rubio OD, Garcia AC, Pereira CD. Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods.* 2021; 10(5):1067
- Plantone D, Pardini M, Rinaldi G. Riboflavin in Neurological Diseases: A Narrative Review. *Clin Drug Investig.* 2021; 41(6):513-527.
- Sychevskyi M., Romanchuk I., Minorova A. Milk whey processing: prospects in Ukraine. *Food science and technology.* 2019. 13(4):58-68
- Tsyrunyk A. O., Andreieva Y. A., Ruchala J., Fayura L. R., Dmytruk K. V., Fedorovych D. V., Sibirny A. 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.3470>
- Voronovsky AA, Abbas CA, Fayura LR, Kshanovska BV, Dmytruk KV, Sybirna KA, Sibirny AA. Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata*. *FEMS Yeast Res.* 2002; 2(3):381-8.
- Voronovsky AY, Abbas CA, Dmytruk KV, Ishchuk OP, Kshanovska BV, Sybirna KA, Gaillardin C, Sibirny AA. *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) DNA sequences containing genes involved in riboflavin synthesis. *Yeast.* 2004 21(15):1307-1316.
- Yatsyshyn VY, Fedorovych DV, Sibirny AA. Metabolic and bioprocess engineering of the yeast *Candida famata* for FAD production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2014; 41(5):823-35.
- Yatsyshyn VY, Ishchuk OP, Voronovsky AY, Fedorovych DV, Sibirny AA. Production of flavin mononucleotide by metabolically engineered yeast *Candida famata*. *Metab Eng.* 2009; 11(3):163-7.

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

You J, Pan X, Yang C, Du Y, Osire T, Yang T, Zhang X, Xu M, Xu G, Rao Z. Microbial production of riboflavin: Biotechnological advances and perspectives. *Metab Eng.* 2021; 68:46-58.

Zhao G, Dong F, Lao X, Zheng H. Strategies to Increase the Production of Biosynthetic Riboflavin. *Mol Biotechnol.* 2021; 63(10):909-918.

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“ Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

ЕТАПИ ВИКОНАННЯ ПРОЄКТУ УЧАСНИКА КОНКУРСУ

Назва проєкту Створення ефективних продуцентів рибофлавіну та флавінових коензимів на основі дріжджів *Candida famata*

Науковий керівник проєкту Дмитрук Костянтин Васильович

4.1. Етапи виконання проєкту (ЕВП) та індикатори виконання

ЕВП № :1

Назва ЕВП: Секвенування та анотація геномів штаму дикого типу *Candida famata* та його похідного – надпродуцента вітаміну В2.

Цілі ЕВП: Провести повногеномні секвенування та анотацію геномів дріжджів *Candida famata*.

Заплановані завдання для ЕВП та організації, які їх виконують (до 1000 знаків). Повногеномне секвенування буде здійснено на платформі Illumina з ПЛР-вільною бібліотекою та довжиною зчитувань 2x150 п.н., з не менше ніж стократним перекриттям геному відносно його очікуваного розміру. De novo збірку даних з Illumina буде здійснено за допомогою програм Newbler v3.0 та/або SPAdes v. 3.15.2. Картування зчитувань буде проводитись з використанням BWA (LiandDurbin, 2010). Для обробки даних буде використано наступне програмне забезпечення: Guppy, Porechop, Proovread, Canu, Medaka. Для корекції консенсусу за допомогою даних з Illumina використовуватиметься PILON (Walkeretal., 2014). Передбачення генів та анотацію геномів буде здійснено за допомогою Prodigal (Hyattetal., 2010) та набору власних PERL-скриптів. Аналіз геномних варіацій та пошук SNPs буде здійснено програмою SNIPPY. Для філогенетичного аналізу по окремих генах – CuslalW, Figtree. Для філогенетичного аналізу цілих геномів – NDtree, REALPHY, CSIphylogeny (Ahrenfeldtetal., 2017).

Індикатори виконання (який науковий або інший результат буде отримано на визначеному етапі). Розшифрована повна послідовність геному дріжджів *Candida famata*. Список однонуклеотидних замін, що відрізняють геноми штаму дикого типу та його похідного, надпродуцента вітаміну В2

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“ Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

ЕВП № :2

Назва ЕВП: Визначення та посилення експресії лімітуючих структурних генів синтезу РФ.

Цілі ЕВП: Визначити структурні гени синтезу РФ експресія яких лімітує надсинтез вітаміну B2. Посилити експресію відповідних генів.

Заплановані завдання для ЕВП та організації, які їх виконують (до 1000 знаків).

Для визначення лімітуючих генів синтезу РФ буде використано наступний підхід. В наших попередніх роботах було сконструйовано штами продуценти РФ шляхом введення додаткових копій гена *SEF1*, що кодує транскрипційний фактор, який є позитивним регулятором синтезу вітаміну B2 (Dmytruk et al, 2011). В селекціонованих штамів зі збільшенням копій гена *SEF1*, зростає продукція РФ. Ми плануємо визначити та порівняти експресію *RIB* генів у таких штамів. Гени, експресія яких зростатиме, буде найбільш вірогідно лімітуючими. Відповідні гени буде поєднано у складі однієї плазмиди та введено у геном штаму AF-4. Зростання продукції РФ у отриманих трансформантів буде свідчити, що введені гени є лімітуючими. На наступному етапі ідентифіковані гени буде поміщено під контроль сильного конститутивного промотора гена *TEF1*, що кодує трансляційний фактор елонгації α . Відповідні касети експресії буде поєднано на одному векторі та введено в геном штаму AF-4. У отриманих трансформантів буде визначено продукцію РФ.

Індикатори виконання (який науковий або інший результат буде отримано на визначеному етапі). Рекомбінантні штами с посиленою експресією *RIB* генів, здатні до надсинтезу вітаміну B2

ЕВП № :3

Назва ЕВП: Посилення експресії генів окислювальної ланки пентозофосфатного шляху для збільшення продукції рибулозо-5-фосфату - попередника шляху синтезу РФ.

Цілі ЕВП: Посилити експресію генів *ZWF1* та *GND1*, що кодують глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу та 6-фосфоглюконатдегідрогеназу.

Заплановані завдання для ЕВП та організації, які їх виконують (до 1000 знаків).

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“ Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

Одним з двох попередників синтезу РФ є рибулозо-5-фосфат. Ця сполука синтезується з глюкозо-6-фосфату в результаті її дегідрогенізації та декарбоксілювання з утворенням НАДФН. Ці реакції каталізують ферменти глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа та 6-фосфоглюконатдегідрогеназа, які кодуються генами *ZWF1* та *GND1*, відповідно. На цьому етапі в секвенованому геномі *S. famata* буде ідентифіковано відповідні гени. За допомогою специфічних праймерів гени *ZWF1* та *GND1* буде ампліфіковано та створено касети експресії в яких цільові гени будуть знаходитись під контролем сильного конститутивного промотора. Буде створено декілька векторів, які міститимуть відповідні касети експресії окремо або разом. Вектори буде трансформовано у штами надпродуценти РФ. У трансформантів буде підтверджено наявність відповідних конструктів в геномі. Буде визначено рівень експресії та питомі активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та 6-фосфоглюконатдегідрогенази. У отриманих трансформантів буде визначено продукцію РФ.

Індикатори виконання (який науковий або інший результат буде отримано на визначеному етапі). Рекомбінантні штами с посиленою експресією генів окислювальної ланки пентозофосфатного шляху, здатні до надсинтезу вітаміну B2.

ЕВП № :4

Назва ЕВП: Створення продуцентів РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки шляхом надекспресії генів *SEF1*, *FMN1* та *FAD1* під контролем сильного або індукованого лактозою промоторів.

Цілі ЕВП: Сконструювати продуценти РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки шляхом надекспресії генів *SEF1*, *FMN1* та *FAD1*

Заплановані завдання для ЕВП та організації, які їх виконують (до 1000 знаків).

Підвищення продукції РФ буде досягнуто шляхом надекспресії гомологічного гена *SEF1*, що є позитивним регулятором синтезу вітаміну B2. ФМН синтезується з РФ шляхом його фосфорилування за участі РФ-кінази, що кодується геном *FMN1*. ФАД, в свою чергу, синтезується з ФМН шляхом його аденілювання за участі ФАД-синтетази, що кодується геном *FAD1*. У нашій попередній роботі гени *FMN1* та *FAD1* з спорідненого виду дріжджів *Debaryomyces hansenii* було експресовано в геномі *S. famata*. Сконструйовані

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

штами були здатні до продукції ФМН та ФАД з глюкози (Yatsyshyn et al, 2009, 2014). Використовуючи наявну геномну послідовність ДНК буде виявлено гомологічні гени *FMN1* та *FAD1*. Їх послідовності буде проаналізовано на наявність потенційних сайтів убіквітинування. Модифіковані гени буде поміщено під контроль конститутивного (рTEF1) або регульованого (рLAC4) промоторів для забезпечення максимальної експресії на середовищі на основі лактози та сироватки.

Індикатори виконання (який науковий або інший результат буде отримано на визначеному етапі). Штами дріжджів з посиленою експресією генів *SEF1*, *FMN1* та *FAD1* здатні до надпродукції РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки.

ЕВП № :5

Назва ЕВП: Посилення продукції РФ, ФМН та ФАД з сироватки за допомогою активації шляху катаболізму лактози.

Цілі ЕВП: Підвищити продукцію РФ, ФМН та ФАД з сироватки за допомогою активації шляху катаболізму лактози.

Заплановані завдання для ЕВП та організації, які їх виконують (до 1000 знаків).

Катаболізм дисахариду лактози у дріжджів починається з її потрапляння в середину клітини за допомогою специфічного транспортера лактозопермеази, який кодується геном *LAC12*. Далі лактоза гідролізується до глюкози та галактози за участі β -галактозидази, що кодується геном *LAC4*. На основі геному *S. famata* буде проведено пошук генів *LAC12* та *LAC4*. Відповідні гени буде ампліфіковано з геномної ДНК *S. famata* з використанням специфічних праймерів. Буде створено декілька варіантів модулів експресії, в яких гени будуть поміщені під контроль сильного промотора гена *TEF1*, або під контроль промотора гена *LAC4*. Обидва гени буде ко-експресовано в геномі продуцентів РФ, ФМН та ФАД. Посилення експресії генів буде підтверджено за допомогою ПЛР у реальному часі. Також визначатиметься питома активність β -галактозидази. У отриманих трансформантів буде визначено кінетичні характеристики росту та продукції флавінів на середовищі з лактозою та молочною сироваткою.

Індикатори виконання (який науковий або інший результат буде отримано на визначеному етапі). Рекомбінантні штами с посиленою експресією генів транспорту та катаболізму лактози, здатні до підвищеної продукції флавінів на середовищі з додаванням лактози та молочної сироватки.

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“ Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

ЕВП № :6

Назва ЕВП: Аналіз продуцентів РФ, ФМН та ФАД в біореакторі та оптимізація умов культивування.

Цілі ЕВП: Оптимізувати умови ферментації для досягнення максимальної продукції РФ, ФМН та ФАД.

Заплановані завдання для ЕВП та організації, які їх виконують (до 1000 знаків).

Оптимізацію умов культивування, що сприятимуть надсинтезу РФ, ФМН та ФАД, буде розпочато з культивування у колбах. Для досягнення максимальної продукції РФ, ФМН та ФАД будуть протестовані різні типи середовищ, джерела Карбону та Нітрогену. Подальша оптимізація продукції РФ, ФМН та ФАД буде проводитися в лабораторних ферментерах об'ємом 1 л. Буде опрацьовано режими batch, fed-batch та безперервного культивування. Ми будемо вивчати вплив умов ферментації (температура, рН та аерація), компонентів поживного середовища та початкової біомаси на ріст і синтез РФ, ФМН та ФАД сконструйованими штамми. Буде досліджуватися вплив типу молочної сироватки, отриманої від різних виробників, та її концентрації на продукцію флавінів. Також буде визначено продукцію РФ, ФМН та ФАД, продуктивність та вихід.

Індикатори виконання (який науковий або інший результат буде отримано на визначеному етапі). Буде розроблено лабораторний регламент культивування найліпших продуцентів РФ, ФМН та ФАД для досягнення максимальної продукції та виходу цільових сполук на різних середовищах, включаючи середовище на основі молочної сироватки.

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

виконання наукового дослідження (розробки) на 2022-2025 рік/роки

Назва проєкту Створення ефективних продуцентів рибофлавіну та флавінових коензимів на основі дріжджів *Candida famata*

Науковий керівник проєкту Дмитрук Костянтин Васильович

№ етапу	Назва етапу виконання Проєкту	Цілі ЕВП	Заплановані завдання для ЕВП	Термін виконання (початок-завершення), місяць, рік	Індикатори виконання (науковий або інший результат, який буде отримано в межах етапу)	Розмір фінансування, грн.
1	Секвенування та анотація геномів штаму дикого типу <i>Candida famata</i> та його похідного – надпродуце	Провести повногеномні секвенування та анотацію геномів дріжджів <i>Candida famata</i> .	Повногеномне секвенування буде здійснено на платформі Illumina з ПЛР-вільною бібліотекою та довжиною зчитувань 2x150 п.н., з не менше ніж стократним перекриттям геному відносно його очікуваного розміру. De novo збірку даних з Illumina буде здійснено за допомогою програм Newbler v3.0 та/або SPAdes v. 3.15.2. Картування зчитувань буде проводитись з використанням	Червень 2022 – Грудень 2022	Розшифрована повна послідовність геному дріжджів <i>Candida famata</i> . Список одонуклеотидних замінів, що відрізняють геноми штаму дикого типу та його похідного, надпродуцента вітаміну B2	2 448 000

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“ Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

	нта вітаміну B2.	BWA (LiandDurbin, 2010). Для обробки даних буде використано наступне програмне забезпечення: Guppy, Porechop, Proovread, Canu, Medaka. Для корекції консенсусу за допомогою даних з Illumina використовуватиметься PILON (Walkeretal., 2014). Передбачення генів та анотацію геномів буде здійснено за допомогою Prodigal (Hyattetal., 2010) та набору власних PERL-скриптів. Аналіз геномних варіацій та пошук SNPs буде здійснено програмою SNIPPY. Для філогенетичного аналізу по окремих генах – CustalW, Figtree. Для філогенетичного аналізу цілих геномів – NDtree, REALPHY, CSIphylogeny (Ahrenfeldtetal., 2017).			
Розмір фінансування за ЕВП № 1, грн.					2 448 000

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“ Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

2	Визначення та посилення експресії лімітуючих структурних генів синтезу РФ.	Визначити структурні гени синтезу РФ експресія яких лімітує надсинтез вітаміну B2. Посилити експресію відповідних генів.	Для визначення лімітуючих генів синтезу РФ буде використано наступний підхід. В наших попередніх роботах було сконструйовано штами продуценти РФ шляхом введення додаткових копій гена <i>SEF1</i> , що кодує транскрипційний фактор, який є позитивним регулятором синтезу вітаміну B2 (Dmytruk et al, 2011). В селекціонованих штамів зі збільшенням копій гена <i>SEF1</i> , зростає продукція РФ. Ми плануємо визначити та порівняти експресію <i>RIB</i> генів у таких штамів. Гени, експресія яких зростатиме, буде найбільш вірогідно лімітуючими. Відповідні гени буде поєднано у складі однієї плазмиди та введено у геном штаму AF-4. Зростання продукції РФ у отриманих трансформантів буде свідчити, що введені гени є лімітуючими. На наступному етапі ідентифіковані гени буде поміщено під контроль сильного конститутивного промотора гена <i>TEF1</i> , що кодує трансляційний фактор елонгації α . Відповідні касети експресії буде поєднано на одному векторі та введено в геном	Березень 2023 – липень 2023	Рекомбінантні штами с посиленою експресією <i>RIB</i> генів, здатні до надсинтезу вітаміну B2	1 019 000
---	--	--	--	-----------------------------	---	-----------

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

			штаму AF-4. У отриманих трансформантів буде визначено продукцію РФ.			
Розмір фінансування за ЕВП № 2, грн.						1 019 000
3	Посилення експресії генів окислювальної ланки пентозофосфатного шляху для збільшення продукції рибулозо-5-фосфату - попередника шляху синтезу РФ.	Посилити експресію генів <i>ZWF1</i> та <i>GND1</i> , що кодують глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу та 6-фосфоглюконатдегідрогеназу.	Одним з двох попередників синтезу РФ є рибулозо-5-фосфат. Ця сполука синтезується з глюкозо-6-фосфату в результаті її дегідрогенізації та декарбоксілювання з утворенням НАДФН. Ці реакції каталізують ферменти глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа та 6-фосфоглюконатдегідрогеназа, які кодуються генами <i>ZWF1</i> та <i>GND1</i> , відповідно. На цьому етапі в секвенованому геномі <i>C. famata</i> буде ідентифіковано відповідні гени. За допомогою специфічних праймерів гени <i>ZWF1</i> та <i>GND1</i> буде ампліфіковано та створено касети експресії в яких цільові гени будуть знаходитись під контролем	Серпень 2023 – Грудень 2023	Рекомбінантні штами с посиленою експресією генів окислювальної ланки пентозофосфатного шляху, здатні до надсинтезу вітаміну B2	1 052 000

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

			<p>сильного конститутивного промотора. Буде створено декілька векторів, які міститимуть відповідні касети експресії окремо або разом. Вектори буде трансформовано у штами надпродуценти РФ. У трансформантів буде підтверджено наявність відповідних конструктів в геномі. Буде визначено рівень експресії та питомі активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та 6-фосфоглюконатдегідрогенази. У отриманих трансформантів буде визначено продукцію РФ.</p>			
Розмір фінансування за ЕВП № 3, грн.						1 052 000
4	Створення продуценті в РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки шляхом надекспрес	Сконструюват и продуценти РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки шляхом надекспресії генів <i>SEF1</i> ,	Підвищення продукції РФ буде досягнуто шляхом надекспресії гомологічного гена <i>SEF1</i> , що є позитивним регулятором синтезу вітаміну В2. ФМН синтезується з РФ шляхом його фосфорилування за участі РФ-кінази, що кодується геном <i>FMN1</i> . ФАД, в свою чергу, синтезується з ФМН шляхом його	Березень 2024 – Липень 2024	Штами дріжджів з посиленою експресією генів <i>SEF1</i> , <i>FMN1</i> та <i>FAD1</i> здатні до надпродукції РФ, ФМН та ФАД на середовищі на основі сироватки.	1 017 000

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

	її генів <i>SEF1</i> , <i>FMN1</i> та <i>FAD1</i> під контролем сильного або індукованого лактозою промоторів .	<i>FMN1</i> та <i>FAD1</i>	та аденілювання за участі ФАД-синтетази, що кодується геном <i>FAD1</i> . У нашій попередній роботі гени <i>FMN1</i> та <i>FAD1</i> з спорідненого виду дріжджів <i>Debaryomyces hansenii</i> було експресовано в геномі <i>S. famata</i> . Сконструйовані штами були здатні до продукції ФМН та ФАД з глюкози (Yatsyshyn et al, 2009, 2014). Використовуючи наявну геномну послідовність ДНК буде виявлено гомологічні гени <i>FMN1</i> та <i>FAD1</i> . Їх послідовності буде проаналізовано на наявність потенційних сайтів убіквітинування. Модифіковані гени буде поміщено під контроль конститутивного (pTEF1) або регульованого (pLAC4) промоторів для забезпечення максимальної експресії на середовищі на основі лактози та сироватки.			
Розмір фінансування за ЕВП № 4, грн.						1 017 000
5	Посилення продукції РФ, ФМН та ФАД з	Підвищити продукцію РФ, ФМН та ФАД з	Катаболізм дисахариду лактози у дріжджів починається з її потрапляння в середину клітини за допомогою специфічного	Серпень 2024 – Грудень 2024	Рекомбінантні штами с посиленою експресією генів транспорту та	1 021 000

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

<p>сироватки за допомогою активації шляху катаболізм у лактози.</p>	<p>сироватки за допомогою активації шляху катаболізму лактози.</p>	<p>транспортера лактозопермеази, який кодується геном <i>LAC12</i>. Далі лактоза гідролізується до глюкози та галактози за участі β-галактозидази, що кодується геном <i>LAC4</i>. На основі геному <i>S. famata</i> буде проведено пошук генів <i>LAC12</i> та <i>LAC4</i>. Відповідні гени буде ампліфіковано з геномної ДНК <i>S. famata</i> з використанням специфічних праймерів. Буде створено декілька варіантів модулів експресії, в яких гени будуть поміщені під контроль сильного промотора гена <i>TEF1</i>, або під контроль промотора гена <i>LAC4</i>. Обидва гени буде ко-експресовано в геномі продуцентів РФ, ФМН та ФАД. Посилення експресії генів буде підтверджено за допомогою ПЛР у реальному часі. Також визначатиметься питома активність β-галактозидази. У отриманих трансформантів буде визначено кінетичні характеристики росту та продукції флавінів на середовищі з лактозою та молочною сироваткою.</p>	<p>катаболізму лактози, здатні до підвищеної продукції флавінів на середовищі з додаванням лактози та молочної сироватки.</p>
---	--	---	---

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

Розмір фінансування за ЕВП № 5, грн.					1 021 000	
6	Аналіз продуцентів в РФ, ФМН та ФАД в біореакторі та оптимізація умов культивування.	Оптимізувати умови ферментації для досягнення максимальної продукції РФ, ФМН та ФАД.	Оптимізацію умов культивування, що сприятимуть надсинтезу РФ, ФМН та ФАД, буде розпочато з культивування у колбах. Для досягнення максимальної продукції РФ, ФМН та ФАД будуть протестовані різні типи середовищ, джерела Карбону та Нітрогену. Подальша оптимізація продукції РФ, ФМН та ФАД буде проводитися в лабораторних ферментерах об'ємом 1 л. Буде опрацьовано режими batch, fed-batch та безперервного культивування. Ми будемо вивчати вплив умов ферментації (температура, рН та аерація), компонентів поживного середовища та початкової біомаси на ріст і синтез РФ, ФМН та ФАД сконструйованими штамми. Буде досліджуватися вплив типу молочної сироватки, отриманої від різних виробників, та її концентрації на продукцію флавінів. Також буде визначено продукцію РФ, ФМН та ФАД,	Березень 2025 – Липень 2025	Буде розроблено лабораторний регламент культивування найліпших продуцентів РФ, ФМН та ФАД для досягнення максимальної продукції та виходу цільових сполук на різних середовищах, включаючи середовище на основі молочної сироватки.	1 188 000

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

			продуктивність та вихід.			
Розмір фінансування за ЕВП № 6, грн.						1 188 000
Загальний розмір фінансування грантоотримувача, грн.						7 745 000

Фінансування проєкту

Обсяг фінансування

Термін реалізації проєкту	Трирічний - 5 та 6 етапи
Обсяг фінансування проєкту (грн.)	7,745,000
Обсяг фінансування проєкту, перший рік - 1 та 2 етап (грн)	3,467,000
Обсяг фінансування проєкту, другий рік - 3 та 4 етап (грн)	2,069,000
Обсяг фінансування проєкту, третій рік - 5 та 6 етап (грн)	2,209,000

Етапи фінансування

Обсяг фінансування, етап 1	2,448,000
Обсяг фінансування, етап 2	1,019,000
Обсяг фінансування, етап 3	1,052,000
Обсяг фінансування, етап 4	1,017,000
Обсяг фінансування, етап 5	1,021,000
Обсяг фінансування, етап 6	1,188,000

Національний фонд досліджень України
Конкурс проєктів із виконання наукових досліджень і розробок
“Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

	вартості проєкту).									
	Разом, грн	2448000	1019000	3467000	1052000	1017000	2069000	1021000	1188000	2209000
	Разом витрати по проєкту, грн	7745000								

Учасник конкурсу/субвиконавці

Інститут біології клітини

Учасник

Організаційно-правова форма підприємства
/установи/організації

Державна організація (установа, заклад,
підприємство)

Підпорядкованість підприємства/установи
/організації

Національна академія наук України

Код ЄДРПОУ

25255758

Код(и) КВЕД

72.11

Стратегічні напрями наукової діяльності

Дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій

ПІБ керівника підприємства/установи/організації

Сибірний Андрій Андрійович

Юридична адреса підприємства/установи/організації

79005, Львівська обл., місто Львів, Галицький район, ВУЛ. ДРАГОМАНОВА, будинок 14/16

Поштова адреса

79005, Львівська обл., місто Львів, Галицький район, ВУЛ. ДРАГОМАНОВА, будинок 14/16

Фактична адреса

79005, Львівська обл., місто Львів, Галицький район, ВУЛ. ДРАГОМАНОВА, будинок 14/16

Телефон

+380322 612 108

Адреса електронної пошти

institut@cellbiol.lviv.ua

Посилання на веб сторінку підприємства/установи/організації

<https://www.cellbiol.lviv.ua>

Керівник проекту

Доктор Дмитрук Костянтин Васильович

Стать чол	Дата народження 06.07.1977
Країна постійного проживання Україна	Громадянство Україна
Мобільний телефон +38(050)661-68-86	E-mail dmytruk77@gmail.com
Інші контакти (skype, viber, інше) Viber +38(050)661-68-86	

НАУКОВИЙ ПРОФІЛЬ

Науково-дослідний профіль (Orcid, Google Scholar, Scopus authors, інші) мінімум два:
<http://orcid.org/0000-0003-3661-8913>; <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6506592217>; <https://scholar.google.com/citations?user=N7W0cpAAAAAJ>

Науковий стаж, кількість років 23	Загальна кількість патентів 14
Загальна кількість публікацій 74	Кількість публікацій у виданнях 1-го – 2-го квартилів за останні 10 років 33
Індекс Хірша (SCOPUS) 16	Кількість монографій 2

Гранти, отримані на дослідження, зокрема гранти ДФФД

- INTAS 05-1000005-7730 1.06.2006 – 31.05.2008 Metabolic Engineering of Xylose Metabolism in the Yeast *Pichia stipitis*.
- STCU проект 4378, 01.08.2007 – 01.10.2009. Gene and Protein Engineering of Oxidoreductases for Construction of Bionanosized Objects of Analytical Importance.
- STCU проект 3892, 01.04.2007 - 01.06.2009. Metabolic engineering of alcoholic fermentation of plant residues in non-conventional yeasts.
- CRDF (US Civilian Research and Development Foundation), Science and Technology Entrepreneurship Program (STEP) 2010-2011. Biotechnological production of vitamin B2 (riboflavin) based on yeasts.
- STCU проект 5505, 01.12.2011 - 01.05.2013. Metabolic engineering of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* for increasing ethanol productivity during high-temperature xylose fermentation.
- STCU проект 5729, 01.12.2012 - 01.05.2014. Metabolic engineering of the yeast *Candida famata* for construction of robust riboflavin producers.
- IPBU.03.01.00-18-452/11, 2013-2015. Scientific integration of the Polish-Ukrainian borderland area in the field of monitoring and detoxification of harmful substances in environment.
- STCU проект 6188, 01.08.2016 - 31.07.2018. In silico metabolic modelling of the yeast *Hansenula polymorpha* for the improvement of xylose fermentation.

Досвід проведення експертизи (рецензування наукових статей, експертиза дослідницьких проектів)

Рецензування статей в міжнародних журналах (Genes to Cells (Impact Factor 2.0), Yeast (Impact Factor 2.3), FEMS Yeast Research (Impact Factor 3.29), Journal of Agricultural and Food Chemistry (Impact Factor 4.2), Frontiers in Bioengineering and Biotechnology (Impact Factor 4.36), Microbial Cell Factories (Impact Factor 4.4), Virulence (Impact Factor 5.5), Current Research in Biotechnology, The Open Agriculture Journal) та експертиза проектів (National Science Centre in Poland) за тематикою: біотехнологія, метаболічна інженерія, мікробіологія, молекулярна генетика

НАУКОВА ДІЯЛЬНІСТЬ

Молекулярна генетика

Науковий напрям

Біологія, медицина і аграрні науки

Галузь науки

Біологічні науки

Кількість публікацій за галуззю експертизи або напрямком досліджень

74

Ключові слова

Biotechnology, metabolic engineering, microbiology, molecular genetics

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ (ПУБЛІКАЦІЙ), НАЯВНІСТЬ ЯКИХ Є НЕОБХІДНОЮ УМОВОЮ ДЛЯ УЧАСТІ У КОНКУРСІ (НЕ БІЛЬШЕ 12 ПРАЦЬ)

[10.1002/yea.1182](#)

Voronovsky Andriy Y., Abbas Charles A., Dmytruk Kostyantyn V., Ishchuk Olena P., Kshanovska Barbara V., Sybirna Kateryna A., Gaillardin Claude, Sibirny Andriy A.

Candida famata (Debaryomyces hansenii) DNA sequences containing genes involved in riboflavin synthesis

Yeast, Wiley, 2004

Riboflavin, yeast

[10.1007/s00294-006-0083-0](#)

Dmytruk Kostyantyn V., Voronovsky Andriy Y., Sibirny Andriy A.

Insertion mutagenesis of the yeast Candida famata (Debaryomyces hansenii) by random integration of linear DNA fragments

Current Genetics, Springer Science and Business Media LLC, 2006

Insertion mutagenesis, yeast

[10.1016/j.enzmictec.2007.09.008](#)

Ishchuk Olena P., Dmytruk Kostyantyn V., Rohulya Olga V., Voronovsky Andriy Y., Abbas Charles A., Sibirny Andriy A.

Development of a promoter assay system for the flavinogenic yeast Candida famata based on the Kluyveromyces lactis β -galactosidase LAC4 reporter gene

Enzyme and Microbial Technology, Elsevier BV, 2007

Promoter assay system, riboflavin

10.1016/j.ymben.2010.10.005

Dmytruk Kostyantyn V., Yatsyshyn Valentyna Y., Sybirna Natalia O., Fedorovych Daria V., Sibirny Andriy A.

Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production

Metabolic Engineering, Elsevier BV, 2010

Metabolic engineering, yeast

10.1002/yea.2929

Dmytruk Kostyantyn V., Sibirny Andriy A.

Candida famata (*Candida flareri*)

Yeast, Wiley, 2012

Yeast, *Candida famata*

10.1016/j.jbiotec.2013.12.005

Dmytruk Kostyantyn, Lyzak Oleksy, Yatsyshyn Valentyna, Kluz Maciej, Sibirny Vladimir, Puchalski Czeslaw, Sibirny Andriy

Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production

Journal of Biotechnology, Elsevier BV, 2013

Riboflavin, yeast

10.1002/yea.3467

Bratiichuk Dmytro, Kurylenko Olena, Vasylyshyn Roksolana, Zuo MingXing, Kang Yingqian, Dmytruk Kostyantyn, Sibirny Andriy

Development of new dominant selectable markers for the nonconventional yeasts *Ogataea polymorpha* and *Candida famata*

Yeast, Wiley, 2020

Dominant selectable markers, yeast

10.1002/biot.201900468

Dmytruk Kostyantyn V., Ruchala Justyna, Fedorovych Daria V., Ostapiv Roman D., Sibirny Andriy A.

Modulation of the Purine Pathway for Riboflavin Production in Flavinogenic Recombinant Strain of the Yeast *Candida famata*

Biotechnology Journal, Wiley, 2020

Purine pathway, riboflavin

10.1002/yea.3470

Tsyurulnyk Andriy O., Andreieva Yuliia A., Ruchala Justyna, Fayura Lyubov R., Dmytruk Kostyantyn V., Fedorovych Daria V., Sibirny Andriy 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, Wiley, 2020

Riboflavin efflux, yeast

[10.1002/yea.3503](#)

Andreieva Yuliia, Petrovska Yana, Lyzak Oleksii, Liu Wen, Kang Yingqian, Dmytruk Kostyantyn, Sibirny Andriy

Role of the regulatory genes SEF1, VMA1 and SFU1 in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*)

Yeast, Wiley, 2020

Riboflavin, regulatory genes

[10.1016/S1567-1356\(02\)00112-5](#)

VORONOVSKY A, ABBAS C, FAYURA L, KSHANOVSKA B, DMYTRUK K, SYBIRNA K, SIBIRNY A

Development of a transformation system for the flavinogenic yeast

FEMS Yeast Research, Oxford University Press (OUP), 2002

Yeast, riboflavin

ПЕРЕЛІК МОНОГРАФІЙ АБО ПАТЕНТІВ, НАЯВНІСТЬ ЯКИХ Є НЕОБХІДНОЮ УМОВОЮ ДЛЯ УЧАСТІ У КОНКУРСІ (НЕ БІЛЬШЕ 12)

90741, 2010: ШТАМ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA* ІМВ Y-5033 - СТАБІЛЬНИЙ ПРОДУЦЕНТ РИБОФЛАВІНУ (ВІТАМІНУ B2)

VITAMIN B2, yeast

111511, 2016: СПОСІБ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*, ЗДАТНИХ ДО НАДСИНТЕЗУ ГЛУТАТІОНУ

Glutathione, yeast

79021, 2013: СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЕТАНОЛУ З КСИЛОЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA* З ПОСИЛЕНОЮ ЕКСПРЕСІЄЮ ПЕРОКСИСОМНИХ ФЕРМЕНТІВ, ЗДАТНИХ ДО ЕФЕКТИВНОЇ КОНВЕРСІЇ КСИЛОЗИ ДО ЕТАНОЛУ

Alcoholic fermentation, yeast

133594, 2019: СПОСІБ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA* З ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ СИНТЕЗУ ВІТАМІНУ В (РИБОФЛАВІНУ)

Riboflavin, yeast

134629, 2019: СПОСІБ ОТРИМАННЯ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ЗДАТНИХ ДО НАДПРОДУКЦІЇ ЕТАНОЛУ

yeast, alcoholic fermentation

127728, 2018: СПОСІБ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ ПЕКАРСЬКИХ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ЗДАТНИХ ДО НАДПРОДУКЦІЇ ГЛІЦЕРОЛУ

Glycerin, yeast

90754, 2010: ШТАМ ДРІЖДЖІВ CANDIDA FAMATA IMB Y-5034 - ПРОДУЦЕНТ РИБОФЛАВІНУ (ВІТАМІНУ В2)

Riboflavin, yeast

US Patent 10,577,580, 2020: Methods for the positive selection of ethanol overproducing mutants from *Saccharomyces cerevisiae*

Alcoholic fermentation, yeast

79020, 2013: СПОСІБ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* З ПІДВИЩЕНОЮ АКТИВНІСТЮ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ

Ethanol, yeast, fermentation

ОСВІТА

Львівський Національний університет імені Івана Франка

Країна

Україна

Місто

Львів

Факультет

Біологічний

Спеціальність

Біологія

Номер диплому

ЛВ ВС №017894

Дата видачі диплому

30.06.1999

МІСЦЕ РОБОТИ ТА ПОСАДА

Інститут біології клітини

Посада

Заступник директора з наукової роботи

Період роботи

26.11.1998 - Досі працюю

Підпорядкованість

НАН України

ЄДРПОУ

25255758

Країна

Україна

Місто

Львів

Адреса установи

Драгоманова 14/16, Львів, Україна, 79005

Робочий телефон

+380322612163

НАУКОВИЙ СТУПІНЬ

Доктор

Номер диплому
DD №005805

Дата видачі диплому
29.09.2016

АКАДЕМІЧНЕ АБО ВЧЕНЕ ЗВАННЯ

- Старший науковий співробітник

Національна Академія Наук України

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ

79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16,
тел. (032) 261-21-08 факс (032) 261-21-48
E-mail: institut@cellbiol.lviv.ua



National Academy of Sciences of Ukraine

INSTITUTE OF CELL BIOLOGY

Drahomanov St., 14/16, 79005 Lviv, Ukraine
Tel. (380-32) 261-21-08 Fax. 380-32-261-21-48
E-mail: institut@cellbiol.lviv.ua

Згода

керівника підприємства/установи/організації - учасника конкурсу
(керівника підприємства/установи/організації – субвиконавця)
на виконання проекту з виконання наукового дослідження (розробки)

Національний фонд
досліджень України

№ 259 від «11» листопада 2021 року
На № від « » 20 року

Інститут біології клітини НАН України

(найменування підприємства/установи/організації)

в особі директора Інституту біології клітини НАН України Сибірного Андрія Андрійовича

(посада, прізвище, ім'я, по-батькові, посада)

надає згоду на реалізацію проекту Створення ефективних продуцентів рибофлавіну та флавінових коензимів на основі дріжджів *Candida famata*,

(назва проекту)

за пріоритетним напрямом розвитку науки і техніки (у відповідності до Статті 3 Закону України “Про пріоритетні напрями розвитку науки і техніки”)

Раціональне природокористування,

науковим керівником якого є заступник директора з наукової роботи Дмитрук Костянтин Васильович

(посада, прізвище, ім'я, по-батькові, посада)

в період з «01» червня 2022 року по «31» липня 2025 року

(строки реалізації проекту)

на базі Інституту біології клітини НАН України

(найменування підприємства/установи/організації організації)

у разі визначення переможцем за результатами конкурсу проектів із виконання наукових досліджень і розробок “Передові дослідження в галузі математичних, природничих і технічних наук”.

Директор Інституту
біології клітини НАН
України

(підпис, печатка)

Сибірний А. А.

