

ЗАПИТ **на виконання науково-технічного проєкту**

1. Назва науково-технічного проєкту

Розробка лабораторного та напівпромислового регламентів отримання вітаміну В2 з гідролізатів лігноцелюлози з використанням рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata*

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Науково-технічні проєкти установ НАН України 2022 року

4. Назва розділу програми або напрямку цільового проєкту

8 Новітні біотехнології для охорони здоров'я, фармакології та агропромислового комплексу

5. Строки виконання науково-технічного проєкту 2022 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 (прикладні дослідження)

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Молекулярні біотехнології створення нових організмів та продуктів для сільського господарства, фармацевтичної та харчової промисловості

9. Код та назва наукового напрямку (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук

н е м а є

10. Науковий керівник науково-технічного проєкту

Сибірний Андрій Андрійович, академік НАН України, д.б.н., проф., директор, Інститут біології клітини НАН України

телефон: +38 032 261 2163; факс: +38 032 261 2148; e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Дмитрук Костянтин Васильович	д.б.н., с.н.с., заступник директора з наукової роботи, ІБК НАН України, тел.: +38 032 261 2163, e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua	
Федорович Дарія Василівна	д.б.н., проф., провідний науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: , e-mail: fedorovych.d@gmail.com	
Фаюра Любов Романівна	к.б.н., науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (380-32) 261-21-42 , e-mail: fayural@gmail.com	
Цирульник Андрій Олександрович	провідний інженер, ІБК НАН України, тел.: (032) 2612142, e-mail: atsyrulnyk@nas.gov.ua	
Андреєва Юлія Андріївна	аспірант, ІБК НАН України, тел.: (032)2612108, e-mail: AndreyevaYu@nas.gov.ua	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

гідролізати лігноцелюлози, вітамін В2 (рибофлавін), дріжджі, продуценти рибофлавіну

14. Резюме

Потреби у вітаміні В2 забезпечуються за рахунок його мікробіологічного виробництва за допомогою рекомбінантних штамів грибів *Ashbya gossypii* та бактерії *Bacillus subtilis*. Недоліком штамів-продуцентів є їх низька продуктивність, генетична нестабільність та необхідність використання коштовних глюкозовмісних та жировмісних середовищ. Дріжджі *Candida famata* є перспективними для отримання препаратів вітаміну В2, оскільки у нашій попередній роботі було сконструйовано рекомбінантні стабільні високопродуктивні штами цих дріжджів, які здатні використовувати для росту і синтезу рибофлавіну напівпродукти та відходи харчової промисловості (меляса, сусло, молочна сироватка) та гідролізати рослинної біомаси (відходи сільського господарства, деревообробної та целюлозно-паперової промисловості). Основними продуктами гідролізатів рослинної біомаси є глюкоза та п'ятиуглецевий цукор ксилоза. Здатність *C. famata* використовувати ксилозу як єдине джерело Карбону для росту і синтезу рибофлавіну відкриває нові перспективи для отримання вітаміну В2, використовуючи дешеві гідролізати лігноцелюлози. Мета проекту полягає у розробці лабораторного та напівпромислового регламентів отримання вітаміну В2 з гідролізатів лігноцелюлози з використанням рекомбінантних штамів дріжджів *C. famata*. У запропонованому проекті передбачено провести оптимізацію умов культивування штамів-продуцентів рибофлавіну у середовищі з гідролізатами лігноцелюлози, розробити лабораторний регламент, масштабувати цей процес та розробити напівпромисловий регламент отримання вітаміну В2.

Заплановані експерименти можуть бути виконані до кінця 2022 року.

15. Обґрунтування доцільності виконання науково-технічного проекту

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Завданням роботи є опрацювання лабораторного та напівпромислового регламентів отримання препаратів вітаміну В2 на гідролізатах лігноцелюлози. Вітамін В2 (рибофлавін) є незамінним компонентом харчування людини, цінним профілактичним препаратом та необхідною складовою

кормів, які використовуються у тваринництві та птахівництві. Від 1 до 3% генів бактерійних та еукаріотичних геномів кодуєть білки, що містять флавіни. Флавінові коферменти ФМН і ФАД залучені у процеси клітинного дихання, детоксикації ароматичних сполук та важких металів, мікросомального окислення, біолюмінісценції, фототропізму, репарації, можуть індукувати оксидативний стрес та захищати клітину від нього [Powers, 2003 Liu Shuang et al., 2020, Wang Y, et al., 2021]. Дефіцит рибофлавіну може приводити до зростання серцево-судинних захворювань, порушення метаболізму заліза і курячої сліпоти [Liu Shuang et al., 2020]. При нестачі рибофлавіну знижуються темпи росту та виникають захворювання шкіри, очей, нервової системи тощо. Рибофлавін застосовують для лікування пацієнтів із хворобою Паркінсона, молочним ацидозом, мітохондріальною енцефаломіопатією, а також лікування катаракти, мігрені, малярії, дерматозів.

Світовий ринок рибофлавіну становить 200 – 230 млн доларів на рік в залежності від ціни різних препаратів цього вітаміну (вартість кормового рибофлавіну становить близько 15 – 20 доларів/кг, харчового – 35 – 50 доларів/кг) (<https://www.chemicalbook.com/Price/Riboflavin.htm>). Близько 70% виробленого рибофлавіну використовується у тваринництві як додаток до кормів сільськогосподарських тварин (свині та домашня птиця). Решта 30% - у харчовій промисловості як барвник, а також у медицині у складі полівітамінних сумішей та препаратів для лікування низки хвороб. Світове виробництво РФ зросло з 2000 тонн у 2002 році до 9000 тонн у 2015 році (Hoff et al., 2020). При цьому зменшилось забруднення довкілля, а витрати на виробництво знизились на 43% [Acevedo-Rocha et al., 2019]. Виробниками препаратів РФ є фірми BASF (Німеччина), DSM (Нідерланди), Hubei Guangji Pharmaceuticals (Китай). В Україні немає власного виробництва вітаміну В2.

Для багатьох країн з низьким рівнем розвитку біотехнології, зокрема для України, проблема забезпечення сільського господарства, ветеринарії та медицини рибофлавіном власного виробництва має гострий характер і вимагає відповідних фундаментальних і прикладних досліджень із застосуванням сучасних методів генної та метаболічної інженерії. Тому запланована робота є сучасною і відповідає актуальним потребам держави.

Протягом багатьох років рибофлавін отримували здебільшого шляхом хімічного синтезу. В останні десятиріччя рибофлавін став одним з найбільш важливих продуктів біотехнології. Потреби в рибофлавіні сьогодні забезпечують лише за допомогою мікроорганізмів [Schwechheimer et al, 2016; Revuelta et al., 2017; Acevedo-Rocha et al., 2019; Liu Shuang et al., 2020]. Продуцентами рибофлавіну є цвільові гриби, бактерії, дріжджі. Мікробіологічне виробництво рибофлавіну заощаджує кошти, знижуючи енергетичні затрати та суттєво зменшує шкідливі викиди. Більше того, як вихідну сировину для біотехнологічного отримання рибофлавіну використовують поновлювальні джерела речовин рослинного походження. Крім цього, при біотехнологічному виробництві не утворюються побічні продукти та значно легше отримати очищені препарати рибофлавіну.

Процес ферментації з використанням дріжджових продуцентів має низку переваг. Дріжджі здатні рости на простих середовищах і використовувати дешеві джерела Карбону. Дріжджові клітини можуть бути легко відокремлені від ферментаційного середовища. До того ж дріжджі не чутливі до фаголізу. Одноклітинні дріжджі легше культивувати, ніж міцеліальні гриби. Однак, для підвищення рентабельності промислового виробництва необхідно підвищити ефективність цього біотехнологічного процесу. Для налагодження ефективного виробництва рибофлавіну необхідно не тільки підвищити продуктивність його синтезу наявними продуцентами, а й оптимізувати умови вирощування.

15.2. Стан розроблення проблеми.

Деякі ізольовані з природи бактерії, дріжджі та міцелійні гриби синтезують рибофлавін у кількостях, що набагато перевищують власні потреби. До таких організмів належать бактерії *Clostridium acetobutylicum*, дріжджі різних видів і родів, а також гриби *Eremothecium ashbyii* та *Ashbya gossypii*. Надсинтез рибофлавіну інтенсивно вивчався у різноманітних бактерій і грибів, що привело до того, що промислове отримання рибофлавіну хімічним синтезом було повністю замінено на мікробний синтез [Сибірний і співавт., 2006; Abbas and Sibirny, 2011; Rocha et al., 2019; Acevedo-Rocha et al., 2019; Liu Shuang et al., 2020]. Здатність до утворення значних кількостей рибофлавіну виявлена у систематично віддалених видів мікроорганізмів і виникає вона під впливом різноманітних факторів.

Завдяки численним дослідженням на різних модельних об'єктах встановлено основні закономірності регуляції біосинтезу рибофлавіну, клоновано структурні гену цього процесу та ідентифіковано низку регуляторних генів, виявлено системи активного транспорту і екскреції

рибофлавіну. Все це дозволило виявити нові механізми регуляції флавіногенезу. У деяких мікроорганізмів і рослин виявлено здатність йонів заліза регулювати експресію генів біосинтезу рибофлавіну. Однак, до цього часу причини та молекулярні механізми виникнення надсинтезу рибофлавіну є недостатньо вивченими. Незважаючи на це шляхом класичної селекції, а пізніше і метаболічної інженерії сконструйовано штами мікроорганізмів, здатні до надсинтезу рибофлавіну, які використовуються для промислового отримання вітаміну B₂, однак, для рентабельного виробництва вони потребують покращення. Багато з продуцентів рибофлавіну були сконструйовані з використанням метаболічної інженерії. Стратегія полягала у модифікації шляху біосинтезу рибофлавіну, біосинтезу пуринів, центральних шляхів метаболізму вуглеводів, синтезу гліцину, а також пошкодження регуляторних генів. Підвищення продукції рибофлавіну досягалось завдяки посиленню шляху синтезу рибофлавіну або його попередників за рахунок прямої дуплікації генів, заміни нативних промоторів на сильні або модифікації регуляторних генів [Liu et al., 2020]. Ефективним методом для посилення продукції вітаміну B₂ є надекспресія генів, залучених в біосинтез рибофлавіну. Промисловий штам-продуцент рибофлавіну *B. subtilis* був сконструйований шляхом надекспресії рибофлавінового оперону [Hembelin et al., 1999; Perkins et al., 1999]. В *A. gossypii* надекспресія структурних генів також значно посилювала вихід рибофлавіну [Ledesma-Amaro, 2015]. Надекспресія генів *RIB1* і *RIB3* у *A. gossypii*, які кодують ГТФ-циклогідролазу і 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазу, приводила до зростання акумуляції рибофлавіну в культурі [див. Liu Shuang et al., 2020].

Значний вплив на вихід рибофлавіну має інтенсивність синтезу гуанозинтрифосфату (ГТФ) та рибулозо-5-фосфату, що є біосинтетичними попередниками цього вітаміну. Зростання експресії генів шляху біосинтезу пуринів *de novo*, пошкодження репресора шляху біосинтезу пуринів, транскрипційного фактора *AgBAS1* та зняття ретроінгібування фосфорибозилпірофосфатсинтетази та фосфорибозилпірофосфатамідотрансферази ефективно підвищувало продукцію рибофлавіну у *B. subtilis* і *A. gossypii* [Liu Shuang et al., 2020].

Синтез рибофлавіну може бути покращений також за рахунок надекспресії генів пентозофосфатного шляху. Наприклад, посилення експресії глюкозо-6-фосфат дегідрогенази у *B. subtilis* посилювало потік вуглецю в пентозофосфатному шляху, що приводило до зростання продукції рибофлавіну на 25%, а надекспресія 6-фосфоглюконатдегідрогенази у *Corynebacterium glutamicum* підвищувала продукцію рибофлавіну на 37% [Liu Shuang et al., 2020]. Більше того, надекспресія гена *gdh*, який кодує глюкозодегідрогеназу, приводить до зростання внутрішньоклітинного вмісту рибулозо-5-фосфату і підвищення продукції рибофлавіну на 56%.

Підвищення продукції рибофлавіну може бути досягнуте також шляхом покращення реципієнтного штаму. Прикладом такого підходу є надекспресія генів теплового шоку (HSPs) у надпродуценті рибофлавіну *B. subtilis*. Підвищення толерантності до осмотичного і теплового шоку супроводжувалось зростанням продукції рибофлавіну на 23-66% та скороченням часу ферментації до 24 годин [Wang et al., 2019].

Промисловими продуцентами рибофлавіну є *B. subtilis* і *A. gossypii*, проте були спроби сконструювати надсинтетичні рибофлавіну, придатні для отримання вітаміну B₂ у *C. famata*, *C. ammoniagenes*, *E. coli*, *P. guilliermondii* і *Eremothecium ashbyi*. Надекспресія всіх 6 структурних генів у дріжджів *P. pastoris*, які широко використовуються для отримання рекомбінантних білків та інших метаболітів, привела до посилення синтезу рибофлавіну та акумуляції в культуральній рідині до 175 мг/л рибофлавіну [Marx et al., 2008]. Описано нові підходи до підвищення продукції рибофлавіну з використанням мутагенезу, адаптивної еволюції та застосування FACS у *Yarrowia lipolytica* [Wagner et al., 2018], застосування яких дозволило підвищити продукцію рибофлавіну до 100 мг/л. Наведені приклади свідчать про те, що, крім досить детально досліджених флавіногенних видів дріжджів (*P. guilliermondii*, *C. famata*), є інші види дріжджів, здатні до продукції значних кількостей рибофлавіну за певних умов, які можуть бути використані для з'ясування причин виникнення надсинтезу рибофлавіну, а також для конструювання промислових продуцентів цього вітаміну.

Дріжджі характеризуються низкою переваг перед іншими флавіногенними організмами, зокрема, використання дешевих середовищ для культивування, здатність накопичувати велику біомасу, стійкість до фагової інфекції, продукція рибофлавіну у стадії росту. Серед активних продуцентів рибофлавіну вирізняються флавіногенні дріжджі *C. famata*, що накопичують близько 21 г/л цього вітаміну [Abbas and Sibirny, 2011, Stahmann et al., 2000]. Проте, промислове виробництво рибофлавіну мутантними штамами *C. famata* було призупинене через низьку генетичну стабільність продуцентів, а також через невисоку продуктивність синтезу. Тільки 4% вуглецевого субстрату, глюкози, перетворюється до рибофлавіну, в той час як решта 96% використовується на утворення біомаси і

CO₂. Тому необхідними є вдосконалення існуючих та створення нових штамів- надпродуцентів рибофлавіну.

Літературні джерела

1. Сибірний А.А., Федорович Д.В., Борецький Ю.Р., Вороновський А.Я. Мікробний синтез флавінів. Київ: Наукова думка, 2006. – 253с.
2. Abbas, C. A. and Sibirny, A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, vol. 75, no 2, pp. 321–360. DOI: 10.1128/MMBR.00030-10
3. Acevedo-Rocha C. G, Gronenberg L. S., Mack M., Commichau F.M. and Genee H.J. Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins *Current Opinion in Biotechnology* 2019, 56:18–29
4. Averianova LA, Balabanova LA, Son OM, Podvolotskaya AB and Tekutyeva LA (2020) Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:570828. doi: 10.3389/fbioe.2020.570828
5. 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. 50:183-191
6. Dmytruk, K. V., Yatsyshyn, V. Y., Sybirna, N. O., Fedorovych, D. V. and Sibirny, A. A. Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production, *Metabolic Engineering*, 2011, vol. 13, no 1, pp. 82–88. DOI:10.1016/j.ymben.2010.10.005
7. Dmytruk, K., Lyzak, O., Yatsyshyn, V., Kluz, M., Sibirny, V., Puchalski, C. and Sibirny, A. Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production, *J Biotechnol.*, 2014, vol. 172, pp. 11-17. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.12.005
8. Dmytruk K.V., Ruchala J., Fedorovych D. V., Ostapiv R. D, Sibirny A. A. Overexpression of two engineered enzymes involved in the initial steps of purine nucleotide biosynthesis enhances riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Biotechnology Journal* 2020. 15(7):
9. Dmytruk, K. V., Yatsyshyn, V. Y., Sybirna, N. O., Fedorovych, D. V., Sibirny, A. A. Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) for construction of strains with enhanced riboflavin production, *Metabolic Engineering*, 2011, vol. 13, no 1, pp. 82–88.
10. Hembelin M, Griesser V, Keller T, Schurter W, Haiker M, Hohmann H-P, Ritz H, Richter G, Bacher A, van Loon APGM. GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production. *J Ind Microbiol Biotechnol.*1999;22:1–7.
11. Jiménez A, Santos MA, Pompejus M, Revuelta JL Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Appl Environ Microbiol.*2005. 71:5743-5751.
12. Liu Shuang, Hu Wenya, Wang Zhiwen and Chen Tao Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes *Microb Cell Fact.* 2020. 19:31 <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01302-7>
13. Marx, H., Mattanovich, D., Sauer, M., 2008. Overexpression of the riboflavin biosynthetic
14. pathway in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 7 (23-23).
15. Perkins J, Sloma A, Hermann T, Theriault K, Zachgo E, Erdenberger T, Hannett N, Chatterjee N, Williams V II, Rufo G Jr. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1999;22:8–18.
16. Revuelta JL, Ledesma-Amaro R, Lozano-Martinez P et al. Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2017. 44: 659- 665 doi: 10.1007/s10295-016-1842-7
17. Schwechheimer S K, Park EY, Revuelta JL, Becker J, Wittmann C *Biotechnology of riboflavin // Appl Microbiol Biotechnol.* 2016, 100:2107-2119
18. Shi SB, Shen Z, Chen X, Chen T, Zhao XM Increased production of riboflavin by metabolic engineering of the purine pathway in *Bacillus subtilis*. *Biochem Eng J.* 2009. 46:28– 33.
19. Sibirny AA, Dmytruk KV, Fedorovych DV *Candida famata* IMB Y-5034 yeast strain overproducing riboflavin (vitaminB2). 2010. UA Patent 90741, 25 may 2010
20. Stahmann K-P, Revuelta JL, Seulberger EH. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. 53. 509–516.
21. Voronovsky AY, Dmytruk KV, Sibirny AA, Fedorovych DV, Yatsyshyn VY. *Candida famata* IMB Y-5033 yeast strain –stable producer of riboflavin (vitamin B2). 2010. UA Patent 90741, 25 may 2010 .

22. Wagner J.M., Liub L., Yuand S, Venkataramana M.V., Abateb A.R., Alpera H. S., A comparative analysis of single cell and droplet-based FACS for improving production phenotypes: Riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica* *Metabolic Engineering*, 2018, 47, 346-356.
23. Wang Y., Liu L., Jin Z. and Zhang D. Microbial Cell Factories for Green Production of Vitamins. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. 9: 661562. doi: 10.3389/fbioe.2021.661562
24. Wang J, Wang W, Wang H, Yuan F, Xu Z, Yang K, Li Z, Chen Y, Fan K. Improvement of stress tolerance and riboflavin production of *Bacillus subtilis* by introduction of heat shock proteins from thermophilic bacillus strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103:4455–65.

15.3. Досвід і доробок авторів.

Використовуючи класичні методи селекції у дріжджів *C. famata* нами було отримано стабільний надпродуцент рибофлавіну [Sibirny et al., 2010; Dmytruk et al., 2011]. Селекція включала відбір штамів, резистентних до структурного аналога рибофлавіну 8-азагуаніну, 6-азаурацилу, 2-діазо-5-оксо-L-норлейцину і гуанозину, а також використано скринінг жовтих колоній при високому рН. Флавіногенна активність селекціонованого AF-4 штаму була дещо нижчою, ніж промислового продуцента *C. famata* ATCC 20849 (dep8), проте AF-4 не виявляв здатності до реверсії. Тому подальші зусилля були спрямовані на покращення стабільного штаму AF-4 *C. famata*.

Було опрацьовано методи трансформації та інсерційного мутагенезу у *C. famata* ідентифіковано та ізольовано структурні гени шляху біосинтезу рибофлавіну, а саме *RIB1*, *RIB2*, *RIB5*, *RIB6* і *RIB7*. Новий поштовх до дослідження механізмів регуляції біосинтезу рибофлавіну у дріжджів дала ідентифікація у *C. famata* транскрипційного фактора Sef1 - позитивного регулятора біосинтезу рибофлавіну [Dmytruk et al., 2006]. Точкові мутації цього гена у *C. famata* і *Pichia guilliermondii* змінюють фенотип цих флавіногенних видів до фенотипу більшості дріжджів, у яких залізо не бере участі в регуляції синтезу рибофлавіну [Dmytruk et al., 2006; Fedorovych et al., 2020]. У той же час експресія додаткової копії гена *SEF1* *D. hansenii* у штамі-надсинтетику рибофлавіну dep8 приводила до зростання продуктивності синтезу рибофлавіну і підвищення стабільності за цією ознакою [Voronovsky et al., 2010].

Маніпуляції з шляхом біосинтезу пуринових нуклеотидів були успішно використані для посилення метаболічного потоку через цей шлях у *A. gossypii*, що привело до зростання продукції рибофлавіну [Jiménez et al., 2005]. У *B. subtilis* посилення експресії генів шляху біосинтезу пуринів (pur-оперону), і модифікація ФРПФ-амідотрансферази, яка знімає регуляцію за механізмом оберненого зворотнього зв'язку, приводить до трьох кратного зростання продукції рибофлавіну [Shi et al., 2014].

Отримано штами дріжджів *C. famata* з надекспресованими модифікованими (нечутливими до ретроінгібування) генами *PRS3* (кодує фосфорибозилпірофосфатсинтетазу) і *ADE4* (кодує фосфорибозилпірофосфатамідотрансферазу) *C. famata*, які залучені в біосинтез попередника рибофлавіну - ГТФ *de novo*. Показано, що у штаму, який, крім надекспресованих генів транскрипційного фактора *SEF1* та структурних генів біосинтезу рибофлавіну *RIB1* та *RIB7*, містить плазмиду: з обидвома модифікованими генами *PRS3* і *ADE4*, у 2.5-3.5-рази зростає продукція рибофлавіну [Dmytruk et al., 2020].

Для подальшого покращення ефективності процесів біотехнологічного отримання вітаміну B2 необхідним залишається фундаментальне вивчення регуляції синтезу цього вітаміну та використання сучасних методів генної і метаболічної інженерії. Дослідження механізмів дії різноманітних регуляторних елементів, які контролюють біосинтез рибофлавіну, є важливим і для з'ясування причин виникнення його надсинтезу, і для створення теоретичних основ конструювання нових продуцентів рибофлавіну.

Співробітники відділу мають досвід роботи з дріжджами, здатними до надсинтезу рибофлавіну, а також використання гідролізатів лігноцелюлози для отримання іншого продукту - паливного етанолу. Про належний рівень кваліфікації науковців свідчать їх публікації в міжнародних виданнях:

Sibirny AA, Dmytruk KV, Fedorovych DV (2010) *Candida famata* IMB Y-5034 yeast strain overproducing riboflavin (vitaminB₂). UA Patent 90741, 25 May 2010

Sibirny AA, Yatsyshyn VY, Fedorovych DV et al (2010) Yeast strain *Candida famata* IMB Y-5028 producing flavin mononucleotide (5'FMN). UA Patent No. 90754 2010

Yatsyshyn V Y, Fedorovych DV, Sibirny AA (2010) Medium optimization for production of flavin mononucleotide by the recombinant strain of the yeast *Candida famata* strain using statistical designs. *Biochemical Engineering Journal* 49:52-60

Voronovsky AY, Dmytruk KV, Sibirny AA, Fedorovych DV, Yatsyshyn VY. 2008. *Candida famata* IMB Y-5033 yeast strain –stable producer of riboflavin (vitamin B₂). UA Patent 90741, 25 may 2010

Abbas, C. A., and Sibirny, A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2011; 75: 321–60. doi: 10.1128/membr.00030-10

Abbas CA, Sibirny AA, Voronovsky AY, Ishchuk OP. Alcoholic xylose fermentation at high temperatures by the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. United States Patent 20090155872, Publication Date: 06/18/2009.

Dmytruk KV, Yatsyshyn VY, Sibirna NO, Fedorovych, D. V., Sibirny A. A. 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.

Yatsyshyn VYu, Fedorovych DV, Sibirny AA. Metabolic and bioprocess engineering for obtaining of the FAD overproducing strains in the yeast *Candida famata*. *J Ind Microbiol* 2014. *Biotechnol* 41:823–835

Dmytruk K, Lyzak O, Yatsyshyn V, Kluz M, Sibirny V et al. Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production. *Journal of Biotechnology.* 2014; 172:11-17. . doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.12.005

Kurylenko OO, Ruchala J, Hryniv OB, Abbas CA, Dmytruk KV, Sibirny AA. Metabolic engineering and classical selection of the methylotrophic thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation. *Microb Cell Fact.* 2014;13:122.

Andreieva Y., Petrovska Y., Lyzak O., Liu W., Kang Y. et al. Role of the regulatory genes *SEF1*, *VMA1* and *SFUI* in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*) *Yeast.* 2020.; 37: 497-504. <https://doi.org/10.1002/yea.3503>

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>

Tsyryllyuk A.O., Fedorovych D.V., Sobchuk S.M., Dmytruk K.V., Sibirny A.A. Lactose inducible expression of transcription factor gene *SEF1* increases riboflavin production in the yeast *Candida famata*. *Мікробіологічний журнал*, 2021, №5, с.56-61

Kurylenko O., Ruchala J., Kruk B., Vasylyshyn R., Szczepaniak J., Dmytruk K., Sibirny A. The role of Mig1, Mig2, Tup1 and Nap4 transcription factors in regulation of xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha* // *FEMS Yeast Research.* – 2021. – Vol. 21, № 4. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab029>

Цирульник А.О., Федорович Д.В., Колодій О.М., Дмитрук К.В., Сибірний А.А. Патент України на винахід № 122821 С2 «Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну)» МПК С12N 1/19. Бюлетень №11, 2021

15.4. Структура досліджень.

В Інституті біології клітини НАН України наявні експериментальна база та досвід працівників, Виконавці проекту володіють відповідними сучасними методами досліджень, мають достатній досвід та знання, необхідні для успішного виконання запланованих досліджень. Для розробки лабораторного та напівпромислового регламентів отримання вітаміну В₂ з гідролізатів лігноцелюлози необхідно провести дослідження у декількох напрямках:

1. Перевірити здатність сконструйованих нами раніше рекомбінантних штамів *C. famata* до росту і синтезу рибофлавіну у середовищах, що містять ксилозу, суміш ксилози і глюкози або гідролізати лігноцелюлози (1 квартал).
2. Оптимізація складу середовища та умов культивування штамів-продуцентів рибофлавіну в лабораторних умовах (2-3квартал)
3. Розробка лабораторного та напівпромислового регламенту отримання вітаміну В₂ з гідролізатів лігноцелюлози (4 квартал)

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

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), високошвидкісні центрифуги (Sorvall), мікроцентрифуги (Eppendorf), трансільюмінатори (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, ультранизькотемпературні морозильні камери, а також біотехнологічне обладнання, зокрема сучасний лабораторний біореактор з двома спареними одиницями об'ємом 1 л (Eppendorf).

16. Техніко-економічне обґрунтування

Запропонований науково-технічний проект є продовженням науково-дослідної роботи відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології НАН України № : III-6-20 "Вивчення механізму дії нових генів в регуляції синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів *Candida famata*" та «Генетичний контроль біосинтезу та транспорту рибофлавіну у флавіногенних дріжджів цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» за 2015-2019 рр. У результаті виконання запланованих досліджень за згаданими темами було отримано нові дані про регуляцію біосинтезу рибофлавіну у дріжджів та з застосуванням методів метаболічної інженерії сконструйовано штами з підвищеною здатністю до синтезу цього вітаміну у дріжджів *C. famata*, які за виходом рибофлавіну близькі до промислових продуцентів цього вітаміну – *B. subtilis* і *A.gossypii*. Оптимізовано умови культивування сконструйованих штамів для максимальної продукції рибофлавіну. Показано, що для отримання препаратів рибофлавіну за допомогою сконструйованих штамів можуть бути використані промислові субстрати: молочна сироватка, меляса, гідролізат лігноцелюлози. Лігноцелюлоза (суха біомаса рослин) є найбільш поширеним гетеро полімером у природі, який має значний потенціал для біотехнологічного отримання важливих продуктів, зокрема біопалива, ліків, вітамінів, косметичних виробів і т.п. Даний проект передбачає перетворення рослинної біомаси (лігноцелюлози) до вітаміну В2. Гідроліз лігноцелюлози буде проведено за допомогою комбінованої дії целюлаз і геміцелюлаз. Основними цукрами гідролізу є глюкоза, целобіоза та ксилоза. Сконструйовані нами штами здатні рости і акумулювати в культуральній рідині рибофлавін при вирощуванні в середовищах, що містять як джерело Карбону різноманітні цукри: глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу і лактозу. Встановлено, що штами *C. famata*-надсинтетики добре ростуть і синтезують рибофлавін на промислових субстратах: пивному суслі, меласі, гідролізаті багаси, молочній сироватці.

Таким чином, наявні штами рекомбінантні штами дріжджів *C. famata* –продуценти рибофлавіну є перспективними для впровадження у виробництво на базі нашого партнера. Приватне Акціонерне Товариство «Ензим» є найбільшим в Україні промисловим підприємством з виробництва біотехнологічної продукції з допомогою мікробного синтезу. Працівники ПРАТ «Ензим» мають великий досвід у галузі виробництва біопродуктів з допомогою дріжджів і зацікавлені в отриманні дешевих препаратів рибофлавіну з гідролізу лігноцелюлози.

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами науково-технічного проєкту

- | | |
|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги |
| <input type="checkbox"/> | немає аналогів в Україні |
| <input type="checkbox"/> | краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками |
| <input type="checkbox"/> | перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками |

18 Використання результатів науково-технічного проєкту

18.1 Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення науково-технічного проєкту

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
Напівпромисловий регламент отримання рибофлавіну за допомогою штамів дріжджів <i>S. famata</i> , вирощених на гідролізатах лігноцелюлози	ПрАТ "Ензим"	1 т/рік

18.2 Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання науково-технічного проєкту

За участі нашого партнера Приватного акціонерного товариства "Ензим", планується налагодити промислове виробництво препаратів рибофлавіну на основі дріжджів на гідролізатах лігноцелюлози. Передбачається, що у випадку успішного виконання проєкту, одержаний рибофлавін буде конкурентоспроможними на українському та світових ринках за рахунок низької собівартості. Більше того, використання лігноцелюлозних відходів сільського господарства, деревообробної та целюлозно-паперової промисловості є важливим з екологічної точки зору, оскільки зменшить забруднення довкілля.

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	ПрАТ "Ензим"	Штами дріжджів з підвищеною продукцією рибофлавіну з лігноцелюлозних відходів, препарати рибофлавіну	Продукція 1 т рибофлавіну в рік

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

Реєстраційний номер патенту, свідоцтва, країна (для ОІВ, набуття прав на які засвідчується охоронним документом)	Назва необхідного патенту, ноу-хау, об'єкта авторського права та інших ОІВ	Творець ОІВ	Вид наявних прав (виключні майнові права, виключна, невиключна, проста ліцензія) чи є потреба в одержанні прав на використання
Патент на винахід № 90741	Штам дріжджів <i>Candida famata</i> ІМВ У-5033 – стабільний продуцент рибофлавіну (вітаміну В2)	Вороновський А.Я., Дмитрук К.В., Сибірний А.А., Федорович Д.В., Яцишин В.Ю.	Правами на винахід володіє авторський колектив, Інститут біології клітини НАН України
Патент України на винахід №122821	«Спосіб отримання рекомбінантних штамів дріжджів <i>Candida famata</i> з підвищеним рівнем синтезу вітаміну В2 (рибофлавіну)»	Цирульник А.О., Федорович Д.В., Колодій О.М., Дмитрук К.В., Сибірний А.А.	Правами на винахід володіє авторський колектив, Інститут біології клітини НАН України

20. Фінансові аспекти науково-технічного проєкту**20.1. Загальна вартість роботи 450,000 тис. грн.**

словами: чотириста п'ятдесят тисяч грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2022 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	450,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

Наукова рада Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (м. Київ)

Наукова рада біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (м. Одеса)

Наукова рада біологічного факультету Львівського національного університету ім. Івана Франка (м. Львів)

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Підгорський Валентин Степанович	академік НАН України, д.б.н., проф., головний науковий співробітник	Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України
Блюм Ярослав Борисович	академік НАН України, д.б.н., проф., головний науковий співробітник	ДУ "Ін-т харчової біотехнології та геноміки НАН України "
Гнатуш Світлана Олексіївна	к.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет імені Івана Франка
Іваниця Володимир Олексійович	член-кореспондент НАН України, д.б.н., проф., проректор з наукової роботи	Одеський національний університет імені Мечникова

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

24. Організація(ї)-партнер(и) (найменування, місцезнаходження, номери телефонів)

№	Найменування	Місцезнаходження	Номери телефонів
1	ПрАТ Ензим	02094, м.Київ, Червоноткацька 27А, 104	0432 329249

25. Форма участі партнера у проєкті (відмітити необхідні і конкретизувати по окремих пунктах)

№	Форма участі	Назва матеріальної участі, послуги та фінансовий еквівалент
1.	ПрАТ Ензим	
<input type="checkbox"/>	Фінансова	Обсяг фінансування _____ тис. грн.
<input checked="" type="checkbox"/>	Матеріальна	1.Надає власні площі, електро-та теплоенергію для культивування отриманих рекомбінантних штамів, компоненти живильних середовищ для культивування дріжджів, реактиви та обладнання для аналітичних цілей _____ Загальний фінансовий еквівалент 250.000 тис. грн.
<input checked="" type="checkbox"/>	Послуги	0.Забезпечує роботу мікробіологічної лабораторії, лінії відмивання, пресування та висушування дріжджів, консультації технологів та відділу маркетингу. _____ Загальний фінансовий еквівалент 200.000 тис. грн.
Загальний фінансовий еквівалент 450,000 тис. грн.		
Загальний фінансовий еквівалент 450,000 тис. грн.		

26. Час і місце впровадження розробки за проєктом

н е м а є

_____ *дата*

Заступник директора з наукової роботи
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.н.с.

_____ Костянтин ДМИТРУК
(підпис)

М.П.

Науковий керівник науково-технічного
проєкту

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ Андрій СИБІРНИЙ
(підпис)

Додаток А
до Запиту на відкриття науково-технічного проєкту

ПОГОДЖЕНО

Заступник директора з наукової роботи
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.н.с.

_____ Костянтин ДМИТРУК
(підпис)
« _____ » _____ 20 ____ р.
М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ на виконання науково-технічного проєкту

«Розробка лабораторного та напівпромислового регламентів отримання вітаміну В2 з гідролізатів лігноцелюлози з використанням рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata*»

Науково-технічні проєкти установ НАН України 2022 року

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження науково-технічного проєкту

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Молекулярні біотехнології створення нових організмів та продуктів для сільського господарства, фармацевтичної та харчової промисловості

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

н е м а є

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Вивчення молекулярно-генетичних і біохімічних механізмів регуляції метаболізму у дріжджів та створення нових біотехнологічних процесів і продуктів на основі цих мікроорганізмів.

6. Мета науково-технічного проєкту

Метою роботи є опрацювання лабораторного та напівпромислового регламентів отримання препаратів вітаміну В2 на гідролізатах лігноцелюлози. Вітамін В2 (рибофлавін) є незамінним компонентом харчування людини, цінним профілактичним препаратом та необхідною складовою кормів, які використовуються у тваринництві та птахівництві. Від 1 до 3% генів бактерійних та еукаріотичних геномів кодують білки, що містять флавіни. Флавінові коферменти ФМН і ФАД залучені у процеси клітинного дихання, детоксикації ароматичних сполук та важких металів, мікросомального окислення, біолюмінісценції, фототропізму, репарації, можуть індукувати оксидативний стрес та захищати клітину від нього [Powers, 2003 Liu Shuang et al., 2020, Wang Y, et al., 2021]. Дефіцит рибофлавіну може приводити до зростання серцево-судинних захворювань, порушення метаболізму заліза і курячої сліпоти [Liu Shuang et al., 2020]. При нестачі рибофлавіну знижуються темпи росту та виникають захворювання шкіри, очей, нервової системи тощо. Рибофлавін застосовують для лікування пацієнтів із хворобою Паркінсона, молочним ацидозом, мітохондріальною енцефаломіопатією, а також лікування катаракти, мігрені, малярії, дерматозів.

Світовий ринок вітаміну В2 становить 200 – 230 млн доларів на рік в залежності від ціни різних препаратів цього вітаміну (вартість кормового рибофлавіну становить близько 15 – 20 доларів/кг, харчового – 35 – 50 доларів/кг). Близько 70% виробленого рибофлавіну використовується у тваринництві як додаток до кормів сільськогосподарських тварин (свині та домашня птиця). Решта 30% - у харчовій промисловості як барвник, а також у медицині у складі полівітамінних сумішей та препаратів для лікування низки хвороб. Світове виробництво РФ зросло з 2000 тонн у 2002 році до 9000 тонн у 2015 році [Hoff et al., 2020]. При цьому зменшилось забруднення довкілля, а витрати на виробництво знизились на 43% [Acevedo-Rocha et al., 2019]. Виробниками препаратів РФ є фірми BASF (Німеччина), DSM (Нідерланди), Hubei Guangji Pharmaceuticals (Китай). В Україні немає власного виробництва вітаміну В2.

7. Термін проведення науково-технічного проєкту

початок — 01 січня 2022 р. ; закінчення — 31 грудня 2022 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **450,000** тис. грн.

та по роках

2022 р. — 450,000 тис. грн.

8. Календарний план науково-технічного проєкту

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Перевірка здатності наявних рекомбінантних штамів <i>S. famata</i> до росту і синтезу рибофлавіну у середовищах, що містять ксилозу, суміш ксилози і глюкози або гідролізати лігноцелюлози	01 січня 2022 р. - 31 січня 2022 р.	д.б.н., проф., Д.В. Федорович.
2	Оптимізація складу середовища та умов культивування штамів-продуцентів рибофлавіну в лабораторних умовах	01 квітня 2022 р. - 30 вересня 2022 р.	к.б.н., Л.Р. Фаюра.
3	Розробка лабораторного та напівпромислового регламенту отримання вітаміну В2 з гідролізу лігноцелюлози	01 жовтня 2022 р. - 31 грудня 2022 р.	д.б.н., с.н.с., К.В. Дмитрук.

9. Зміст, основні вимоги до виконання науково-технічного проєкту, рівня і способів її виконання

Дріжджі *S. famata* мають високий флавіногенний потенціал. У нашому відділі за допомогою методів класичної генетики та методів метаболічної інженерії сконструйовано низку штамів цього виду дріжджів, які за здатністю до продукції рибофлавіну є близькими до промислових продуцентів вітаміну В2 – *Bacillus subtilis* та *Ahbya gossypii*. Важливою рисою *S. famata* є їх здатність використовувати як джерело Карбону різні цукри, зокрема ксилозу, а також рости на відходах та напівпродуктах харчової промисловості (пивному суслі, меласі, молочній сироватці, гідролізатах лігноцелюлози). Таким чином, наявні штами рекомбінантні штами дріжджів *S. famata* – продуценти рибофлавіну є перспективними для впровадження у виробництво на базі нашого партнера. Приватне Акціонерне Товариство «Ензим» є найбільшим в Україні промисловим підприємством з виробництва біотехнологічної продукції з допомогою мікробного синтезу. Працівники ПРАТ «Ензим» мають великий досвід у галузі виробництва біопродуктів з допомогою дріжджів і зацікавлені в отриманні дешевих препаратів рибофлавіну з гідролізу лігноцелюлози.

Для розробки лабораторного та напівпромислового регламентів отримання вітаміну В2 з гідролізу лігноцелюлози необхідно перевірити здатність сконструйованих нами раніше рекомбінантних штамів *S. famata* до росту і синтезу рибофлавіну у середовищах, що містять ксилозу, суміш ксилози і глюкози або гідролізати лігноцелюлози (1 квартал), оптимізувати склад середовища і умови культивування штамів-продуцентів рибофлавіну для максимального виходу цільового продукту, в лабораторних умовах в колбах і в ферментері (2-3 квартал), масштабувати процес та розробити регламент для промислового отримання препаратів вітаміну В2 на гідролізатах лігноцелюлози (4 квартал). Для виконання запланованих у програмі проєкту наукових досліджень необхідним є фінансування з бюджету НАН України в обсязі 450 тис. грн.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та науково-технічним проєктом в цілому

У результаті виконання запланованої роботи будуть отримані штами дріжджів з підвищеною продукцією рибофлавіну на гідролізатах лігноцелюлози. Буде підбрано склад середовища та умов культивування для максимального виходу цільового продукту. Буде опрацьовано лабораторний та напівпромисловий регламент отримання препаратів вітаміну В2, Планується масштабування процесу отримання рибофлавіну на гідролізатах лігноцелюлози, буде отримана, пробна партія препарату вітаміну В₂. За результатами даного проєкту будуть створені передумови для промислового виробництва рибофлавіну на дешевій поновлювальній сировині (відходах рослинної біомаси).

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню науково-технічного проєкту

- звіт про виконання наукового проєкту, оформленого відповідно до ДСТУ 3008:2015 «Інформація та документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура та правила оформлювання» зі списком публікацій за результатами виконання роботи у звітному році;
- кошторис фактичних витрат із розрахунками за статтями;
- перелік статей накладних витрат;
- перелік додаткової науково-технічної документації (за необхідності).

Науковий керівник науково-технічного проєкту

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ Андрій СИБІРНИЙ
(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості науково-технічного проєкту

«Розробка лабораторного та напівпромислового регламентів отримання вітаміну В2 з гідролізатів лігноцелюлози з використанням рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata*»
на 2022 рік

Термін виконання науково-технічного проєкту: початок — 01.01.2022 р., закінчення — 31.12.2022 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	225,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	49,500
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	27,500
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	30,000
5	Видатки на відрядження	2250	28,000
6	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	30,000
7	Оплата електроенергії	2273	45,000
8	Оплата природного газу	2274	15,000
Разом:			450,000
в т.ч. накладні витрати			22,500
% їх до основної заробітної плати			10,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Заступник директора з наукової роботи
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.н.с.

_____ Костянтин ДМИТРУК
(підпис)
М.П.

Науковий керівник науково-технічного проєкту
Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ Андрій СИБІРНИЙ
(підпис)
Головний бухгалтер

_____ Мирослава ДЕМКОВИЧ
(підпис)